

Especiación de metales pesados mediante la formación de quelatos

Distribución de las especies inorgánicas de As y Cr en la Ría de Arousa

Tesis Doctoral

Paloma Herbello Hermelo

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología

2007



Departamento de Química Analítica,
Nutrición y Bromatología.

Facultad de Química

Especiación de metales pesados
mediante la formación de quelatos.
Distribución de las especies
inorgánicas de As y Cr en la Ría de
Arousa

Memoria presentada por Dña. **Paloma Herbello Hermelo**
para optar al Grado de Doctor en Química

2007



Departamento de Química Analítica, Nutrición e Bromatoloxía
E- 15872. Santiago de Compostela. España
Teléfono. 981591079

Dna. Pilar Bermejo Barrera, Catedrática de Universidade do Departamento de Química Analítica, Nutrición e Bromatoloxía, e **Dna. M^a Carmen Barciela Alonso**, Profesora Contratada Doutora do mesmo departamento, ambas na Universidade de Santiago de Compostela.

Informan:

Que a presente memoria titulada Especiación de metais pesados mediante la formación de quelatos. Distribución de las especies inorgánicas de As y Cr en la Ría de Arousa, que para optar ao Grao de Doctor en Química presenta **Dna. Paloma Herbello Hermelo**, realizouse baixo a nosa dirección no Departamento de Química Analítica, Nutrición e Bromatoloxía da Universidade de Santiago de Compostela.

Considerando que constitúe traballo de Tese, autorizan a súa presentación na Comisión do Terceiro Ciclo de Universidade de Santiago de Compostela.

Asdo. Pilar Bermejo Barrera

Asdo. M^a Carmen Barciela Alonso

Asdo. Paloma Herbello Hermelo



Agradecimientos

A mis directoras de Tesis, Pilar Bermejo Barrera y M^a Carmen Barciela Alonso, por su ayuda y paciencia.

A la "Secretaría Xeral de Investigación e Desenvolvemento da Xunta de Galicia" por la beca predoctoral concedida para la realización de este trabajo.

A todas aquellas personas que durante esta etapa me han apoyado de un modo u otro.

A mi familia y amigos.

Glosario de Abreviaturas

8-HQ	8-hidroxiquinolina
AAS	Acrónimo en inglés de Espectroscopía de Absorción Atómica
APDC	Amonio pirrolidinditiocarbamato
APDC	Amonio pirrolidinditiocarbamato
Cr(TFA)₃	Complejo entre Cr(III) y 1,1,1, trifluoro-2,4-pentadiona
CRM	Acrónimo en inglés de material de referencia certificado
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
CTD	Conductividad-Temperatura-Profundidad (Depth, en Inglés)
CV	Acrónimo en inglés de Vapor Frío
DDTC	Dietilamonio ditiocarbamato
DDTP	Dietilditiofosfato
DMA	Dimetilarsénico
DPC	1,5-difenilcarbazida
EF	Acrónimo en inglés de factor de enriquecimiento
ETAAS	Acrónimo en inglés de Espectroscopía de Absorción Atómica con Atomización Electrotérmica
FAAS	Acrónimo en inglés de Espectroscopía de Absorción Atómica de Llama
FIA	Acrónimo en inglés de Análisis por Inyección en Flujo
FI-ETAAS	Acrónimo en inglés de Inyección en Flujo-Espectroscopía de Absorción Atómica con Atomización Electrotérmica
FI-FAAS	Acrónimo en inglés de Inyección en Flujo-Espectroscopía de Absorción Atómica de Llama
GC/MS	Acrónimo en inglés de Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas
GC-AAS	Acrónimo en inglés de Cromatografía de Gases-Espectroscopía de Absorción Atómica
HAc/NaAc	Tampón de Ácido Acético y Acetato Sódico
HG	Acrónimo en inglés de Generación de Hidruros
HG-AAS	Acrónimo en inglés de Espectroscopía de Absorción Atómica con Generación de Hidruros
HG-AFS	Acrónimo en inglés de Generación de Hidruros- Espectroscopía de Fluorescencia Atómica

HPLC	Acrónimo en inglés de Cromatografía Líquida de Alta Presión
IAPSO	Internacional Association of Physical Sciences of the Ocean
ICP	Acrónimo en inglés de Plasma Acoplado Inductivamente
ICP-AES	Acrónimo en inglés de Espectroscopía de Emisión Atómica de Plasma Acoplado Inductivamente
ICP-MS	Acrónimo en inglés de Espectrometría de Masas-Plasma Acoplado Inductivamente
IIM Vigo	Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo
INSHT	Instituto Nacional Seguridad e Higiene en el Trabajo
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LED	Límite de Exposición basados en promedios ponderados en 8 horas de jornada laboral
LOD	Acrónimo en inglés Límite de Detección
LOQ	Acrónimo en inglés Límite de Cuantificación
MIBK	Metilisobutilcetona
MMA	Monometilarsénico
n. d.	No detectado
NaDDTC	Dietilditiocarbamato sódico
nFIA	Acrónimo en inglés Análisis por Inyección en Flujo normal
OMS	Organización Mundial de la Salud
PTFE	Polietrafluoroetileno
rFIA	Acrónimo en inglés de Análisis por Inyección en Flujo reversa
SBSR	En inglés <i>Single Bead String Reactor</i>
TFA	Trifluoroacetilacetona; 1,1,1,trifluoro-2,4-pentadiona
UNESCO	Acrónimo en Ingles de <i>United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization</i>

ÍNDICE

INDICE GENERAL

CAPÍTULO 1

Introducción preliminar

1	Objetivos	4
2	Metales traza	5
2.1	CROMO	6
2.1.1	Usos	6
2.1.2	Toxicidad	7
2.2	ARSÉNICO	8
2.2.1	Usos	9
2.2.2	Toxicidad	9
3	Especiación	10
3.1	ESPECIACIÓN EN AGUA DE MAR	13
3.1.1	Especiación de Cr	13
3.1.2	Especiación de As	15
4	Uso de quelatos en la especiación de metales	16
5	Bibliografía	20

CAPÍTULO 2

Determinación selectiva de Cr(VI) en muestras de agua por ETAAS mediante la formación del complejo Cr(TFA)₃

1	Muestras de agua dulce	29
1.1	INTRODUCCIÓN	29
1.1.1	Elección del agente quelatante	29
1.1.2	Espectroscopía de absorción atómica	31
1.1.2.1	Fuentes de radiación	32
1.1.2.2	Espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotérmica	33
1.2	DESARROLLO EXPERIMENTAL	40
1.2.1	Equipamiento	41
1.2.1.1	Aparatos	41
1.2.1.2	Reactivos	41

1.2.1.3 Limpieza del material	42
1.2.2 Formación del complejo. Ensayos previos	42
1.2.2.1 Disolución tampón. pH	43
1.2.2.2 Potencia del microondas y del tiempo de calentamiento	44
1.2.3 Optimización del programa de temperaturas de la cámara de grafito	45
1.2.4 Formación del complejo. Optimización	47
1.2.4.1 Influencia del pH de la disolución tampón	47
1.2.4.2 Optimización de la concentración de 1,1,1-trifluoro-2,4-pentadiona	49
1.2.4.3 Estabilidad del complejo	50
1.2.5 Determinación en ETAAS. Optimización	51
1.2.5.1 Estudio del modificador de matriz	51
1.2.6 Características analíticas del método	52
1.2.6.1 Rectas de calibrado y adición	52
1.2.6.2 Sensibilidad	54
1.2.6.3 Precisión	55
1.2.6.4 Exactitud	56
1.2.7 Método propuesto	58
1.3 APLICACIÓN	58
2 Muestras de agua de mar	60
2.1 INTRODUCCIÓN	60
2.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL	60
2.2.1 Equipamiento	61
2.2.1.1 Aparatos	61
2.2.1.2 Reactivos	61
2.2.1.3 Limpieza del material	62
2.2.2 Formación del complejo. Optimización	62
2.2.2.1 Influencia del pH de la disolución tampón	62
2.2.2.2 Potencia del microondas y el tiempo de calentamiento	64
2.2.2.3 Cantidad de agente complejante TFA	65
2.2.3 Optimización del programa de temperaturas de la cámara de grafito	66
2.2.4 Características analíticas	70
2.2.4.1 Rectas de calibrado y adición	70
2.2.4.2 Sensibilidad	72
2.2.4.3 Precisión	73
2.2.4.4 Exactitud	74
2.2.5 Método propuesto	75
2.3 APLICACIÓN	76
3 Bibliografía	81

CAPÍTULO 3

Uso de reactores anudados para la preconcentración de As mediante FI-ETAAS en muestras de agua de mar

1 Introducción general	89
1.1 ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO (FIA)	89
1.1.1 Origen de la técnica FIA	89
1.1.2 Definición de FIA	90
1.1.3 Fundamentos FIA	91
1.1.3.1 Dispersión	92
1.1.4 Instrumentación FIA	95
1.1.4.1 Mecanismo de propulsión	95
1.1.4.2 Sistemas de inyección	99
1.1.4.3 Sistemas de transporte y reacción	101
1.1.4.4 Sistemas de detección	104
1.1.5 Características de los sistemas FI-AAS	104
1.2 TÉCNICAS DE SEPARACIÓN Y PRECONCENTRACIÓN	108
1.2.1 Ventajas de la técnica de separación y preconcentración por FIA	108
1.2.2 Evaluación de la eficacia de la preconcentración en sistemas FIA	109
1.2.3 Clasificación de las técnicas de separación por FIA	112
1.2.3.1 Extracción en fase sólida	113
1.2.3.2 Precipitación y coprecipitación	114
1.2.3.3 Sistemas de extracción líquido-sólido	115
1.3 AGENTE COMPLEJANTE (APDC)	120
2 Determinación selectiva de As(III) en agua de mar	121
2.1 INTRODUCCIÓN	121
2.1.1 Especiación de As en agua de mar	121
2.1.2 Técnica analítica empleada	122
2.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL	124
2.2.1 Equipamiento	124
2.2.1.1 Aparatos	124
2.2.1.2 Reactivos	125
2.2.1.3 Limpieza del material	126
2.2.2 Diseño del montaje FI	127
2.2.3 Optimización del programa de temperaturas de la cámara de grafito	130
2.2.4 Formación del complejo. Optimización	134

2.2.4.1 Efecto de la concentración de HCl	134
2.2.4.2 Efecto de la cantidad de APDC	136
2.2.4.3 Efecto de la proporción de mezcla muestra/APDC	137
2.2.4.4 Efecto del tiempo de preconcentración	139
2.2.4.5 Elección de la disolución de lavado	140
2.2.4.6 Efecto de la longitud del reactor anudado y del volumen de elución	141
2.2.5 Características analíticas	143
2.2.5.1 Rectas de calibrado y adición estándar	143
2.2.5.2 Sensibilidad	146
2.2.5.3 Precisión	147
2.2.5.4 Exactitud	148
2.2.5.5 Factor de preconcentración y eficacia de adsorción	148
2.2.5.6 Interferencias	150
2.2.6 Método propuesto	152
2.3 APLICACIÓN	153
3 Determinación de As total en muestras de agua de mar mediante FI-ETAAS	154
3.1 INTRODUCCIÓN	154
3.1.1 Pre-reducción	154
3.1.2 Microondas focalizado	157
3.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL	159
3.2.1 Equipamiento	159
3.2.1.1 Aparatos	159
3.2.1.2 Reactivos	160
3.2.1.3 Limpieza del material	160
3.2.2 Modificación del esquema FI	161
3.2.3 Elección del reductor. Ensayos preliminares	162
3.2.3.1 Tiourea	162
3.2.3.2 L-cisteína	163
3.2.4 Optimización de la etapa de reducción	166
3.2.4.1 Concentración de L-cisteína	166
3.2.4.2 Efecto de la potencia del microondas focalizado	167
3.2.5 Características analíticas	169
3.2.5.1 Recta de calibrado y adición estándar	169
3.2.5.2 Sensibilidad	171
3.2.5.3 Precisión	172
3.2.5.4 Exactitud	173
3.2.5.5 Factor de preconcentración y eficacia de adsorción	174
3.2.6 Método propuesto	175

3.3 APLICACIÓN	177
4 Bibliografía	178
CAPÍTULO 4	
Uso de reactores anudados para la preconcentración de Cr mediante FI-ETAAS en muestras de agua de mar	
1 Determinación selectiva de Cr (VI) en agua de mar	191
1.1 INTRODUCCIÓN	191
1.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL	191
1.2.1 Equipamiento	191
1.2.1.1 Aparatos	191
1.2.1.2 Reactivos	192
1.2.1.3 Limpieza del materia	194
1.2.2 Optimización de la programa de temperatura de la cámara de grafito	194
1.2.3 Preconcentración. Optimización	196
1.2.3.1 Efecto de la concentración HCl	197
1.2.3.2 Efecto de la cantidad de APDC	199
1.2.3.3 Efecto de la proporción de mezcla muestra/APDC	200
1.2.3.4 Efecto del tiempo de preconcentración	201
1.2.3.5 Elección de la disolución de lavado	202
1.2.3.6 Efecto de la longitud del reactor anudado y volumen de elución	204
1.2.4 Características analíticas	206
1.2.4.1 Rectas de calibrado y adición estándar	206
1.2.4.2 Sensibilidad	210
1.2.4.3 Precisión	211
1.2.4.4 Exactitud	213
1.2.4.5 Factor de preconcentración y eficacia de adsorción	213
1.2.4.6 Interferencias	214
1.2.5 Método propuesto	216
1.3 APLICACIÓN	217
2 Determinación de Cr total en muestras de agua de mar mediante FI-ETAAS	218
2.1 INTRODUCCIÓN	218
2.1.1 Preoxidación	218
2.1.1.1 Ce(IV)	218
2.1.1.2 Peroxodisulfato, $S_2O_8^{2-}$	219
2.1.1.3 $KMnO_4$	220

2.1.1.4	H ₂ O ₂ /NaOH	220
2.1.1.5	KIO ₄	220
2.2	DESARROLLO EXPERIMENTAL	221
2.2.1	Equipamiento	221
2.2.1.1	Aparatos	221
2.2.1.2	Reactivos	222
2.2.1.3	Limpieza de material	222
2.2.2	Modificación del montaje FI	223
2.2.3	Elección del oxidante. Ensayos preliminares	224
2.2.3.1	Ce(IV)	224
2.2.3.2	K ₂ S ₂ O ₈ /Ag NO ₃	226
2.2.3.3	K ₂ S ₂ O ₈ en medio ácido	227
2.2.4	Efecto de la potencia del microondas. Ensayos preliminares	228
2.2.5	Optimización de la etapa de oxidación	229
2.2.5.1	Efecto de la concentración K ₂ S ₂ O ₈ /HCl	230
2.2.5.2	Efecto de la potencia de microondas focalizado	232
2.2.6	Características analíticas	235
2.2.6.1	Rectas de calibrado y adición estándar	235
2.2.6.2	Sensibilidad	237
2.2.6.3	Precisión	238
2.2.6.4	Exactitud	239
2.2.6.5	Factor de preconcentración y eficacia de adsorción	240
2.2.7	Método propuesto	241
2.3	APLICACIÓN	242
3	Bibliografía	243

CAPÍTULO 5

Estudio de la distribución de As y Cr en la Ría de Arousa

1	Introducción	248
1.1	CONCEPTOS BÁSICOS DE OCEANOGRAFÍA	248
1.1.1	Composición del agua de mar	249
1.1.2	Parámetros fundamentales	253
1.1.2.1	Temperatura	253
1.1.2.2	Salinidad	254
1.1.2.3	Densidad	256
1.1.2.4	Luz	258

1.1.2.5 Gases disueltos.....	259
1.1.2.6 Tiempo de residencia.....	260
1.1.3 Circulación oceánica.....	261
1.1.4 Estuarios.....	262
1.2 ORIGEN Y CARACTERÍSTICAS DE LAS RÍAS GALLEGAS.....	263
1.2.1 Origen.....	264
1.2.2 Dinámica costera.....	266
1.2.2.1 Mareas.....	266
1.2.2.2 Vientos.....	268
1.2.2.3 Circulación residual.....	267
1.2.2.4 Afloramiento.....	268
1.2.3 Riqueza biológica.....	270
1.2.4 Impacto ambiental.....	270
1.3 RÍA DE AROUSA.....	271
2 Aplicación de los métodos desarrollados.....	274
2.1 MUESTREO.....	276
2.2 TRATAMIENTO DE DATOS.....	279
2.2.1 Distribución de As total.....	280
2.2.2 Distribución de As(III).....	281
2.2.3 Distribución de Cr total.....	284
2.2.4 Distribución de Cr(VI).....	288
2.2.5 Estudio quimiométrico.....	291
2.2.5.1 Pretraminiento de datos.....	291
2.2.5.2 Análisis factoria.....	292
2.2.5.3 Análisis de cluster.....	294
3 Bibliografía.....	297
CAPÍTULO 6	
Conclusiones.....	301
ANEXO	

CAPÍTULO 1

CAPÍTULO 1

Introducción preliminar

1 OBJETIVOS	4
2 METALES TRAZA.....	5
2.1 Cromo.....	6
2.1.1 Usos.....	6
2.1.2 Toxicidad.....	7
2.2 Arsénico.....	8
2.2.1 Usos.....	9
2.2.2 Toxicidad.....	9
3 ESPECIACIÓN	10
3.1 Especiación en agua de mar.....	13
3.1.1 Especiación de Cr.....	13
3.1.2 Especiación de As.....	15
4 USO DE QUELATOS EN LA ESPECIACIÓN DE METALES.....	16
5 BIBLIOGRAFÍA	20

1 Objetivos

El objetivo principal de esta tesis consiste en el desarrollo de metodología analítica para la especiación de metales en muestras de agua, haciendo uso de reacciones de formación de complejos quelatos y posterior determinación de los mismos por técnicas espectroscópicas atómicas.

El trabajo se ha centrado en dos metales pesados, Cr y As, cuya toxicidad depende de la forma química en la que se encuentran. En ambos casos las especies inorgánicas son más tóxicas que las orgánicas, por lo que se ha enfocado el estudio hacia las especies inorgánicas debido a su mayor peligrosidad como contaminante ambiental.

En primer lugar, se desarrollará un método para la especiación de Cr en agua dulce y agua de mar usando la formación del quelato volátil con la β -dicetona, 1,1,1-trifluoro-2,4-pentadiona (TFA). La elevada volatilidad que caracteriza al complejo $\text{Cr}(\text{TFA})_3$ permite la separación de las especies inorgánicas más habituales de Cr y por tanto su especiación.

En segundo lugar, se desarrollarán métodos de separación y preconcentración de As y Cr en muestras de agua de mar. La preconcentración se llevará a cabo a través de la reacción selectiva de As(III) y Cr(VI) con APDC y la retención de estos quelatos en un reactor anudado. Estos métodos se realizarán mediante la técnica de inyección en flujo acoplada a un equipo de Espectroscopía de Absorción Atómica con Atomización Electrotérmica, FI-ETAAS.

Finalmente, se realizará un estudio de la distribución de las especies inorgánicas de As y Cr en la Ría de Arousa, aplicando los métodos desarrollados.

Una vez expuestos los objetivos del proyecto nos centraremos en las palabras clave del mismo: metales traza, especiación y quelatos.

2 Metales traza

Junto con los compuestos policíclicos aromáticos, pesticidas, materiales radiactivos, los metales pesados constituyen uno de los contaminantes más peligrosos para el ser humano. A diferencia de los compuestos orgánicos resulta difícil eliminar los metales de los ecosistemas acuáticos de forma natural, por lo que se van acumulando en cada uno de los eslabones de la cadena trófica¹.

Las fuentes de contaminación pueden ser:

- Atmosféricas
- Descomposición geológica de los minerales que los contienen
- Procesos industriales o explotaciones mineras
- Uso de los metales o de sus compuestos
- Residuos sólidos urbanos
- Excreciones humanas y animales

A pesar de su peligrosidad, algunos metales son considerados esenciales para los organismos vivos cuando se encuentran en todos los tejidos de una familia zoológica y su concentración es muy similar entre individuos de distintas especies. Si las concentraciones son inferiores a los niveles normales aparecen síntomas debidos a la deficiencia, los cuales desaparecen cuando se recuperan los niveles. Por ejemplo, el hierro, Fe(II), ligado a la hemoglobina resulta fundamental para el transporte de oxígeno en sangre; el cobalto, Co(II), forma parte de la vitamina B₁₂, y otros como Cu, Mn, Zn y Co intervienen en diversas reacciones enzimáticas.

El cromo y el arsénico han sido objeto de estudio en esta tesis ya que ambos presentan diferente toxicidad según el estado de oxidación y niveles de concentración muy bajos en el agua de mar; por lo tanto requieren métodos selectivos y muy sensibles para su determinación.

2.1 Cromo

El cromo fue descubierto en 1797 por el francés Louis Nicolas Vauquelin cuando experimentaba con un mineral conocido como rojo plomo encontrado en Siberia, también llamado crocoita (PbCrO_4). Mezclando este mineral con HCl obtuvo el óxido de cromo (CrO_3), a partir del cual se puede aislar el Cr metálico calentándolo en un horno de carbón. A este nuevo elemento le llamó *chroma* (color en griego) por la variedad de colores que presentan sus compuestos: los cromatos son amarillos siendo el más conocido el PbCrO_4 , usado como pigmento; el dicromato potásico ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) es un sólido de color rojo; el óxido crómico (Cr_2O_3) es de color verde; mientras que el Cr es un metal blanco azulado brillante. En muchos minerales el Cr reemplaza a parte de Al y Fe dotándolos de colores característicos; también el color de muchas piedras preciosas se debe a la presencia de Cr.

El Cr ocupa el puesto 21 en abundancia en la corteza terrestre encontrándose fundamentalmente en forma de sales y óxidos. Existe en todos los estados de oxidación posibles a partir de $-II$ a $+VI$, pero los más importantes en estudios medioambientales son Cr(III) y Cr(VI) ².

2.1.1 Usos

Se trata de un metal muy duro y resistente químicamente, por ello su mayor aplicación se encuentra en las aleaciones con Fe, W y Co aumentando su dureza y resistencia a la corrosión. En los aceros inoxidable constituye un 10% o más de la composición final. El cromado, recubrimiento electrolítico con Cr, fue muy utilizado en la industria del automóvil para dar un acabado brillante, duro y resistente a las piezas, aunque actualmente ha sido sustituido por plástico. La cromita (FeCr_2O_4), el mineral más importante, se emplea como material refractario debido a su elevado punto de fusión, pequeña dilatación térmica y estabilidad de la estructura cristalina. Las sales se emplean como pigmentos, en el curtido de cuero, en insecticidas y fungicidas y como catalizadores^{3,4}.

2.1.2 Toxicidad

La toxicidad de este metal depende del estado de oxidación y de la biodisponibilidad del mismo. La especie trivalente, Cr(III), se considera un elemento esencial en el metabolismo de los hidratos de carbono, lípidos y proteínas, siendo su función principal potenciar la actividad de la insulina (hormona pancreática)^{5, 6}. De hecho, las dietas deficientes en cromo se asocian a enfermedades como la diabetes, así como a la aparición de problemas cardiovasculares. Es muy raro que aparezcan excesos de Cr debido a que su presencia en alimentos es muy reducida.

Por otra parte, los compuestos de Cr(VI) son tóxicos, siendo la dosis letal de unos pocos gramos. En niveles no letales, el Cr (VI) se considera carcinógeno debido a su mayor potencial de oxidación y la fácil permeabilidad a través de las membranas biológicas^{7, 8}. Además puede producir daño en la piel, el tracto respiratorio, en los riñones y afectar a la fertilidad⁴. La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda desde 1958 una concentración máxima de $50 \mu\text{g l}^{-1}$ Cr en el agua de consumo. Este valor ha sido revisado haciendo nuevos estudios sobre sus efectos en la salud, pero ha permanecido constante⁹ (Directiva de la Comunidad Europea 80/ 778/ EEC L229/ 20 D48).

Generalmente, los mamíferos pueden tolerar la ingestión de concentraciones de 100 a 200 veces el contenido corporal total de Cr porque la acidez estomacal favorece la reducción de Cr(VI) a Cr(III), disminuyendo la absorción gastrointestinal de la especie más tóxica^{10, 11}.

Las consecuencias por exposición a Cr(VI) en el puesto de trabajo en industrias donde producen o manipulan compuestos de Cr hexavalente se conocen desde hace 100 años, cuando se documentó el primer caso de cáncer de pulmón de un trabajador en la producción de pigmentos de Cr. La Directiva 98/24/CE obliga a los estados miembros de la Comunidad Europea a establecer límites de exposición profesionales. La transposición de esta Directiva al ordenamiento jurídico español

mediante el Real Decreto 374/2001 considera los límites de exposición publicados por el INSHT como los valores de referencia apropiados para los agentes químicos (**Tabla 1**)^{3, 12}.

Tabla 1. Límites de exposición profesional en España para los compuestos de Cr.

Compuesto/grupo		Valor límite * mg m ⁻³
Cromato cálcico		0,001
Cromato de zinc		0,01
Cromato de Cr(III)		0,05
Cromato de estroncio		0,0005
Cromato de sodio		0,05
Cromato potásico		0,05
Compuestos inorgánicos Cr(VI), excepto anteriores	solubles en agua	0,05
	insolubles en agua	0,01

*LEP Límites de exposición basados en promedios ponderados en 8 horas de jornada laboral

2.2 Arsénico

El arsénico es un metaloide ampliamente distribuido en la corteza terrestre ocupando 52º lugar en abundancia. Se encuentra en una gran variedad de minerales fundamentalmente en forma de sulfuros como: pirita arsenical (Fe[AsS]), rejalgar (As₄S₄) o cobaltina (Co[AsS]).

Fenómenos naturales como la degradación de los minerales, la actividad volcánica y biológica, junto con las aportaciones antropogénicas son las principales fuentes de As en el medioambiente. Un ejemplo de contaminación por una fuente de origen natural es la intoxicación masiva que tuvo lugar en Bangladesh por el consumo de agua de multitud de pozos construidos por las ONGs en áreas geológicamente ricas en As¹³, donde la concentración en aguas subterráneas (>2500 µg l⁻¹) supera los límites establecidos por la OMS (10 µg l⁻¹)¹⁴.

Algunos minerales de As se conocen desde tiempos remotos, 300 años antes de Cristo, aunque el As elemental no fue aislado hasta el siglo XIII por Alberto Magno. Reduciendo el trióxido de arsénico con carbón se obtiene el metaloide, aunque la mayoría del arsénico se comercializa como óxido.

2.2.1 Usos

Comúnmente la palabra arsénico se asocia directamente con veneno. No obstante, el As y sus compuestos tienen variedad de aplicaciones¹⁴⁻¹⁶:

- Preservante de la madera (arseniato de cobre y cromo), uso que representa, según algunas estimaciones, cerca del 70% del consumo mundial de arsénico.
- Semiconductor (arseniuro de galio) para circuitos integrados y también en la construcción de diodos láser y LED.
- Aleaciones con Pb para endurecerlo en la fabricación de perdigones.
- Insecticidas (arseniato de plomo) y herbicidas (arsenito de sodio)
- Pigmento en pinturas y fuegos artificiales (disulfuro de arsénico),
- Decolorante en la fabricación del vidrio (trióxido de arsénico) para eliminar el color verde que producen las impurezas de Fe.
- Con fines terapéuticos, sobre todo antiguamente. En la actualidad han sido reemplazados por antibióticos.

2.2.2 Toxicidad

El arsénico no se considera un elemento esencial aunque algunos de sus compuestos orgánicos se utilizan para estimular el crecimiento de raíces y como aditivo en piensos para animales. El grado de toxicidad de los compuestos de As está directamente relacionado con su movilidad en el agua y fluidos corporales, la cual depende de su especiación. Los compuestos inorgánicos son más tóxicos

que los orgánicos. Además la especie trivalente, As(III), presenta mayor toxicidad que la especie pentavalente, As(V)^{10, 14}. En orden decreciente de toxicidad, la secuencia quedaría del siguiente modo: Arsina >As(III) inorgánico >As(III) orgánico >As(V) inorgánico >As(V) orgánico >As elemental. Mientras que la arsenobetaína y la arsenocolina no se consideran tóxicos.

La absorción de As por inhalación depende de la solubilidad y del tamaño de las partículas. En España, la normativa del Instituto Nacional de Salud e Higiene en el Trabajo (INHST)¹² establece como máximo 0,01 mg m⁻³ As elemental y compuestos de As en el lugar de trabajo debido a que puede causar cáncer de pulmón. El As inorgánico se absorbe rápidamente por el tracto gastrointestinal y es transportado hacia el hígado donde por metilación podrían producirse monometilarsénico (MMA) y dimetilarsénico (DMA). Sin embargo, una fracción de As inorgánico podría acumularse en el pelo, las uñas y la piel. Las especies orgánicas e inorgánicas de As se eliminan por la excreción de orina¹⁵. No obstante, la ingesta de grandes cantidad de As(III) puede ocasionar un envenenamiento rápido y la muerte. El nivel de As inorgánico en agua potable recomendado en las directrices de la Organización Mundial de la Salud (OMS) es de 10 µg l⁻¹. A partir de los estudios epidemiológicos realizados en zonas con suelos ricos en As, como el caso comentado anteriormente de Bangladesh, se ha observado la enfermedad conocida como “*Pies Negros*”, cuando la ingesta diaria de As inorgánico está entre 10 y 50 µg kg⁻¹ de peso corporal. Esta enfermedad se manifiesta con problemas vasculares, que derivan en algunos casos en necrosis y gangrena en las manos y los pies, de ahí su nombre¹⁷.

3 Especiación

La determinación de la concentración total de un metal no es suficiente para evaluar el impacto ambiental, ya que la reactividad, toxicidad, biodisponibilidad y distribución depende de la forma química en la que se encuentre el metal. De ahí,

la importancia de disponer de métodos adecuados para la determinación de las distintas formas químicas de cada elemento necesarios para realizar los estudios de especiación^{18, 19}.

Los términos especie y especiación originalmente ha sido tomados de la biología. Su uso en el campo de la química ha supuesto cierta controversia por los distintos significados que se le han asociado²⁰. Para solucionar este conflicto la IUPAC ha propuesto las siguientes definiciones^{21, 22}.

- ✓ *Especie química*. Forma específica de un elemento definido como composición isotópica, estado de oxidación y/o estructura molecular o compleja.
- ✓ *Análisis de especiación*. Actividades analíticas de identificación y/o cuantificación individual de una o más especies químicas en una muestra.
- ✓ *Especiación*. Distribución de un elemento entre las especies químicas definidas en un sistema.

Los análisis de especiación requieren técnicas de detección altamente sensibles que al mismo tiempo proporcionen información sobre la forma química o la estructura en la que se presentan²¹. Sin embargo, las técnicas más usadas para la identificación de formas y estructuras en análisis orgánicos no son adecuadas para la especiación debido a su baja sensibilidad. Por otro lado, los detectores de Espectroscopía Atómica son poderosas herramientas con límites de detección muy bajos para la mayoría de los metales pero no proporcionan información sobre la forma química. La solución a este problema radica en la combinación de varias técnicas analíticas, acoplando una técnica de separación y un detector altamente sensible para el elemento objeto de estudio.

La mayoría de los trabajos estudian los diferentes estados de oxidación y solamente algunos se centran en el grado de complejación o determinación de compuestos orgánicos.

El mayor problema en los análisis de especiación es mantener inalterada la distribución de las especies en una muestra durante el muestreo, almacenamiento y, sobre todo, durante el análisis. La determinación selectiva de cada una de las especies requiere generalmente varias etapas en el tratamiento como: extracción, separación y reacciones de derivatización²³. La posibilidad de alterar la especiación y el riesgo de contaminación en cada uno de estos pasos, así como los errores sistemáticos que se cometen tanto durante el tratamiento como en la detección, deben tenerse en cuenta al evaluar la fiabilidad de los resultados obtenidos. Una solución a esta problemática serían las simulaciones por ordenador basándose en modelos de predicción. Conociendo la concentración total y una serie de parámetros físico-químicos, así como constantes de equilibrio químico y redox, se podría deducir la concentración de cada una de las especies. Sin embargo, los modelos predicción todavía no pueden aplicarse en muchos casos ya que no se dispone del número suficiente de constantes termodinámicas^{24, 25}.

Por lo tanto, resulta imprescindible un buen control de calidad durante todo el proceso de análisis. Las herramientas disponibles que permiten el seguimiento de la calidad de los análisis son, entre otras:

- Uso de protocolos validados para el muestreo, almacenamiento de las muestras y análisis.
- Control de la estabilidad de los reactivos y patrones de calibración.
- Control de blancos
- Control del rendimiento instrumental
- Uso de materiales de referencia certificados.
- Participación en programas de comparación entre laboratorios.

Actualmente, los materiales de referencia certificados (CRM) disponibles para los estudios de especiación son insuficientes. Por tanto, la obtención de nuevos

CRMs es uno de los objetivos prioritarios para los grupos de investigación que se dedican a los estudios de especiación²⁶.

3.1 Especiación en agua de mar

La complejidad de los ecosistemas marinos influye considerablemente sobre la distribución de las especies químicas. Para la realización de un estudio de especiación deben tenerse en cuenta multitud de factores de entre los que destacan: salinidad, temperatura, pH, potencial redox, materia orgánica, los organismos vivos y además, las posibles alteraciones debido a la actividad humana²⁷.

En este proyecto se ha restringido el estudio de la especiación de metales traza en la fase acuosa, las muestras de agua de mar son filtradas con filtros de 45 µm de diámetro de poro, con el fin de eliminar todas las partículas en suspensión; tal como establecen los protocolos de análisis de agua de mar²⁸. A la complejidad del medio debemos sumarle los bajos niveles de concentración en los que se encuentran normalmente los metales en el agua de mar.

3.1.1 Especiación de Cr

La metodología empleada en los estudios de especiación de Cr es muy diversa: preconcentración en distintos tipos de columnas; reacciones químicas como formación de complejos o oxidación-reducción; extracción; precipitación y coprecipitación²⁹. Incluso siguiendo estrategias diferentes: determinación de la concentración de Cr total y de una de las especies Cr(III) o Cr(VI) con el mismo método³⁰⁻³²; determinar cada una de las especies con métodos diferentes³³; o determinar Cr(III) y Cr(VI) con el mismo método³⁴⁻³⁷.

Cranston et al.³⁰ han empleado la coprecipitación con $\text{Fe}(\text{OH})_3$ para la especiación de Cr mediante FAAS en muestras de agua de mar. Solamente el Cr(III) se

precipita junto a $\text{Fe}(\text{OH})_3$, posteriormente el $\text{Cr}(\text{VI})$ se reduce usando $\text{Fe}(\text{OH})_2$ para la determinación de Cr total. La coprecipitación se realiza inmediatamente después de la toma de muestra a bordo del barco para minimizar los posibles problemas durante el almacenamiento de la muestra.

La complejación con quinolin-8-ol se ha utilizado para la preconcentración y separación de $\text{Cr}(\text{III})$ en agua de mar en una columna empaquetada con una resina de poliestireno-divinilbenceno. La concentración de Cr total se obtiene tras la reducción de $\text{Cr}(\text{VI})$ con hidroxilamina. Las medidas se realizan en un equipo de ETAAS³⁸.

La extracción sólido-líquido permite la automatización del análisis de especiación mediante técnicas de inyección en flujo (FI). Rao et al.³⁹ proponen un método FI-FAAS para la determinación de $\text{Cr}(\text{III})$ y $\text{Cr}(\text{VI})$ mediante la formación selectiva del quelato con dietilditiocarbamato controlando el pH y la preconcentración en una columna C_{18} -silica gel. Sperling et al.³¹ han publicado un trabajo similar basado en la separación y preconcentración mediante la retención en una columna C_{18} -silica gel usando NaDDTC como agente complejante. Se distingue del método anterior en que la concentración de $\text{Cr}(\text{III})$ se calcula por diferencia entre las concentraciones de $\text{Cr}(\text{VI})$ y Cr total. Para la determinación de Cr total se sigue el mismo procedimiento pero con la oxidación previa de $\text{Cr}(\text{III})$ a $\text{Cr}(\text{VI})$ usando $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8/\text{Ag}^+$.

La bioadsorción de metales por sustratos biológicos, eritrocitos, bacterias, algas, levaduras, hongos y plantas ha sido aplicada a la recuperación de metales preciosos, remediación de lugares contaminados y preconcentración de metales traza. Bag et al.⁴⁰ han propuesto un método de especiación de Cr basado en la retención selectiva de $\text{Cr}(\text{III})$ en *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizada en una columna rellena de sepiolita. Siguiendo el mismo procedimiento se determina la concentración de Cr total después de la reducción de $\text{Cr}(\text{VI})$. Otro ejemplo de especiación de Cr por bioadsorción consiste en la retención selectiva en *Lemma*

*minor*⁴¹. A pH 1 el Cr(III) queda atrapado por la biomasa separada por centrifugación del líquido sobrenadante donde permanece el Cr(VI) disuelto. Al sobrenadante se le añade otra porción de *Lemma minor* y se ajusta el pH a 5, logrando así la adsorción de Cr(VI). Los residuos sólidos obtenidos en cada etapa son introducidos en forma de suspensión en un equipo ETAAS para la determinación de cada una de las especies de Cr.

3.1.2 Especiación de As

Existen numerosos métodos para la especiación de As, la mayoría de ellos basados en técnicas de separación cromatográfica acopladas a detectores sensibles y selectivos como AAS, HG-AAS, ICP-AES e ICP-MS^{42, 43}. Algunos de los cuales han sido diseñados para la determinación de especies inorgánicas, mientras que con otros se pueden determinar tanto especies inorgánicas como orgánicas.

Ya en 1976, Haywood et al.⁴⁴ propusieron un método espectrofotométrico para la especiación de As en agua de mar. La determinación selectiva de As(V) es posible mediante la extracción selectiva del complejo APDC-As(III) en cloroformo. Aunque teóricamente en agua de mar oxigenada debería predominar la especie pentavalente, As(V), se han encontrado cantidades apreciables de As(III) en las muestras analizadas con este método. La presencia de As(III) probablemente este asociada a la existencia de fito- y zooplancton capaz de reducir el arsénico⁴⁵.

Dada la diferencia en el comportamiento entre As(III) y As(V) en el proceso de generación la arsina se puede lograr la especiación de As mediante HG-AAS controlando el pH⁴⁶. Sin embargo en ciertas condiciones el As(III) podría transformarse en As(V) alterando la relación As(III):As(V) como en el caso del agua de mar acidificada⁴⁷.

En algunos casos las especies de As se encuentran en concentraciones muy bajas por lo que se requieren técnicas altamente sensibles para su detección o procesos de preconcentración. El acoplamiento de un sistema de inyección en flujo con un equipo ETAAS facilita la separación y preconcentración evitando el riesgo de contaminación porque tiene lugar en un sistema cerrado, siendo posible la obtención de señales de blanco muy bajas y reproducibles⁴³. Algunos de estos métodos de preconcentración se fundamentan en la formación selectiva de un complejo en un sistema “on-line”, como por ejemplo la retención en una columna C₁₈ del complejo As formado con NaDDC⁴⁸ o con amonio dietilditiofosfato⁴⁹ (DDTP) para su determinación mediante FI-ETAAS.

4 Uso de quelatos en la especiación de metales

Un complejo se define como una especie formada por asociación de 2 o más especies capaces de existir independientemente. Se conocen como complejo metálico cuando la especie más simple es un metal, el cual generalmente ocupa la posición central. Algunos ligandos se unen al metal por más de un donador formando un anillo heterocíclico. Este tipo de anillo recibe el nombre especial de quelato, palabra que procede del griego *chele*, pinza de cangrejo^{50, 51}.

Unos de los compuestos orgánicos más estudiados que forman quelatos son las β -dicetonas, dada su elevada volatilidad^{52, 53}. Se han empleado el análisis termogravimétricos para la comparación de la volatilidad y estabilidad térmica de los distintos complejos metal- β -dicetonas^{54, 55}. Los factores que afectan a la volatilidad son el tamaño, la forma y la polaridad de la molécula. A su vez la forma que puede ser esférica o plana dependiendo del estado de oxidación del metal. Los quelatos esféricos, generalmente son más volátiles que los planos, los cuales están más empaquetados cuando están en estado sólido formando capas⁵⁶. Además, la estabilidad de los quelatos también depende del metal⁵⁷.

Existen distintas β -dicetonas según la naturaleza de los sustituyentes R y R' (**Tabla 2**), cuya fórmula genérica es:

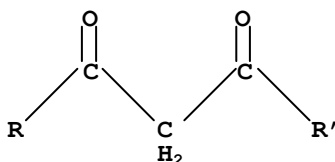


Tabla 2. Algunas de las β -dicetonas más conocidas

Nombre común	Nombre IUPAC	R	R'
Acetilacetona (AA)	2,4-Pentadiona	CH ₃	CH ₃
Acetiltrifluoroacetona (TFA)	1,1,1-Trifluoro-2,4-Pentadiona	CH ₃	CF ₃
Benzoilacetona (BA)	1-fenil-1,3-butadiona	C ₆ H ₆	CH ₃
Benzoiltrifluoroacetona (BTA)	1-fenil-4,4,4-trifluoro-1,3-butadiona	C ₆ H ₆	CF ₃
2-Furoiltrifluoroacetona (FTA)	1-(2-furoil)-4,4,4-trifluoro-1,3-butadiona	C ₄ H ₄ O	CF ₃
2-Thenoiltrifluoroacetona (TTA)	1-(2-tenoil)-4,4,4-trifluoro-1,3-butadiona	C ₄ H ₄ S	CF ₃
Hexafluoroacetilacetona (HFAA)	1,1,1,5,5,5-Hexafluoro-2,4-Pentadiona	CF ₃	CF ₃
Dipivaloilmetano (DPM)	2,2,6,6-tetrametil-3,5-heptadiona	C ₄ H ₉	C ₄ H ₉
Trifluoroacetilpivaloilmetano (TDH)	1,1,1-Trifluoro-5,5-dimetilhexan-2,4-pentadiona	C ₄ H ₉	CF ₃

Otro grupo de compuestos estudiados son las β -tioacetonas y las β -cetoaminas, las cuales forman quelatos di y tetradentados con metales divalente como Cu(II) y Ni(II). Estos quelatos son más estables aunque menos volátiles que las β -dicetonas⁵⁸⁻⁶⁰.

También los ditiocarbamatos⁶¹⁻⁶⁴, dialquilditiofosfatos⁶⁵ y oxinas⁶⁶ pueden formar quelatos. Estos compuestos suelen encontrarse ligados a material de relleno en columnas, las cuales se utilizan en métodos de preconcentración y separación de elementos traza. Algunos ejemplos de estos compuestos son: 8-quinolinol, amonio pirrodilinditiocarbamato (APDC), dietilamonio ditiocarbamato (DDTC), sodio dietilditiocarbamato (NaDDTC) y ditizona⁶⁷.

La generación de vapor de distintos metales se considera en la actualidad el método de introducción de muestra más eficaz en Espectroscopía Atómica. Sus principales ventajas son:

- Separación del analito de la matriz
- Mayor eficiencia en la introducción de la muestra en comparación con la nebulización neumática convencional
- Obtención de un vapor homogéneo
- Alta sensibilidad
- Reducción de las posibles interferencias

Entre las distintas formas de introducción de muestra en fase gaseosa se encuentra: la generación de hidruros (HG), el vapor frío (CV) para el Hg; ésteres de B y carbonilos de Ni. La limitación de estas técnicas es su reducida aplicabilidad restringida a unos pocos elementos. La generación de hidruros puede aplicarse a: As, Se, Cd, Sn, Sb, Te, Pb, Bi^{68, 69}.

Una nueva propuesta para la introducción de muestra en fase gas en AAS ha surgido pensando en la posibilidad de aprovechar la elevada volatilidad y estabilidad de los quelatos^{68, 70-74}. Para ello se han tomado como referencia los numerosos estudios que se han realizado desde los años 50, sobre la formación, estabilidad y separación cromatográfica de los quelatos formados con los metales de transición y las tierras raras. En el capítulo 6 del libro *"Hydride Generation"*

*Atomic Absorption Spectrometry*⁷⁵ puede encontrarse una recopilación de los trabajos que emplean los quelatos volátiles para la determinación de metales especificando el agente complejante y la técnica analítica utilizada.

La formación de quelatos se ha utilizado también en los estudios de especiación, sobre todo en métodos de separación y preconcentración. La eficacia del método de especiación depende fundamentalmente de la selectividad del agente complejante por una de las especies y el control de las condiciones del medio en el que tendrá lugar la reacción de formación.

5 Bibliografía

- [1]. Fowler, B. A. In *Biological and Environmental Effects of Arsenic*, Amsterdam, 1983; Elsevier: Amsterdam, 1983.
- [2]. Metzke, D.; Jakubowski, N.; Klockow, D., Speciation of Chromium in Environment and Food. In *Handbook of Elemental Speciation II. Species in the Environment, Food, Medicine and Occupational Health*, Cornelis, R.; Caruso, J.; Crews, H.; Heumann, K., Eds. John Wiley and Sons: Chichester, **2005**; pp 120-135.
- [3]. Darrie, G., The Importance of Chromium in Occupational Health. In *Trace Element Speciation for Environmental, Food and Health*, Ebdon, L. P., L.; Cornelis, R.; Crews, H.; Donard, O. F.; Quevauviller, P., Ed. Royal Society of Chemistry: Cambridge, **2001**; pp 315-330.
- [4]. Hoet, P., Speciation of Chromium in Occupational Exposure and Clinical Aspects. In *Handbook of Elemental Speciation II. Species in the Environment, Food, Medicine and Occupational Health*, Cornelis, R.; Caruso, J.; Crews, H.; Heumann, K., Eds. John Wiley and Sons: Chichester, **2005**; pp 136-157.
- [5]. Fytianos, K.; Fachantidis, P., Cr(III) and Cr(VI) Speciation in Environmental Samples. *Toxicological and Environmental Chemistry* **1997**, *64*, 197-202.
- [6]. Huang, Y.; Chuang, I.; Pan, C.; Hsieh, C.; Shi, T.; Lin, T., Determination of Chromium in Whole Blood and Urine by Graphite Furnace AAS. *Atomic Spectroscopy* **2000**, *21*, (1), 10-16.
- [7]. Balarama, M. V.; Chandrasekaran, K.; Rao, S. V.; Karunasagar, D.; Arunachalam, J., Speciation of Cr(III) and Cr(VI) in waters using immobilized moss and determination by ICP-MS and FAAS. *Talanta* **2005**, *65*, (1), 135-143.
- [8]. Fung, Y.; Sham, W., Determination of Chromium in River Water Samples by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. *Analyst* **1994**, *119*, 1029-1032.
- [9]. Quevauviller, P., *Method Performance Studies for Speciation Analysis*. The Royal Society of Chemistry: Cambridge, **1998**.
- [10]. Förstner, U.; Wittmann, G. T. W., *Metal Pollution in Aquatic Environment*. 2^o ed.; Springer Verlag: Berlin, **1983**.
- [11]. Piscator, M., The Dependence of Toxic Reactions on the Chemical Species of Elements. In *The Importance of Chemical Speciation in Environmental Processes*, Bernhard, M.; Brinckman, F. E.; Sadler, P. J., Eds. Springer-Verlag: Berlin, **1986**; pp 59-70.
- [12]. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Límites de exposición profesional para agentes químicos en España. (<http://empleo.mtas.es/insht/practice/vlas.htm>). (16/01/2007)
- [13]. Fodor, P., Arsenic Speciation in the Environment. In *Trace Element Speciation for Environmental, Food and Health*, Ebdon, L. P., L.; Cornelis, R.; Crews, H.; Donard, O. F.; Quevauviller, P., Ed. Royal Society of Chemistry: Cambridge, **2001**; pp 196-210.
- [14]. Prohaska, T.; Stingeder, G., Arsenic and Arsenic Species in Environment and Human Nutrition. In *Handbook of Elemental Speciation II. Species in the Environment, Food, Medicine and Occupational Health*, Cornelis, R.; Caruso, J.; Crews, H.; Heumann, K., Eds. John Wiley and Sons: Chichester, **2005**; pp 69-85.
- [15]. Gómez-Caminero, A., *Arsenic and arsenic compounds*. 2^a ed.; World Health Organization: Ginebra, **2001**; Vol. 224.
- [16]. Sandhu, S. S., Direct Spectrophotometric Method for the Determination of Hydrochloric Acid-Release Arsenic in Sediments and Soils. *Analyst* **1981**, *106*, 311-315.
- [17]. Larsen, E. H.; Berg, T., Trace Element Speciation International Food Legislation-A Codex Alimentarius Position Paper on Arsenic as a Contaminant. In *Trace Element Speciation for*

- Environmental, Food and Health*, Ebdon, L. P., L.; Cornelis, R.; Crews, H.; Donard, O. F.; Quevauviller, P., Ed. Royal Society of Chemistry: Cambridge, **2001**; pp 251-260.
- [18]. Tessier, A.; Turner, D. R., *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. John Wiley and Sons: Chichester, **1995**; Vol. 3.
- [19]. Quevauviller, P., Foreword. In *Trace Element Speciation for Environmental, Food and Health*, Ebdon, L. P., L.; Cornelis, R.; Crews, H.; Donard, O. F.; Quevauviller, P., Ed. Royal Society of Chemistry: Cambridge, **2001**.
- [20]. Bernhand, M.; Brinckman, F. E.; Irgolic, J., Why Speciation? In *The Importance of Chemical Speciation in Environmental Processes*, Bernhand, M.; Brinckman, F. E.; Sadler, P. J., Eds. Springer-Verlag: Berlin, **1986**; pp 10-14.
- [21]. Cornelis, R., *Handbook of elemental speciation. Techniques and methodology*. John Wiley and Sons Ltd.:Chichester **2003**.
- [22]. Caruso, J. A.; Sutton, K. L.; Ackley, K. L., *Elemental Speciation: New Approaches for Trace Element Analysis*. Elsevier: Amsterdam, **2000**; Vol. 33.
- [23]. Rosenberg, P.; Ariese, F., Quality Control in Speciation Analysis. In *Trace Element Speciation for Environmental, Food and Health*, Ebdon, L. P., L.; Cornelis, R.; Crews, H.; Donard, O. F.; Quevauviller, P., Ed. Royal Society of Chemistry: Cambridge, **2001**; pp 17-50.
- [24]. Kester, D. R., Equilibrium Models in Seawater: Applications and Limitations. In *The Importance of Chemical Speciation in Environmental Processes*, Bernhand, M.; Brinckman, F. E.; Sadler, P. J., Eds. Springer-Verlag: Berlin, **1986**; pp 337-363.
- [25]. Campanella, L.; Pyrzynska, K.; Trojanowicz, M., Chemical speciation by flow-injection analysis. A review. *Talanta* **1996**, 43, 825-838.
- [26]. Quevauviller, P., Certified Reference Materials; a Tool for Quality Control of Elemental Speciation Analysis. In *Elemental Speciation. New Approches for Trace Element Analysis*, Caruso, J. A.; Sutton, K. L.; Ackley, K. L., Eds. Elsevier: Cambridge, **2000**; Vol. 23, pp 531-539.
- [27]. Kester, D. R.; Andreae, M. D.; Bernhand, M.; Branica, M.; Calmano, W.; Duinker, J. C.; George, S. G.; Lund, W.; Luoma, S. N.; Traimer, B.; Velapoldi, R. A.; Vestal, M. L., Chemical Species in Marine and Estuarine Systems. In *The Importance of Chemical Speciation in Environmental Processes*, Bernhand, M.; Brinckman, F. E.; Sadler, P. J., Eds. Springer-Verlag: Berlin, **1986**; pp 275-299.
- [28]. Grasshoff, K.; Ehrhardt, M.; Kremling, K., *Methods of Seawater Analysis*. 2^a ed.; Chemie-Verlag: Weinheim, **1983**.
- [29]. Marques, M. J.; Salvador, A.; Morales-Rubio, A.; De la Guardia, M., Chromium Speciation in Liquid Matrices: a Survey of the Literature. *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, 367, 601-613.
- [30]. Cranston, R. E.; Murray, J. W., The Determination of Chromium Species in Natural Waters. *Anal. Chim. Acta* **1978**, 99, 275-282.
- [31]. Sperling, M.; Yin, X.; Welz, B., Differential Determination of Chromium(VI) and Total Chromium in Natural Waters using Flow Injection On-line Separation and Preconcentration Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. *Analyst* **1992**, 117, 629-635.
- [32]. Manzoori, J. L.; Sorouraddin, M. H.; Shemirani, F., Chromium Speciation by a Surfactant-coated Alumina Microcolumn using Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. *Talanta* **1995**, 42, 1151-1155.
- [33]. Oktavec, D.; Lehotay, J.; Hornackova, E., Determination of Cr(III) and Cr(VI) in Underground Water and Wastewater by Flame and Graphite Furnace AAS. *Atomic Spectroscopy* **1995**, 92-96.
- [34]. Hiraide, M.; Mizuike, A., Separation and determination of chromium(VI) anions and chromium(III) associated with negatively charged colloids in river water by sorption on DEAE-Sephadex A-25. *Fresenius Z. Anal. Chem.* **1989**, 335, 924-926.

- [35]. Johnson, C. A., Rapid ion-exchange technique for the separation and preconcentration of chromium(VI) and chromium(III) in fresh waters. *Anal. Chim. Acta* **1990**, 238, 273-278.
- [36]. Sperling, M.; Xu, S.; Welz, B., Determination of Chromium(III) and Cr(VI) in Water Using Flow Injection On-line Preconcentration with Selective Adsorption on Activated Alumina and Flame Atomic Absorption Spectrometric Detection. *Anal. Chem.* **1992**, 64, 3101-3108.
- [37]. Marques, M. J.; Morales-Rubio, A.; Salvador, A.; De la Guardia, M., Chromium Speciation Using Activated Alumina Microcolumns and Sequential Injection Analysis-Flame Atomic Absorption Spectrometry. *Talanta* **2001**, 53, 1229-1239.
- [38]. Isshiki, K.; Sohrin, Y.; Karatani, H.; Narayama, E., Preconcentration of Chromium(III) and Chromium(VI) in Seawater by Complexation with Quinolin-8-ol and Adsorption on Macroporous Resin. *Anal. Chim. Acta* **1989**, 224, 55-64.
- [39]. Rao, T. P.; Karthikeyan, S.; Vijayalekshmy, B.; Iyer, C. S. P., Speciative determination of chromium(VI) and chromium(III) using flow-injection on-line preconcentration and flame atomic-absorption spectrometric detection. *Anal. Chim. Acta* **1998**, 369, 69-77.
- [40]. Bag, H.; Türker, A. R.; Lale, M.; Tunçeli, A., Separation and speciation of Cr(III) and Cr(VI) with *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on sepiolite and determination of both species in water by FAAS. *Talanta* **2000**, 51, 895-902.
- [41]. Zhu, G.; Li, S., Separation and preconcentration of chromium species by selective absorption on Lemna minor and determination by slurry atomisation electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analyst* **2001**, 126, 1453-1455.
- [42]. Taboada-de la Calzada, A.; Villa-Lojo, M. C.; Beceiro-Gomez, E.; Alonso-Rodriguez, E.; Prada-Rodriguez, D., Determination of arsenic species in environmental samples: use of the alga *Chlorella vulgaris* for arsenic(III) retention. *Trac* **1998**, 17, (3), 167-175.
- [43]. Burguera, M.; Burguera, J. L., Analytical methodology for speciation of arsenic in environmental and biological samples. *Talanta* **1997**, 44, (9), 1581-1604.
- [44]. Haywood, M. G.; Riley, J. P., The Spectrophotometric Determination of Arsenic in Seawater, Potable Water and Effluents. *Anal. Chim. Acta* **1976**, 85, 219-230.
- [45]. Neff, J. M., Ecotoxicology of arsenic in the marine environment. *Environmental Toxicology and Chemistry* **1997**, 16, (5), 917-927.
- [46]. Howard, A. G.; Arbad-Zovar, H. H., Determination of Inorganic As(III) and Arsenic(V), Methylarsenic and Dimethylarsenic Species by Selective Hydride Evolution Atomic Absorption Spectroscopy. *Analyst* **1981**, 106, 213-220.
- [47]. Cabon, J. Y.; Cabon, N., Determination of arsenic species in seawater by flow injection hydride generation in situ collection followed by graphite furnace atomic furnace atomic absorption spectrometry. Stability of As(III). *Anal. Chim. Acta* **2000**, 418, 19-31.
- [48]. Sperling, M.; Yin, X. F.; Welz, B., Differential Determination of Arsenic(III) and Total Arsenic Using Flow-Injection Online Separation and Preconcentration for Graphite-Furnace Atomic-Absorption Spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B* **1991**, 46, (14), 1789-1801.
- [49]. Pozebon, D.; Dressler, V. L.; Gomes Neto, J. A.; Curtius, A. J., Determination of arsenic(III) and arsenic(V) by electrothermal atomic absorption spectrometry after complexation and sorption on a C-18 bonded silica column. *Talanta* **1998**, 45, (6), 1167-1175.

- [50]. Dwyer, F. P.; Mellor, D. P., *Chelating Agents and Metal Chelates*. Academic Press: New York, **1964**.
- [51]. Flaschka, H. A.; Barnard, A. J., *Chelates in Analytical Chemistry. A Collection of Monographs*. In Marcel Dekker: New York, **1967**; Vol. 1.
- [52]. Berg, E. W.; Hartlage, F. R., Fractional Sublimation of Various Metal Acetylacetonates. *Anal. Chim. Acta* **1965**, 33, 173-181.
- [53]. Stary, J., *The Solvent Extraction of Metal Chelates*. Pergamon Press: London, **1964**.
- [54]. Eisentraut, K. J.; Sievers, R. E., Thermogravimetric Studies of Metal β -diketonates. *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1967**, 29, 1931-1936.
- [55]. Fahlam, B. D.; Barron, A. R., Substituent Effects on the Volatility of Metal β -diketonates. *Adv. Mater. Opt. Electron.* **2000**, 10, 223-232.
- [56]. Berg, E. W.; Truemper, J. T., A study of the volatile characteristics of various metal beta-diketone chelates. *J. Phys. Chem.* **1960**, 64, 487-490.
- [57]. Charles, R. G.; Pawlikowski, M. A., Comparative Heat Stabilities of Some Metal Acetylacetonate Chelates. *J. Phys. Chem.* **1958**, 62, 441-444.
- [58]. Belcher, R.; Martin, R. J.; Stephen, W. I.; Henderson, D. E.; Kamalizad, A.; Uden, P. C., Gas Chromatography of Divalent Transition Metal Chelates. *Anal. Chem.* **1973**, 45, (7), 1197-1203.
- [59]. Kutal, C., Volatile metal chelate complexes. *Journal of Chemical Education* **1975**, 52, (5), 319-322.
- [60]. Dilli, S.; Patsalides, E., Gas Chromatography of Some Oxovanadium(VI) Tetradentate β -diketoaminas Chelates. *J. Chromatogr.* **1977**, 130, 251-259.
- [61]. Wood, B. C.; Skogerboe, R. K., Mass Spectrometric Determination of Diethylthiocarbamatos. *Appl. Spectrosc.* **1973**, 27, (1), 10-12.
- [62]. Alesova, A. S.; Shevchink, I. A., Thermal Stability of Sulfur-containing Chelates And Improvement of the Sensitivity of Cu, Pb and Cd Determination by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **1997**, 52, 950-952.
- [63]. Yu, J. J.; Wai, C. M., Chromatographic Separation of As Species with Sodium Bis(Trifluoroethyl)Dithiocarbamate. *Anal. Chem.* **1991**, 63, 842-845.
- [64]. Atanasova, D.; Stefanova, V.; Russeva, E., Preconcentration of Trace Elements on a Support Impregnated with Sodium Diethyldithiocarbamate Prior to their Determination by Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry. *Talanta* **1998**, 45, 857-864.
- [65]. Ma, R.; Adams, F., Flow Injection Analysis Sorbent Extraction with Dialkyldithiophosphates as Chelating Agent for the Determination of Cd, Cu and Pb by Flame Atomic Absorption Spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B* **1996**, 51, 1917-1923.
- [66]. Hilderbrand, D. C.; Pickett, E. E., Determination of Volatility of Metal Chelates by Atomic Absorption Absorption. *Anal. Chem.* **1975**, 47, (3), 424-427.
- [67]. Boniforti, R.; Ferraroli, R.; Frigieri, P.; Heltai, D.; Queirazza, G., Intercomparison of Five Methods for the Determination of Trace Metals in Seawater. *Anal. Chim. Acta* **1984**, 162, 33-46.

- [68]. Castillo, J. R.; Mir, J. M.; Bendicho, C.; Laborda, F., Study of a System for Introducing Metal Chelate Complexes in AAS. Effect of Chelate Stability. *Fresenius Z. Anal. Chem.* **1988**, 332, 37-40.
- [69]. Welz, B.; Sperling, M., *Atomic Absorption Spectrometry*. 3^a ed.; Wiley-VCH: Weinheim, **1999**.
- [70]. Castillo, J. R.; Garcia, E.; Delfa, J.; Mir, J. M.; Bendicho, C., Determination of Chromium, Cobalt and Iron by Flame-Atomic Absorption Spectrophometry using Volatilization of Metal Trifluoroacetyl Acetonates. *Microchem. J.* **1990**, 42, 103-109.
- [71]. An, Y.; Willie, S. N.; Sturgeon, R. E., In situ concentration of volatile chromium β -diketonate for the determination by GFAAS. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1992**, 344, 64-65.
- [72]. Castillo, J. R.; Mir, J. M.; Bendicho, C., Determination of Chromium by AAS using Volatile β -Diketonate Complexes. *Fresenius Z. Anal. Chem.* **1987**, 328, 56-60.
- [73]. Jimenez, M. S.; Mir, J. M.; Castillo, J. R., On-line Thermospray Continuous Volatilization of Cobalt, Alumium and Chromium Volatile Chelates and Determination by Heated Quartz Tube Atomic Absorption Spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **1993**, 8, 665-669.
- [74]. Jimenez, M. S.; Castillo, J. R., Tandem Concentration of Co by On-line Ion Exchange and Gas Phase Chelates Generated by Marging-Zones. Flow Injection Analysis with Electrothermal Absorption Spectrometric Determination. *J. Anal. At. Spectrom.* **1997**, 12, 1397-1402.
- [75]. Declina, J.; Tsalev, D. L., Other Volatile Compounds. In *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*, Declina, J.; Tsalev, D. L., Eds. Wiley: Chischester, **1995**; Vol. 30, pp 123-128.

CAPÍTULO 2

CAPÍTULO 2

Determinación selectiva de Cr(VI) en muestras de agua por ETAAS mediante la formación del complejo Cr(TFA)₃

1 MUESTRAS DE AGUA DULCE	29
1.1 INTRODUCCIÓN	29
1.1.1 Elección del agente quelatante.....	29
1.1.2 Espectroscopía de absorción atómica.....	31
1.1.2.1 Fuentes de radiación	32
1.1.2.2 Espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotérmica	33
1.1.2.2.1 Programa de temperaturas de la cámara de grafito	34
1.1.2.2.2 Interferencias.....	36
1.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL	40
1.2.1 Equipamiento	41
1.2.1.1 Aparatos	41
1.2.1.2 Reactivos	41
1.2.1.3 Limpieza del material	42
1.2.2 Formación del complejo. Ensayos previos	42
1.2.2.1 Disolución tampón. pH	43
1.2.2.2 Potencia del microondas y del tiempo de calentamiento	44
1.2.3 Optimización del programa de temperaturas de la cámara de grafito	45
1.2.4 Formación del complejo. Optimización	47
1.2.4.1 Influencia del pH de la disolución tampón	47
1.2.4.2 Optimización de la concentración de 1,1,1-trifluoro-2,4-pentadiona.....	49
1.2.4.3 Estabilidad del complejo.....	50
1.2.5 Determinación en ETAAS. Optimización.....	51
1.2.5.1 Estudio del modificador de matriz	51
1.2.6 Características analíticas del método	52
1.2.6.1 Rectas de calibrado y adición.....	52
1.2.6.2 Sensibilidad	54

1.2.6.3	Precisión.....	55
1.2.6.4	Exactitud.....	56
1.2.7	Método propuesto.....	58
1.3	APLICACIÓN	58
2	MUESTRAS DE AGUA DE MAR.....	60
2.1	INTRODUCCIÓN	60
2.2	DESARROLLO EXPERIMENTAL	60
2.2.1	Equipamiento	61
2.2.1.1	Aparatos	61
2.2.1.2	Reactivos	61
2.2.1.3	Limpieza del material.....	62
2.2.2	Formación del complejo. Optimización.....	62
2.2.2.1	Influencia del pH de la disolución tampón.....	62
2.2.2.2	Potencia del microondas y el tiempo de calentamiento.....	64
2.2.2.3	Cantidad de agente complejante TFA	65
2.2.3	Optimización del programa de temperaturas de la cámara de grafito	66
2.2.4	Características analíticas	70
2.2.4.1	Rectas de calibrado y adición.....	70
2.2.4.2	Sensibilidad.....	72
2.2.4.3	Precisión.....	73
2.2.4.4	Exactitud	74
2.2.5	Método propuesto.....	75
2.3	APLICACIÓN	76
3	BIBLIOGRAFÍA.....	81

1 Muestras de agua dulce

1.1 INTRODUCCIÓN

1.1.1 Elección del agente quelatante

Ya desde los años 50 se ha estudiado la formación de quelatos con las β -dicetonas utilizadas para la extracción y separación de metales. Existen diversos estudios en los que se demuestra que los derivados fluorados de estas β -dicetonas poseen mayor volatilidad y estabilidad térmica, lo cual las hace más eficaces para los procesos de separación¹⁻³. El incremento de volatilidad se podría justificar por la reducción de las fuerzas de Van der Waals y posiblemente por una disminución de los enlaces de hidrógeno intermolecular de los compuestos fluorados en comparación con los complejos análogos sin fluor.

Un compuesto de este tipo es la 1,1,1- trifluoro-2,4-pentadiona (TFA), el cual forma quelatos con diversos metales: Be(II), Mg(II), Al(III), Sc(III), Cr(III), Mn(III), Fe(III), Co(III), Ni(II), Cu(II); Zn(II); Ga(III), Zr(IV), Rh(III), In(III), La(III), Hf(IV) y tierras raras^{1, 4-13}. Estos complejos presentan una estructura octaédrica con dos isómeros espaciales: cis y trans, como se representan en la figura 1.

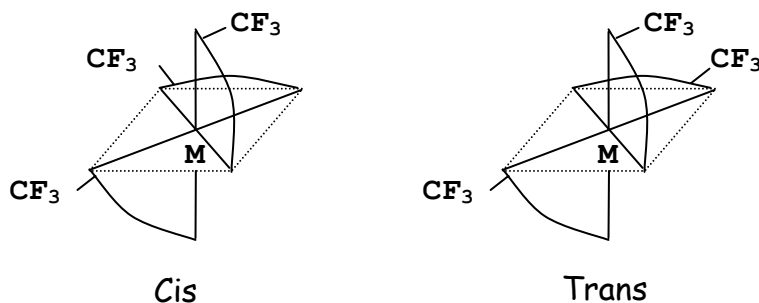


Figura 1. Isómeros geométricos de los quelatos de TFA.

La diferencia entre los dos isómeros en la posición de uno de los grupos trifluorometil le confieren distinta polaridad, siendo mayor para el isómero cis. Los isómeros se pueden separar mediante cromatografía de gases, dado que presentan diferente volatilidad. El isómero trans se eluye antes porque su polaridad es menor y por tanto su volatilidad mayor que la del isómero cis^{4, 14}.

El cromo es uno de los metales más estudiados, que forma un quelato con la 1,1,1- trifluoro-2,4-pentadiona (TFA), la cual reacciona selectivamente con Cr(III), formando el complejo cuya estructura se representa en la figura 2. Se ha demostrado la estabilidad de dicho quelato, Cr(TFA)₃, así como el incremento de volatilidad respecto al quelato formado con la acetilacetona (AA). En un trabajo publicado por Castillo et al.¹⁵ se representan las curvas termogravimétricas de ambos quelatos; donde se corrobora la diferencia de volatilidad. El Cr(AA)₃ comienza a sublimarse a los 145°C, mientras que el Cr(TFA)₃ lo hace a los 75°C. Posteriormente, en un estudio más detallado sobre las temperaturas de sublimación para distintas β-dicetonas, se han obtenido 109°C y 148°C como temperaturas de sublimación para Cr(TFA)₃ y Cr(AA)₃, respectivamente¹¹.

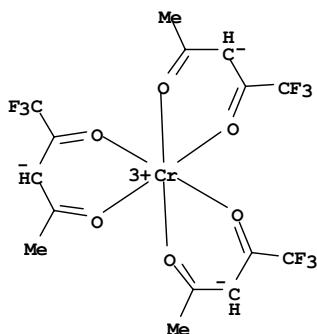


Figura 2. Estructura del complejo Cr(TFA)₃

A pesar que los primeros estudios de los quelatos con β-dicetonas se centran en su separación cromatográfica, a principios de los años 70 ya se publicaron

trabajos en los se usan estos complejos para la determinación de metales mediante AAS⁶.

El complejo $\text{Cr}(\text{TFA})_3$ se ha empleado para la determinación de Cr en distintas matrices mediante varias técnicas analíticas: GC-AAS⁸, GC/MS con dilución isotópica¹⁶, GC-ECD¹⁷, FAAS^{15, 18}, ETAAS¹⁹⁻²¹, ICPAES^{9, 10}. Incluso se ha empleado para la especiación directa de Cr en el interior del tubo de grafito²²⁻²⁴ basándose en la selectividad de la reacción de complejación. La elevada volatilidad de este quelato permite la eliminación del contenido de Cr(III) en las muestras antes de la determinación de Cr(VI)²⁴.

1.1.2 Espectroscopía de absorción atómica

En la revisión bibliográfica realizada por Marques et al²⁵. sobre la especiación de Cr en matrices líquidas se verifica que la espectroscopía atómica es la técnica más utilizada sola o acoplada con otras técnicas para la determinación de Cr(III) y Cr(VI).

La espectroscopía atómica como técnica de detección se basa en la absorción, emisión o fluorescencia por átomos o iones elementales que tiene lugar durante las transiciones electrónicas del estado fundamental al estado excitado. El proceso en el cual la muestra se convierte en un vapor atómico se denomina atomización. Generalmente, el vapor atómico se obtiene sometiendo la muestra a una fuente de calor mediante diferentes mecanismos: llama (FAAS) o electrotérmicos (ETAAS). Inmediatamente se expone a la radiación de una lámpara que emite a la longitud de onda propia del elemento a determinar. La diferencia de energía entre la fuente y el detector es proporcional a la cantidad de analito vaporizado y teniendo en cuenta el volumen de muestra analizado se obtiene su concentración.

1.1.2.1 Fuentes de radiación

En el caso de la espectroscopía de absorción atómica se emplean fundamentalmente dos tipos de fuentes: lámparas de cátodo hueco y lámparas de descarga.

Las lámparas de cátodo hueco consisten en un ánodo de wolframio y un cátodo cilíndrico construido con el metal del que se desea obtener el espectro. Ambos están cerrados herméticamente en un tubo de vidrio lleno de un gas inerte, Ar o Ne, a una presión de 1 a 5 torr (Figura 3A). Cuando se aplica un potencial eléctrico entre los electrodos se produce la ionización del gas capaz de ionizar parte de los átomos metálicos arrancados del cátodo, logrando así la emisión de la radiación característica del elemento que se desea determinar.

Para algunos elementos volátiles se emplean lámparas de descarga, las cuales se construyen con un tubo de cuarzo herméticamente cerrado que contiene un gas inerte y una pequeña cantidad del metal que se desea determinar (Figura 3B). A diferencia de las lámparas de cátodo hueco, estas no tienen electrodos, empleando para su activación un campo intenso de radiofrecuencias o de radiación de microondas^{26, 27}.

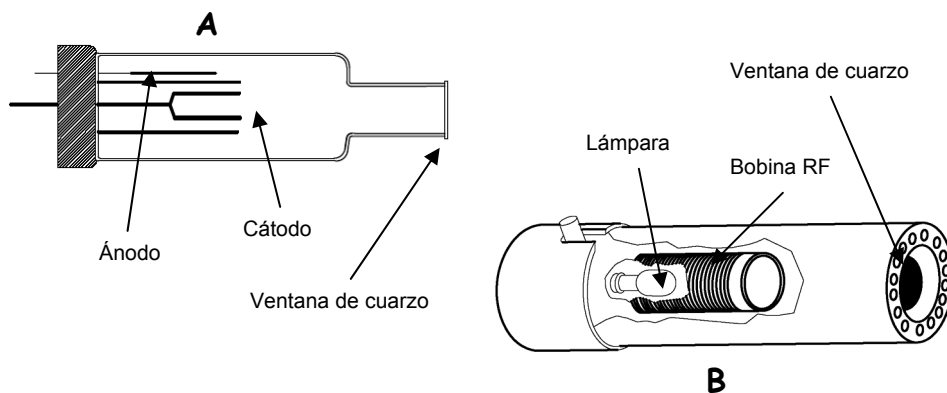


Figura 3. Fuentes de radiación más comunes en AAS: A. Lámpara de cátodo hueco, B. Lámpara de descarga.

1.1.2.2 Espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotérmica

En este trabajo se ha empleado la espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS) dado que: requiere un volumen de muestra pequeño, del orden de los μl ; su elevada sensibilidad permite determinaciones al nivel de trazas y ultra-trazas, como es el caso de los metales en agua de mar. Y además se trata de un equipamiento relativamente económico y de fácil manejo en comparación con la técnica de plasma acoplado inductivamente (ICP), para cuyo manejo se requiere personal más cualificado y tanto su coste como su mantenimiento son mayores.

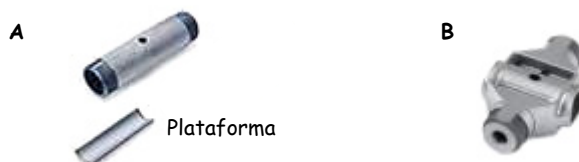


Figura 4. Tipos de tubos de grafito más habituales: A. Calentamiento longitudinal, con el detalle de la plataforma, B. Calentamiento transversal.

La espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS) fue propuesta por L'vov en 1959. La muestra se introduce por el orificio superior dentro de un tubo de grafito, abierto por los dos extremos, a través del cual pasa coaxialmente el haz de luz procedente de la fuente. El tubo es de unos 5 cm de largo y un diámetro interno de algo menos de 1 cm. El tubo de grafito se ubica dentro de una cámara que se calienta eléctricamente. En función del tipo de calentamiento, que puede ser longitudinal o transversal, varía la forma del tubo de grafito²⁸ (Figura 4). Mediante el calentamiento transversal se obtiene mayor homogeneidad en la temperatura a lo largo del tubo de grafito²⁷. La cámara está refrigerada con agua y protegida de la oxidación atmosférica con Ar mediante 2 conductos uno exterior y otro interior. La corriente interior de Ar además de evitar el deterioro del tubo por el contacto con el aire, arrastra los vapores generados por la matriz de la muestra en las etapas previas a la atomización. La cámara está

delimitada por dos ventanas de cuarzo, permitiendo el paso de la radiación desde la fuente hasta el detector.

Con el fin de mejorar la sensibilidad y la reproducibilidad de la atomización en 1977 L'vov propuso la utilización de una plataforma colocada en el interior de tubo de grafito sobre la cual se inyecta la muestra²⁹. La plataforma se calienta por la radiación de las paredes incandescentes del tubo, retrasando la atomización de la muestra hasta que se alcance una temperatura constante. Ello permite que la temperatura de atomización programada sea mayor, reduciendo interferencias tanto espectrales como químicas^{30, 31}.

Otra medida para mejorar la reproducibilidad y reducir las interferencias de matriz es el uso de tubos de grafito pirolítico. Mediante el recubrimiento con una capa delgada de carbono pirolítico se reduce la porosidad natural del grafito, evitando el efecto memoria y la formación de compuestos térmicamente estables como carburos u óxidos que provocan la pérdida de analito²⁷.

1.1.2.2.1 Programa de temperaturas de la cámara de grafito

Una vez depositada la muestra en el tubo de grafito, esta se calienta eléctricamente siguiendo el programa de temperaturas de la cámara de grafito. Como se representa en la figura 5 el programa consta de varias etapas que se agrupan en los siguientes bloques²⁷:

- **Secado**

La finalidad del secado es la evaporación del disolvente, por ello, la temperatura debe ser próxima a la temperatura de ebullición de dicho disolvente. El tiempo necesario dependerá de la temperatura elegida y del volumen de la muestra; que generalmente se comprueba por visualización directa de la muestra en el interior del tubo. La rampa de calentamiento debe ser lo suficientemente lenta como para evitar salpicaduras, que darían lugar a pérdidas.

- Mineralización

Sometiendo la muestra a temperaturas superiores, se pretende reducir al máximo la matriz, pero minimizando la pérdida del analito mediante una volatilización selectiva. Por tanto, la temperatura óptima de mineralización es la máxima a la cual no se producen pérdidas del elemento, que se ponen de manifiesto por la disminución de la señal. El tiempo dependerá de la matriz, se recomienda el menor tiempo posible sin que afecte la lectura final. La forma de la señal puede orientarnos en la elección de esta variable. Con el fin de mejorar la eficacia de la mineralización, usualmente se emplean modificadores de matriz cuya función puede ser acelerar la eliminación de la matriz o estabilizar el analito, lo cual permite aumentar la temperatura de mineralización sin pérdida de sensibilidad.

- Atomización

La temperatura óptima de atomización será la más baja que proporcione el máximo valor de absorbancia, teniendo en cuenta también la forma del pico. El tiempo debe ser el mínimo para completar la atomización, de modo que la señal de absorbancia retorne a línea-base. La sensibilidad del análisis está estrechamente relacionada con la eficacia de la atomización. Una forma para mejorar esta sensibilidad es interrumpir el flujo de gas de purga, incrementando el tiempo de residencia del analito en el camino óptico, así como favoreciendo la estabilidad térmica en la cámara³². Durante la parada del flujo de gas inerte se acelera el deterioro de tubo de grafito por oxidación en contacto con el aire atmosférico, siendo aconsejables tiempos de atomización bajos, inferiores a 6 segundos.

- Limpieza

Existe la posibilidad de que una vez finalizada la atomización todavía permanezcan compuestos poco volátiles en el interior del tubo de grafito. Estos residuos pueden manifestarse en la siguiente atomización, dando lugar al efecto memoria. Con el propósito de eliminarlos, después de realizar la lectura, se somete al tubo a una temperatura mayor a la de atomización.

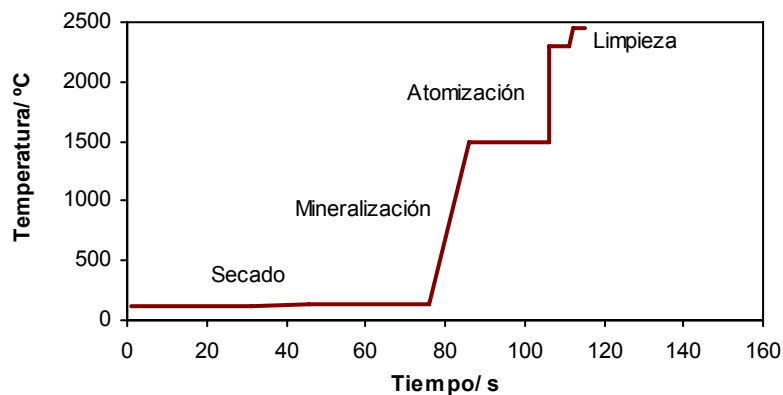


Figura 5. Perfil del programa de temperaturas de la cámara de grafito para la determinación de Cr recomendado por Perkin-Elmer

1.1.2.2.2 Interferencias

La presencia de otros elementos en la muestra puede causar interferencias en la determinación del analito, afectando a la precisión y la exactitud de los resultados obtenidos. Si no se tienen en cuenta se estarían introduciendo errores considerables en la medida. Las interferencias se dividen en 2 categorías:

- Interferencias espectrales

Las causas de este tipo de interferencia son: el solapamiento directo de la línea de absorción del analito con la línea de otro elemento; la absorción por moléculas gaseosas de la radiación de la línea del analito; absorción de otros elementos presentes de otra radiación que no puede discriminarse con el monocromador; y la dispersión de la radiación por partículas sólidas o líquidas.

La forma de eliminar las interferencias espectrales es empleando un sistema de corrección de fondo que permita discernir entre la señal del analito y el ruido. En la actualidad existen tres sistemas de corrección de fondo: corrección de fondo de

fuentes continuas, corrección basada en el efecto Zeeman y corrección de fondo Smith-Hieftje.

- *Corrector de fondo de fuente continua*

Consiste básicamente en intercalar una lámpara de deuterio en el sistema óptico del equipo. El sistema electrónico está diseñado de modo que, permite el paso de la radiación proveniente de lámpara de deuterio y la lámpara de cátodo hueco alternadamente hacia el sistema atomizador. La luz emitida por la lámpara de cátodo hueco es absorbida por el analito y la matriz, mientras que un instante después, la matriz absorbe la radiación de la lámpara de deuterio. Mediante un dispositivo electrónico se obtienen los valores de absorbancia neta libre de interferencias de matriz²⁶.

- *Corrector de fondo basado en el efecto Zeeman*

Cuando un vapor atómico se expone a un campo magnético intenso se produce un desdoblamiento de los niveles energéticos lo que conduce a la formación de varias líneas de absorción. Una línea central, denominada π , que coincide con la longitud de onda original y dos líneas satélites σ , situadas simétricamente a ambos lados de la línea original (Figura 6). La suma de las absorbancias de los tres componentes coincide con la absorbancia de la línea de la que proceden.

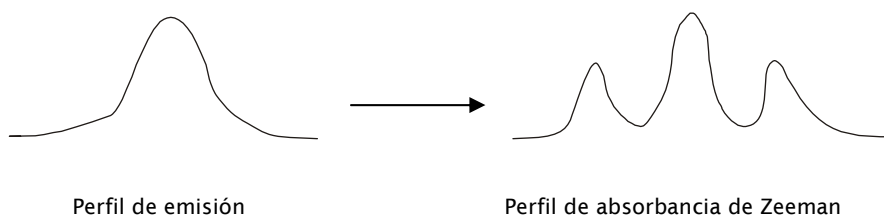


Figura 6. Desdoblamiento de la señal por efecto Zeeman

Estos dos tipos de líneas responden de modo diferente a la luz polarizada, la línea π absorbe solamente la radiación polarizada en un plano paralelo al campo magnético externo mientras que las líneas σ se polarizan en un plano perpendicular al anterior^{33, 34}.

El diseño del corrector de fondo basado en el efecto Zeeman consiste en un potente imán colocado sobre el sistema atomizador y un polarizador rotatorio sincronizado, de modo que al detector llegue alternativamente la señal debida al analito y al fondo, ya que las líneas σ no coinciden con la longitud de onda característica del elemento. Un sistema electrónico se encargará de restar ambas señales corrigiendo así el fondo.

El equipo que se empleará en este trabajo para realizar los análisis está dotado de un sistema de corrección basado en el efecto Zeeman.

- *Sistema de corrección de fondo Smith-Hieftje*

Posteriormente se ha diseñado un sistema de corrección basado en el fenómeno de autoinversión, comportamiento de las líneas de absorción cuando a las lámparas de cátodo hueco se le aplican corrientes de alta intensidad³⁵. La línea de emisión se ensancha y la elevada concentración de átomos no excitados absorbe la radiación emitida por las especies excitadas dando lugar a un mínimo a la longitud de onda característica (Figura 7).

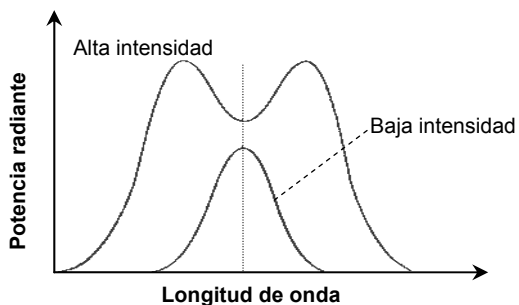


Figura 7. Perfiles de emisión en lámparas de cátodo hueco funcionando con altas y bajas intensidades de corriente.

La corrección de fondo se obtiene alimentando la lámpara de cátodo hueco alternativamente con corriente de alta y baja intensidad. Cuando la lámpara está sometida a baja intensidad de corriente, la señal que llega al detector corresponde al elemento en condiciones normales más la del fondo. Unos milisegundos más tarde, al alimentarla con alta intensidad, la absorción propia del analito es despreciable debido al fenómeno de autoinversión, por lo tanto la lectura obtenida corresponde a la señal de fondo.

- Interferencias no espectrales

Los elementos presentes en la muestra pueden modificar la eficacia de la atomización del analito, lo cual se denomina comúnmente como efecto matriz. Este tipo de interferencia es más habitual que la interferencia espectral. Generalmente afectan negativamente a la señal del analito, es decir, la atenúan mediante: la formación de compuestos volátiles que provocan la pérdida del analito durante la etapa de mineralización; la formación de carburos térmicamente estables que dificultan la atomización del analito; y la covoletización o expulsión debido a la formación de un volumen de gas considerable, capaz de arrastrar al analito fuera tubo de grafito³⁶.

Con el fin de minimizar las interferencias no espectrales se añaden modificadores de matriz o se emplean modificadores permanentes recubriendo los tubos de grafito²⁷. En general la función de los modificadores de matriz consiste en evitar la formación de los óxidos o carburos térmicamente estables que dificultan la atomización de parte del analito o la estabilización de los compuestos volátiles del analito, lo cual permite aumentar la temperatura de mineralización para una mayor eliminación de la matriz. Sin embargo, los mecanismos concretos de actuación dependen de cada modificador de matriz y del analito³⁷.

Las requisitos que debe cumplir el modificador químico ideal son³⁶:

- Permitir aumentar la temperatura de mineralización con el fin de eliminar al máximo los posibles interferentes, sin pérdida del analito.
- Versatilidad, capaz de estabilizar la mayor cantidad de elementos posibles.
- Químicamente puro, de modo que la señal de blanco sea despreciable.
- No contenga el elemento que se desea determinar.
- No acelere el deterioro del tubo de grafito o de la plataforma acortando su vida útil.
- Menor contribución posible a la señal de fondo.

La mezcla $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2/\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ aunque no reúne todos estos requisitos se considera como el mejor modificador de matriz, por ello ha sido ampliamente utilizado.

1.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL

El fundamento del método que se ha desarrollado consiste en la evaporación de Cr(III) previa a la determinación de Cr(VI) por ETAAS. La separación de la especie trivalente se produce añadiendo a la muestra una β -dicetona que reacciona selectivamente con el Cr(III) formando un quelato volátil. Se ha tomado como referencia un trabajo realizado anteriormente en nuestro grupo de investigación³⁸ en el cual se emplea la tenoiltrifluoroacetona para formar el quelato volátil. En este caso se ha elegido la 1,1,1-trifluoro-2,4-pentadiona (TFA) como agente complejante.

1.2.1 Equipamiento

1.2.1.1 Aparatos

Las medidas se han realizado usando un espectrómetro Perkin-Elmer Model 4100ZL equipado con una cámara de grafito de calentamiento transversal (THGA) y el automuestreador AS 71. Se han utilizado tubos de grafito pirolítico con plataforma L'vov. Este equipo además dispone de un corrector de fondo Zeeman. Se ha usado una lámpara de cátodo hueco trabajando a 12 mA, la cual proporciona una longitud de onda de 357,9 nm con un ancho de banda espectral de 0,7 nm. Para la evaluación de los resultados se ha empleado la absorbancia integrada durante 5 segundos. El volumen de muestra inyectado fue de 20 μ l.

Además se ha usado un pHmetro ThermoOrion Modelo 720A+ y un horno microondas doméstico Panasonic NN-5256 para la preparación de las muestras.

1.2.1.2 Reactivos

- Disolución patrón de Cr(III) de 1000 mg l^{-1} $Cr(NO_3)_3$ (Merck, Alemania).
- Disolución patrón de Cr(VI) de 1000 mg l^{-1} Cr preparada disolviendo $K_2Cr_2O_7$ (99%) (Aldrich Chemical, USA) y conservada a 4°C.
- Acetato sódico, (Panreac, España).
- Ácido acético glacial, grado HPLC. (Scharlau, España).
- 1,1,1-trifluoro-2,4-pentadiona (TFA) 99%. (Avocado-Panreac Síntesis, España).
- Nitrato de magnesio, $Mg(NO_3)_2$, Suprapur, (Merck, Alemania).
- Material de referencia certificado, CRM 544, (Disolución de Cr liofilizada), Bureau Community of Reference, from European Commission.
- Agua ultrapura. Resistividad 18 $M\Omega$ cm usando el sistema de purificación de agua Milli-Q® (Millipore).

- Argón N50 pureza: 99,999%, empleado como gas de purga y refrigeración en el atomizador.

1.2.1.3 Limpieza del material

Todo el material necesario, antes de ser utilizado, fue lavado cuidadosamente con agua y jabón, se enjuagan con agua Milli-Q[®] y se mantienen durante 48 horas en una disolución de HNO₃ al 10%. Posteriormente se vuelve a enjuagar con agua Milli-Q[®] y se almacena seco y listo para su uso en un lugar libre de polvo.

1.2.2 Formación del complejo. Ensayos previos

En primer lugar se estudiarán las condiciones de formación del complejo entre Cr(III) y el TFA y si este se evapora antes de la determinación del Cr(VI) empleando el programa de temperaturas de la cámara de grafito recomendado por el fabricante del equipo empleado, Perkin-Elmer (Tabla 1).

Tabla 1. Programa de temperaturas de la cámara de grafito recomendado por Perkin-Elmer para la determinación de Cr.

Etapa	Temperatura / °C	Rampa / s	Permanencia / s	Flujo Ar / ml min ⁻¹
Secado I	110	1	30	250
Secado II	130	15	30	250
Mineralización	1500	10	20	250
Atomización	2300	0	5	0
Limpieza	2450	1	3	250

1.2.2.1 Disolución tampón. pH

Como se ha comprobado en el trabajo propuesto por Bermejo et al.³⁸ el pH es un parámetro fundamental en la reacción de formación del quelato volátil, por ello se ha comenzado con un estudio preliminar de la influencia del pH de la disolución tampón. La eficacia del tampón ácido acético/ acetato sódico en la formación y posterior extracción de los quelatos de TFA ya ha sido demostrada por Scribner et al.⁵ en 1965.

En primer lugar, se pipetea 1 ml de disolución acuosa de Cr(III) a una serie de tubos de ensayo y a otra 1 ml de disolución acuosa de Cr(VI) ambas de la misma concentración tal que la concentración final sea $10 \mu\text{g l}^{-1}$. A cada uno de los tubos se le añaden 2 ml de disolución tampón ácido acético/ acetato sódico a diferentes pHs y 1 ml de TFA al 1%. Finalmente, se agitan mecánicamente durante 2 minutos y se realiza la determinación por ETAAS.

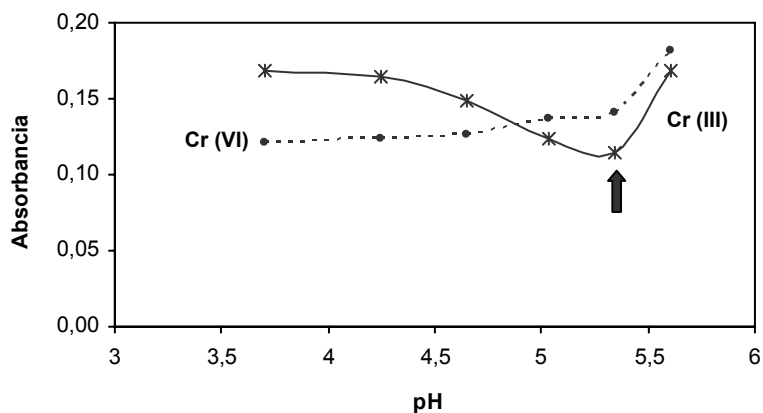


Figura 8. Influencia del pH de la disolución tampón en la formación del complejo Cr-TFA.

A partir de los resultados obtenidos, tal como se muestra en la figura 8, se deduce que la disolución tampón a pH 5,23 favorece la formación del complejo ya que la señal de absorbancia de Cr(III) sufre una disminución apreciable lo que nos indica que se ha formado el complejo volátil. Además a este pH no se produce

disminución de la señal de Cr(VI). Utilizaremos, por tanto, la disolución tampón HAc/NaAc a pH 5,23 que se ha preparado mezclando 2 ml de ácido acético 0,2 M con 8 ml acetato sódico 0,2 M.

Posteriormente revisaremos este estudio al finalizar los ensayos preliminares y después de la optimización del programa de temperaturas de la cámara de grafito.

1.2.2.2 Potencia del microondas y del tiempo de calentamiento

Con el fin de acelerar la reacción de formación del complejo $\text{Cr}(\text{TFA})_3$ se ha utilizado un microondas para el calentamiento de la mezcla muestra/tampón/TFA descrita anteriormente. El estudio de la influencia de la temperatura sobre la eficacia de la reacción se ha realizado variando la potencia del microondas y el tiempo de calentamiento a la que se someten 2 disoluciones patrón de $7 \mu\text{g l}^{-1}$, una de Cr(III) y otra de Cr(VI).

Subiendo gradualmente la potencia del microondas se ha observado una ebullición brusca con pérdida de parte de la muestra cuando se calienta a 300 W de potencia; por lo tanto, deberíamos trabajar a potencias menores.

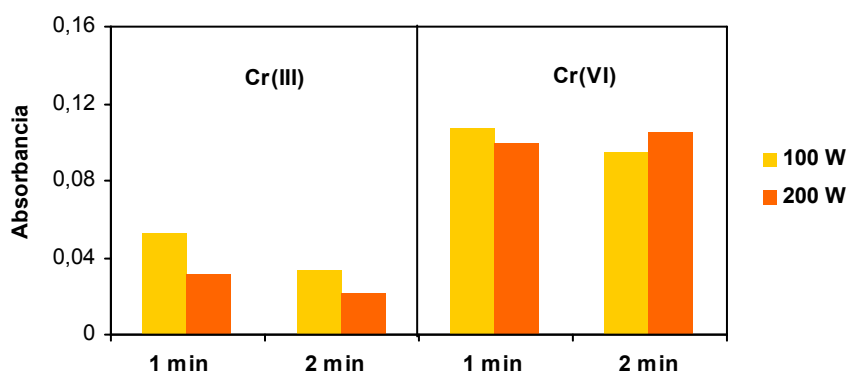


Figura 9. Estudio del tiempo de calentamiento y potencia del microondas en la formación del complejo Cr-TFA.

A la vista de los resultados (Figura 9), las condiciones óptimas de formación del quelato serían 2 minutos a 200 W, porque se logra la volatilización de la mayor cantidad de Cr(III) sin perjudicar la señal de la disolución de Cr(VI). Sin embargo, al realizar varias repeticiones de esta serie de experimentos encontramos que calentando durante 2 minutos a 200 W en algunos casos también se pierde parte de la muestra por ebullición. Por este motivo se ha decidido bajar la potencia a 100 W, de tal modo que nos aseguramos la aceleración de la reacción sin provocar la pérdida de la muestra.

1.2.3 Optimización del programa de temperaturas de la cámara de grafito

Después de haber realizado los ensayos previos de formación del complejo, procedemos a la optimización del programa de temperaturas de la cámara de grafito, partiendo del programa recomendado por el fabricante del ETAAS (Perkin-Elmer) para la determinación de Cr (Tabla 1).

En las etapas de secado se han disminuido los tiempos de calentamiento asegurándonos de que no se produzca chisporroteo de la muestra por un secado insuficiente, lo que supondría un rápido deterioro del tubo de grafito. Las temperaturas de mineralización y atomización se han optimizado para patrones acuosos de Cr(III) y Cr(VI), ambos con $7 \mu\text{g l}^{-1}$ de concentración (Figura 10). Y además para muestras de agua dopadas por separado con la misma concentración de Cr(III) y Cr(VI), a las cuales se le han añadido la disolución tampón y el TFA (Figura 11).

La optimización de la etapa de mineralización se ha realizado variando la temperatura entre 400°C y 1900°C (Izquierda de las figuras 10 y 11). Se ha elegido como temperatura óptima de mineralización 1500°C , por ser la temperatura máxima que asegura la mineralización de la matriz sin que se produzca pérdida de Cr(VI). Este comportamiento coincide tanto para el patrón acuoso como para la muestra de agua.

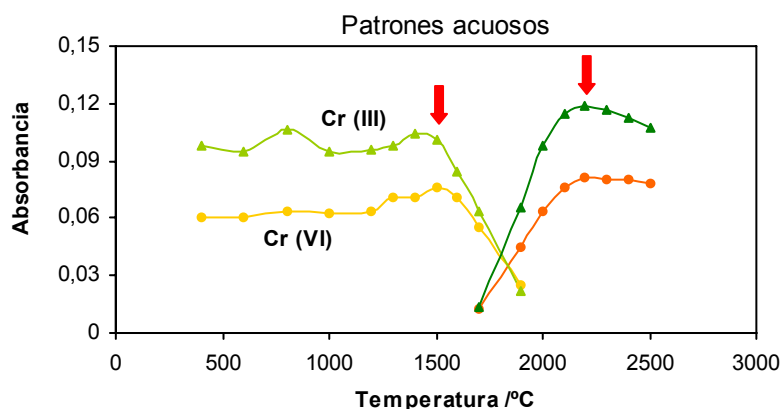


Figura 10. Curvas de mineralización y atomización para patrones acuosos de $7 \mu\text{g l}^{-1}\text{Cr(III)}$ y $7 \mu\text{g l}^{-1}\text{Cr(VI)}$.

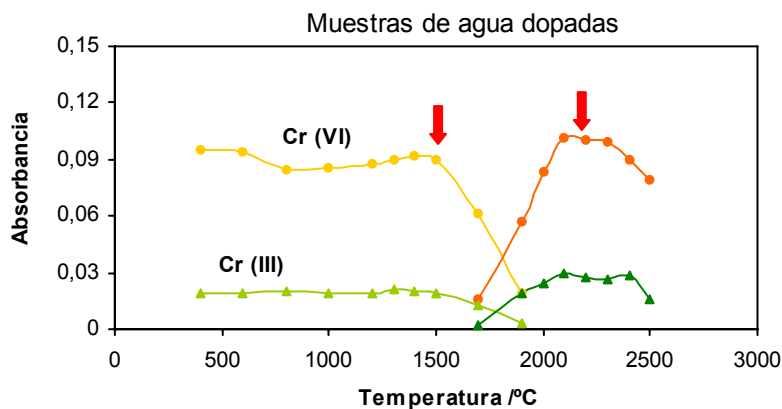


Figura 11. Curvas de mineralización y atomización para muestras de agua dopadas con Cr(III) y de Cr(VI) ambas con una concentración de $7 \mu\text{g l}^{-1}$.

Para la optimización de la temperatura de atomización se ha variado esta entre 1700°C y 2500°C (Derecha de las figuras 10 y 11). La temperatura elegida (2200°C) se encuentra dentro de ese intervalo en el cual la absorbancia se mantiene próxima al valor máximo, asegurando una atomización eficaz.

Sin haber optimizado las condiciones de formación del complejo Cr-TFA existe una diferencia significativa entre la absorbancia correspondiente a la muestra dopada con Cr(III) y a la muestra dopada con la misma concentración de Cr(VI) (Figura 11). La señal de Cr(III) es mucho menor que la señal de Cr(VI), lo que implica que se ha eliminado parcialmente, ya que la sensibilidad para el patrón acuoso de Cr(III) es incluso mayor que para Cr(VI) (Figura 10). Esto demuestra que la determinación selectiva de Cr(VI) es posible mediante la formación de un quelato volátil Cr-TFA.

El programa de temperaturas optimizado para la cámara de grafito se resume en la Tabla 2.

Tabla 2. Programa de temperaturas de la cámara de grafito para la determinación selectiva de Cr(VI) en agua.

Etapas	Temperatura / °C	Rampa / s	Permanencia / s	Flujo Ar / ml min⁻¹
Secado I	110	1	10	250
Secado II	130	5	30	250
Mineralización	1500	10	20	250
Atomización	2200	0	5	0
Limpieza	2450	1	3	250

1.2.4 Formación del complejo. Optimización

1.2.4.1 Influencia del pH de la disolución tampón

Hasta ahora se ha empleado una disolución tampón HAc/NaAc a pH 5,23 preparada a partir de una disolución 0,2 M de ácido acético y otra disolución 0,2 M de acetato sódico. A continuación se procederá a un estudio pormenorizado de la influencia del pH de la disolución tampón en la formación del complejo.

Se han realizado 10 experimentos con una disolución patrón de $7 \mu\text{g l}^{-1}$ Cr(III), variando las proporciones de HAc y NaAc. Se observa como la señal de Cr(III) disminuye a medida que aumenta el pH.

Además se ha estudiado la influencia del tipo de disolución tampón comparando HAc/NaAc y $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$. Se ha elegido la segunda disolución tampón para comprobar que sucedería a pH mayores empleando $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$, ya que el pH máximo que se obtiene con la disolución tampón 0,2 M HAc/0,2 M NaAc es 5,76. Las señales de absorbancia obtenidas con la nueva disolución tampón $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ son mayores (Figura 12); lo que significa que estas condiciones no son las más favorables para la formación del complejo. Entonces, se ha optado por aumentar la concentración del ácido acético y el acetato sódico a 0,5 M para poder trabajar a pH más elevados.

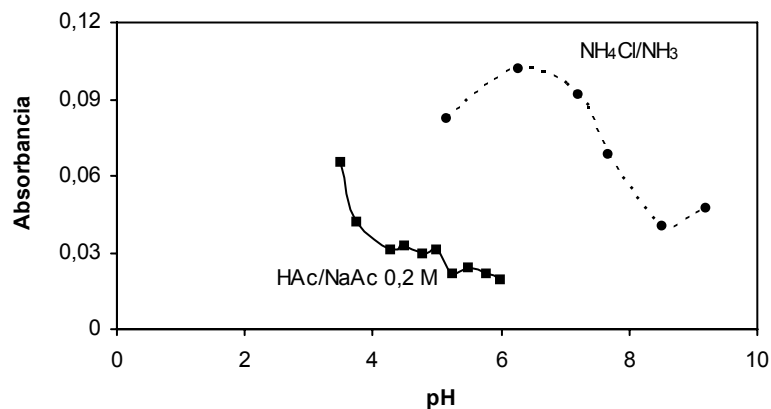


Figura 12. Influencia del pH de la disolución tampón en una disolución de $7 \mu\text{g l}^{-1}$ Cr(III). Comparación de las disoluciones tampón HAc/NaAc y $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$.

En la figura 13 se representan los resultados obtenidos para 10 ensayos realizados con una disolución dopada con $7 \mu\text{g l}^{-1}$ de Cr(III) y otros 10 ensayos empleando una disolución dopada con la misma concentración de Cr(VI). La absorbancia de la muestra dopada con Cr(III) disminuye a medida que aumenta el

pH, siendo mínima a pH 6. Mientras que para la muestra dopada con Cr(VI) se mantiene prácticamente constante.

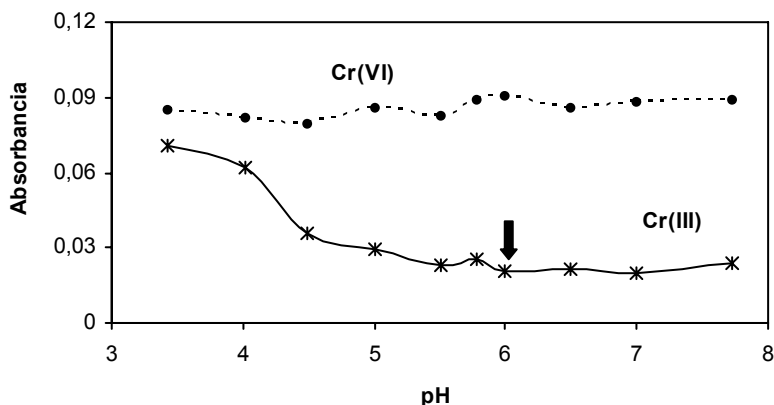


Figura 13. Influencia del pH de la disolución tampón HAc/NaAc 0,5 M.

Por ello, se ha seleccionado la disolución tampón a pH 6 preparada con 95 ml de NaAc 0,5 M y 5 ml de HAc 0,5 M para continuar con la optimización del método.

1.2.4.2 Optimización de la concentración de 1,1,1-trifluoro-2,4-pentadiona

La especie trivalente del cromo reacciona selectivamente con 1,1,1-trifluoro-2,4-pentadiona dando lugar a un complejo octaédrico muy volátil (Figura 2). Teniendo en cuenta la estequiometría del compuesto, una disolución del 1% de TFA sería suficiente para complejar el Cr(III) presente en una muestra con niveles de concentración entorno a los $\mu\text{g l}^{-1}$.

Sin embargo, los resultados obtenidos experimentalmente reflejan que por debajo de 1% de TFA no se elimina el Cr(III) presente en la muestra dopada con $7 \mu\text{g l}^{-1}$ (Figura 14). La señal se mantiene prácticamente constante entre 1-10%. Se ha seleccionado TFA al 4% para garantizar la formación del quelato.

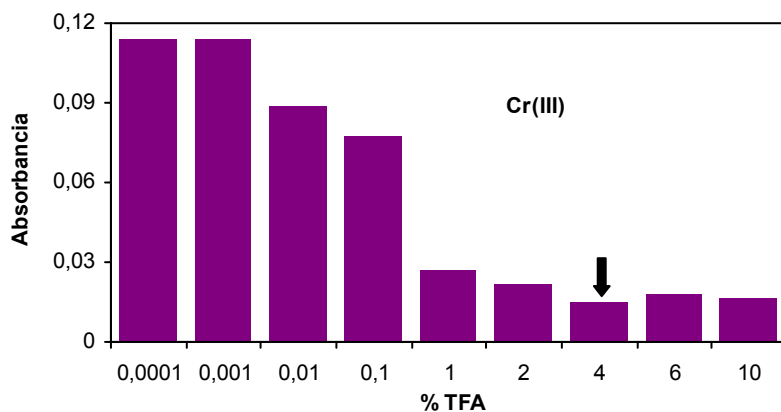


Figura 14. Optimización de la concentración de TFA para muestra de agua.

1.2.4.3 Estabilidad del complejo

Para estudiar la estabilidad del complejo formado, $\text{Cr}(\text{TFA})_3$, se ha repetido el análisis de una misma muestra en diferentes momentos entre 15 min y 3 horas después del tratamiento de la muestra en el microondas. La señal de Cr permanece constante con el tiempo, lo cual implica que el complejo se mantiene estable al menos durante 3 horas (Figura 15). Esto permite la preparación de varias muestras con antelación antes de comenzar el análisis.

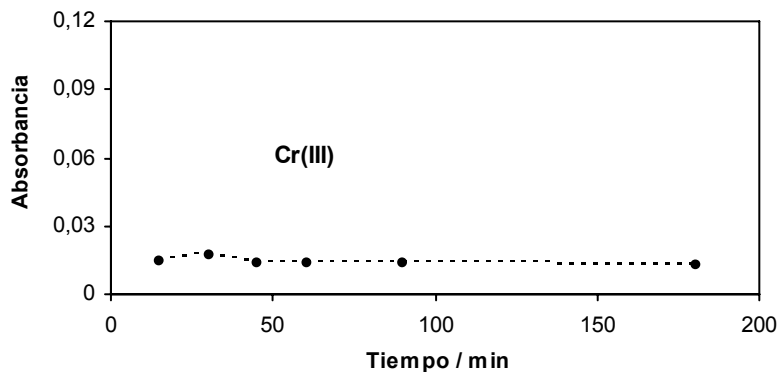


Figura 15. Estabilidad del complejo $\text{Cr}(\text{TFA})_3$ en agua.

1.2.5 Determinación en ETAAS. Optimización

Una vez finalizada la optimización de los parámetros que afectan a la formación del quelato volátil nuestro objetivo es mejorar la sensibilidad en la determinación de Cr(VI). Esto se puede obtener con un programa de temperaturas de la cámara de grafito adecuado para el analito y el tipo de muestra a analizar o empleando modificadores de matriz para eliminar las posibles interferencias químicas.

El programa de temperaturas de la cámara de grafito (Tabla 2) ya ha sido revisado antes de comenzar el estudio de las variables que afectan a la formación del complejo.

1.2.5.1 Estudio del modificador de matriz

Se ha demostrado que el Cr se volatiliza lentamente debido a la formación de carburos estables³⁹. Con el fin de contrarrestar este fenómeno se recomienda la adición de un modificador de matriz. En los trabajos publicados se proponen distintos modificadores: HNO_3 ⁴⁰, ácido oxálico⁴⁰, NH_4NO_3 ^{40, 41}, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2/\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ⁴², $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ /ácido ascórbico⁴³, Pd solo o mezclado con otros modificadores como $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ o ácido ascórbico⁴⁴; $\text{Na}_2\text{WO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ ⁴⁵ y $(\text{Mg}(\text{NO}_3)_2)$ ⁴⁵⁻⁵⁰. En este caso se ha seleccionado el nitrato de magnesio por ser uno de los modificadores más empleados en la determinación de Cr mediante ETAAS.

Para evaluar el efecto del modificador de matriz se han realizado una serie de ensayos variando entre 0 y 60 mg l⁻¹ la concentración del $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$. Se ha comparado el efecto del modificador sobre patrones acuosos y sobre muestras de agua dopadas con ambas especies por separado. Para ello se han analizado directamente disoluciones patrón de 7 µg l⁻¹ de Cr(III) y Cr(VI). Las muestras de agua dopadas han sido tratadas siguiendo las condiciones optimizadas anteriormente: a 1 ml de muestra se le añaden 2 ml de disolución tampón HAc/NaAc a pH 6 y 1 ml TFA al 4% (m/v) y el volumen necesario de las

disoluciones patrón, llevándolas a un volumen final de 4 ml. Luego se calientan durante 2 min a 100W en el microondas.

No se encontraron mejoras en la sensibilidad (Figura 16), por lo que se ha descartado el uso de modificador de matriz. Esto simplifica el tratamiento de la muestra reduciendo el riesgo de contaminación o error asociado a la manipulación.

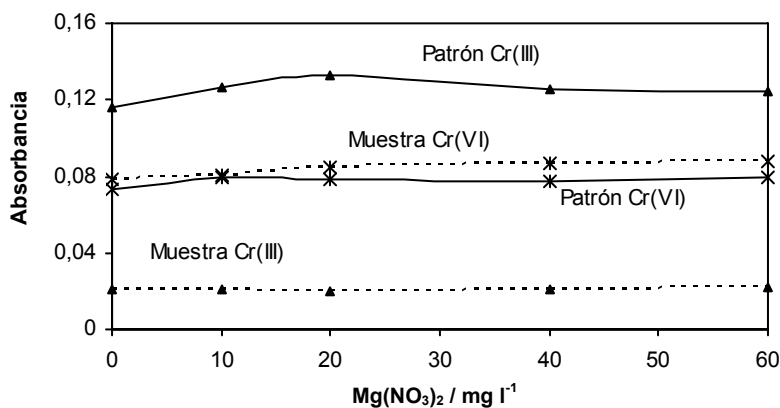


Figura 16. Estudio del modificador de matriz Mg(NO₃)₂.

1.2.6 Características analíticas del método

A continuación se han estudiado las rectas de calibrado y adición; la sensibilidad, la precisión y la exactitud del método propuesto.

1.2.6.1 Rectas de calibrado y adición

Con el fin de seleccionar el modo de calibración más adecuado para la cuantificación de Cr(VI) en muestras de agua dulce se han comparado:

1. Calibrado acuoso directo
2. Calibrado acuoso preparado como las muestras
3. Adición estándar

En primer lugar, se han preparado los patrones acuosos añadiendo la cantidad necesaria de una disolución patrón de $100 \mu\text{g l}^{-1}$ Cr(VI), llevándolos a un volumen final de 1 ml e inyectándolos directamente en el interior del tubo de grafito. A partir de ahora nos referiremos a este modo de calibración como calibrado directo.

A continuación, se han preparado un calibrado y una adición siguiendo el mismo tratamiento que las muestras. Es decir, se ponen en tubos de ensayo diferentes volúmenes de disolución patrón $100 \mu\text{g l}^{-1}$ Cr(VI), se le añaden 2 ml de la disolución tampón HAc/NaAc a pH 6 y 1 ml de TFA al 4%, completando con agua Milli-Q® hasta 4 ml. Se agitan los tubos y se calientan en el microondas durante 2 min a 100 W.

Para la preparación de la adición se han repetido los mismos pasos pero añadiendo 500 μl de una muestra de agua de grifo a cada una de las disoluciones patrón.

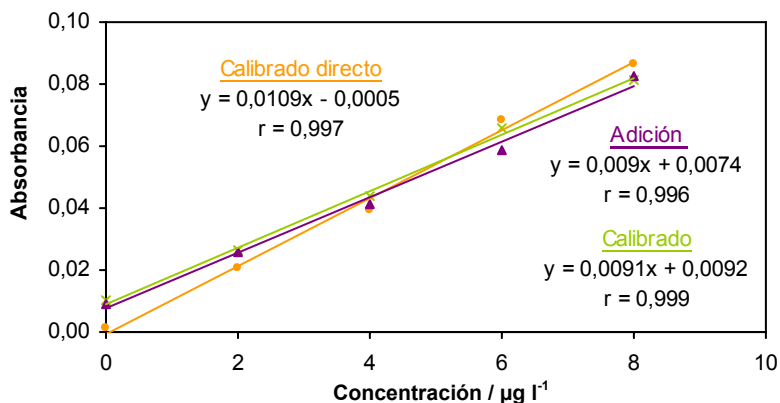


Figura 17. Rectas de calibrado y adición para la determinación selectiva de Cr(VI).

A los resultados obtenidos (Figura 17) se le ha aplicado un test estadístico para la comparación de las pendientes, *t-Student*. Estos ensayos se han repetido en sesiones de trabajo distintas encontrando siempre que no existe diferencia

significativa con un nivel de confianza de 95% entre las rectas de calibrado y adición preparadas como la muestra, pero sí con la recta de calibrado directo. Esto significa que la preparación de la muestra afecta a la absorbancia correspondiente a cada nivel de concentración de Cr(VI). Por ello, para cuantificar la concentración de Cr(VI) en las muestras de agua se ha decidido emplear la recta de calibrado acuoso preparada como la muestra.

1.2.6.2 Sensibilidad

La sensibilidad se ha calculado mediante el límite de detección, LOD y el límite de cuantificación, LOQ, empleando las siguientes ecuaciones:

$$LOD = \frac{3 \times \sigma_{n-1}}{m} \qquad LOQ = \frac{10 \times \sigma_{n-1}}{m}$$

donde σ_{n-1} es la desviación estándar relativa de 11 medidas consecutivas de un blanco y m es la pendiente de la recta de calibración. Los valores obtenidos nos dan un LOD de $0,15 \mu\text{g l}^{-1}$ y un LOQ de $0,52 \mu\text{g l}^{-1}$. Esto significa que el método desarrollado es bastante sensible.

Además se ha calculado la masa característica, m_o , como otra forma de expresar la sensibilidad. Por definición, la masa característica equivale a la masa expresada en picogramos de un analito correspondiente a una absorbancia integrada de 0,0044 y se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$m_o = \frac{V \times C \times 0,0044}{A_c - A_b}$$

donde V es el volumen inyectado, (20 μl); C , la concentración de cada nivel; A_c , la absorbancia correspondiente al nivel de concentración C y A_b , la absorbancia del blanco. Se han analizado varias disoluciones con concentración entre 0 y $8 \mu\text{g l}^{-1}$

Cr(VI) calculando la m_0 para cada una, la media y la desviación estándar. La masa característica resultante es de $6,1 \pm 0,5$ pg (**Tabla 3**)

Tabla 3. Cálculo de la masa característica para la determinación selectiva de Cr(VI).

Concentración/ $\mu\text{g l}^{-1}$	Absorbancia	Masa característica/ pg
0	0,0036	
2	0,0301	6,6
4	0,0679	5,5
6	0,0890	6,2
8	0,1200	6,1
	Media	6,1
	σ	0,5

1.2.6.3 Precisión

Se ha estudiado la precisión del método mediante la repetibilidad y la reproducibilidad. En primer lugar se realizaron 11 inyecciones consecutivas de una muestra de agua dopada con $7 \mu\text{g l}^{-1}$ Cr(VI) (Tabla 4). El coeficiente de variación obtenido fue 0,6 %, el cual implica que la repetibilidad es muy buena.

Tabla 4. Repetibilidad para la determinación selectiva de Cr(VI) en agua.

Absorbancia					
0,1188	0,1184	0,117	0,1176	Media	0,1177
0,1175	0,1183	0,118	0,1181	σ	0,001
0,1178	0,1162	0,1173		% CV	0,6

En segundo lugar se prepararon 5 tubos de ensayo para cada una de las series de concentración 2, 4 y $6 \mu\text{g l}^{-1}$ Cr(VI) y cada uno de estos fue medido por duplicado

(Tabla 5) para el estudio de la reproducibilidad. Los coeficientes de variación obtenidos fueron 5,3%, 6,3% y 5,8% respectivamente, siendo la media del coeficiente de variación $5,8 \pm 0,5\%$.

Tabla 5. Estudio de la reproducibilidad del método de determinación selectiva de Cr(VI) en agua mediante la formación del quelato volátil $\text{Cr}(\text{TFA})_3$.

	Concentración / $\mu\text{g l}^{-1}$		
	2	4	6
Absorbancia	0,0272	0,0453	0,0762
	0,0299	0,0456	0,0753
	0,0301	0,0514	0,0795
	0,0281	0,0434	0,0686
	0,0268	0,0469	0,0790
Media	0,0284	0,0496	0,0757
σ	0,0015	0,0031	0,0044
% CV	5,3	6,3	5,8

El coeficiente de variación es ligeramente alto, aunque menor que el valor establecido como límite, porque engloba la variabilidad de todo el proceso: la preparación y el tratamiento de las muestras, así como la variabilidad instrumental que se puede producir durante la medida. A pesar de ello, el método desarrollado se puede considerar preciso porque el coeficiente de variación está por debajo de 10%.

1.2.6.4 Exactitud

La exactitud del método propuesto se ha estudiado usando el material de referencia certificado CRM 544, disolución de Cr liofilizada (Bureau Community Reference) con una concentración certificada de $22,8 \pm 1,0 \mu\text{g l}^{-1}$ Cr(VI). El material de referencia ha sido reconstituido con 20 ml de una disolución tampón

HNO₃/H₂CO₃ a pH 6,4. Con el fin de mantener el pH, el material de referencia debe ser burbujeado con CO₂ antes de cada uso⁵¹.

En la Tabla 6 se resumen los resultados obtenidos del análisis de 3 alícuotas del material de referencia CRM 544; siendo la concentración media de 22,8 ± 1,5 µg l⁻¹ Cr(VI). No existe una diferencia significativa con un nivel de confianza del 95% entre el valor certificado y la concentración obtenida, al compararlos con un test estadístico, *t-Student*.

Tabla 6. Estudio de la exactitud del método con el material de referencia certificado CRM 544.

	Absorbancia media	Concentración dilución / µg l ⁻¹	Concentración final / µg l ⁻¹
CRM 1	0,0556	3,0	24,3
CRM 2	0,0523	2,7	21,4
CRM 3	0,0539	3,6	22,8
		Media	22,8
		σ	1,5

Además se ha estudiado la recuperación del método desarrollado. Para ello se ha analizado una muestra dopada con 2, 4, 6 y 8 µg l⁻¹ Cr(VI). Comparando la concentración medida con la concentración adicionada se ha obtenido un valor medio de 99,6% de recuperación.

El estudio de la exactitud realizado tanto con el material de referencia certificado como con la recuperación analítica indica que el método propuesto es exacto.

1.2.7 Método propuesto

Esta parte de la tesis ha sido publicada en la revista *Atomic Spectroscopy*⁵², el cual se adjunta en el anexo. Los pasos a seguir para la determinación selectiva de Cr(VI) en agua dulce se representan en el siguiente esquema (Figura 18):

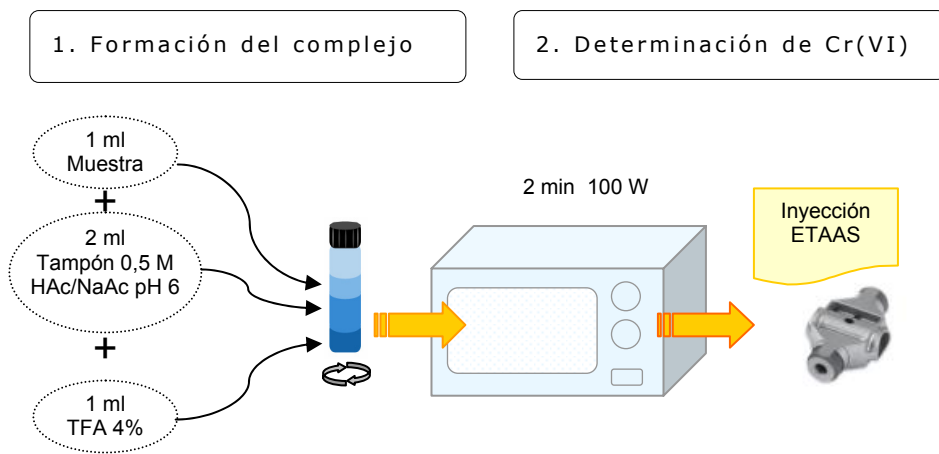


Figura 18. Esquema de la tratamiento de la muestra para el método propuesto de determinación selectiva de Cr(VI) en agua dulce mediante la formación de un quelato volátil por ETAAS.

1.3 APLICACIÓN

Se han analizado muestras de agua del Río Ulla con el fin de estudiar la especiación de cromo. Las muestras fueron recogidas en 5 puntos de la superficie del río Ulla por triplicado en botes de polietileno de alta densidad. Una vez en el laboratorio se han filtrado y congelado hasta el momento del análisis. De cada uno de los botes se han tomado 2 alícuotas y a su vez cada una estas alícuotas fue analizada por triplicado.

La concentración de Cr total se ha determinado mediante un método publicado por Bermejo et al.⁵³. Los resultados obtenidos se resumen en la **Tabla 7**.

Posteriormente, se ha aplicado el método propuesto para la determinación de Cr(VI) descrito anteriormente. Sin embargo, el método propuesto no resulta muy adecuado para la medida de estas muestras porque los niveles de concentración de Cr(VI) son muy bajos.

Tabla 7. Concentración de Cr total en muestras del Río Ulla (18/03/02)

Estación		Concentración Cr Total		
		$\mu\text{g l}^{-1}$	Media	σ
Herbón	1	0,35		
	2	0,22		
	3	0,17	0,3	0,09
Sar	1	1,39		
	2	1,39		
	3	1,39	1,4	0
Cesures	1	0,48		
	2	0,43		
	3	0,43	0,5	0,02
Bexo	1	0,91		
	2	1,08		
	3	1,08	1,0	0,10
Isorna	1	0,91		
	2	0,87		
	3	0,95	0,9	0,04

Las señales de absorbancia de estas muestras son muy similares a la absorbancia del blanco, entonces la señal correspondiente al contenido de Cr(VI) en las muestras es prácticamente cero. Para niveles tan bajos de absorbancia disminuye la fiabilidad de los resultados, aumentando considerablemente los errores cometidos durante el cálculo de las concentraciones que se multiplican teniendo en cuenta la dilución de la muestra.

Únicamente se puede realizar una estimación, la concentración de Cr en las muestras del Río Ulla está entorno a $1 \mu\text{g l}^{-1}$. Por lo tanto, para cuantificar la presencia de Cr(VI) en estas muestras es necesario emplear un método más sensible o incluir una etapa de preconcentración.

2 Muestras de agua de mar

2.1 INTRODUCCIÓN

La concentración habitual de Cr en agua de mar es $0,2 \mu\text{g l}^{-1}$ según la tabla de composición normal del agua de mar dada por Turekian⁵⁴. Aunque los cálculos termodinámicos predicen que CrO_4^{-2} es la forma mayoritaria en agua de mar, se han encontrado cantidades apreciables de Cr(III) en aguas oxigenadas. La reducción de Cr(VI) por la materia orgánica o catalizada por partículas inorgánicas en suspensión como los nódulos de Mn y la estabilización de Cr(III) por complejación con ligandos orgánicos explican la presencia de Cr(III) por encima de los valores teóricos⁵⁵⁻⁵⁷.

La Comunidad Autónoma de Galicia en la Ley 8/2001 de Protección de la Calidad de las Aguas de las Rías de Galicia y de Ordenación del Servicio Público de Depuración de Aguas Residuales Urbanas, publicada en el BOE del 25 de septiembre del 2001, ha establecido los valores máximos permitidos en las Rías para Cr total en $50 \mu\text{g l}^{-1}$. Además dicha Ley especifica que la concentración de Cr(VI) no debe superar $5 \mu\text{g l}^{-1}$.

2.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL

Tomando como referencia el método desarrollado anteriormente para el análisis de agua, se ha realizado la optimización de un método para la determinación de Cr(VI) en agua de mar. Para lo cual se ha empleado agua de mar sintética preparada siguiendo la recomendación propuesta por Baxter⁵⁸ disolviendo 32 g de NaCl, 14 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0,15 g de NaHCO_3 en 1 litro de agua Milli-Q®.

2.2.1 Equipamiento

2.2.1.1 Aparatos

Las medidas se han realizado usando el espectrómetro Perkin-Elmer Model 4100ZL equipado con una cámara de grafito de calentamiento transversal (THGA) y el automuestreador AS 71. Se han utilizado tubos de grafito pirolítico con plataforma L'vov. Este equipo además dispone de un corrector de fondo Zeeman. Se ha usado una lámpara de cátodo hueco trabajando a 12 mA, la cual proporciona una longitud de onda de 357,9 nm con un ancho de banda espectral de 0,7 nm. Para la evaluación de los resultados se ha empleado la absorbancia integrada durante 5 segundos. El volumen de muestra inyectado fue 20 μ l.

Además se ha usado un pHmetro ThermoOrion Modelo 720A+ y un horno microondas domestico Panasonic NN-5256 para la preparación de las muestras.

2.2.1.2 Reactivos

- Disolución patrón de Cr(III) de 1000 mg l⁻¹Cr(NO₃)₃ (Merck, Alemania).
- Disolución patrón de Cr(VI) de 1000 mg l⁻¹ Cr preparada disolviendo K₂Cr₂O₇ (99%) (Aldrich Chemical, USA) y conservada a 4°C.
- NaCl para análisis, (Merck, Alemania),
- MgSO₄·7H₂O, PA-ACS (Panreac, España)
- NaHCO₃ para análisis (Merck, España)
- Acetato sódico, (Panreac, España).
- Ácido acético glacial, HPLC grado. (Scharlau, España).
- 1,1,1-trifluoro-2,4-pentadiona (TFA) 99%. (Avocado-Panreac Sintesis, España).

- Agua ultrapura. Resistividad 18 M Ω cm usando el sistema de purificación de agua Milli-Q[®] (Millipore).
- Argón N50 pureza: 99,999%, empleado como gas de purga y refrigeración en el atomizador.

2.2.1.3 Limpieza del material

Todo el material necesario, antes de ser utilizado, fue lavado cuidadosamente con agua y jabón, se enjuagan con agua Milli-Q[®] y se mantienen durante 48 horas en una disolución de HNO₃ al 10%. Posteriormente se vuelve a enjuagar con agua Milli-Q[®] y se almacena seco y listo para su uso en un lugar libre de polvo.

2.2.2 Formación del complejo. Optimización

Como se ha comprobado, la β -dicetona, 1,1,1-trifluoro-2,4-pentadiona (TFA) reacciona selectivamente con Cr(III), permitiendo la separación de esta especie para una determinación selectiva de Cr(VI) en muestras de agua. No obstante, debemos revisar los parámetros que influyen en la formación del complejo Cr-TFA debido a que las muestras de agua de mar presentan una matriz más compleja que puede afectar a la eficacia de esta reacción.

2.2.2.1 Influencia del pH de la disolución tampón

Realizamos un primer ensayo variando el pH entre 3 y 8 preparando la disolución tampón con diferentes proporciones de ácido acético 0,2 M y acetato sódico 0,2 M. Para obtener valores de pH superiores a 6 es necesario añadir unas gotas de NaOH. La señal de absorbancia disminuye a medida que se aumenta el pH, y parece que entorno a pH 6 se dan las condiciones óptimas (Figura 19), ya que se alcanza un mínimo en la absorbancia para la disolución dopada con Cr(III).

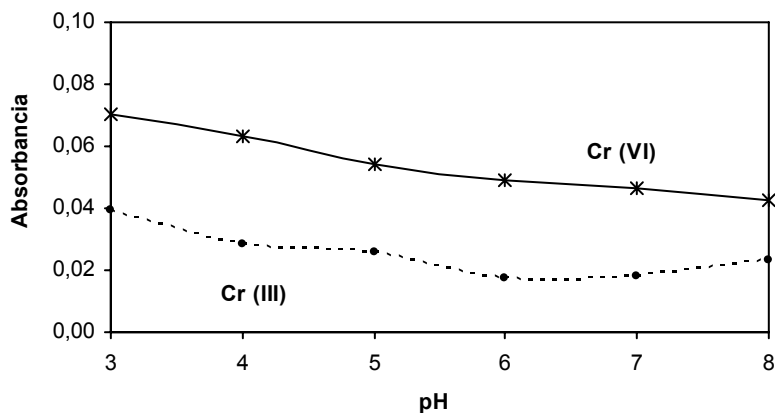


Figura 19. Ensayo preliminar de la influencia del pH de la disolución tampón HAc/NaAc 0,2 M en la formación del complejo $\text{Cr}(\text{TFA})_3$ en agua de mar.

Con el fin de asegurarnos de que estamos trabajando al pH idóneo, se ha realizado un nuevo ensayo más exhaustivo con incrementos de pH menores sobre agua de mar sintética dopada con $5 \mu\text{g l}^{-1}$ de Cr(III). Además se ha estudiado la influencia de la concentración del ácido acético y el acetato sódico preparando las distintas disoluciones tampón a partir de disoluciones de 0,2 M y 0,5 M (Figura 20).

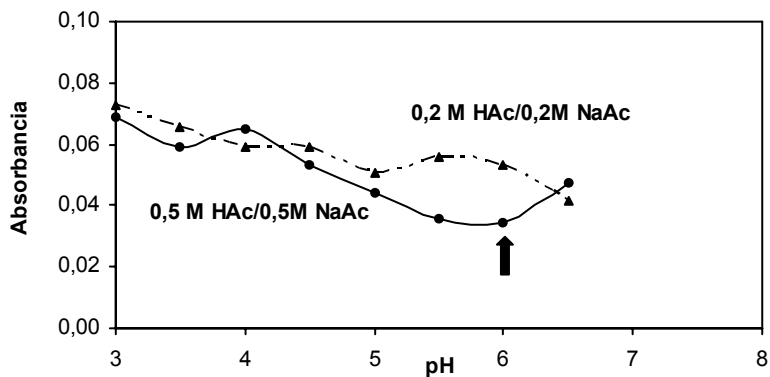


Figura 20. Influencia del pH de la disolución tampón sobre agua de mar dopada con $5 \mu\text{g l}^{-1}$ Cr(III). Comparación de la concentración de las disoluciones HAc/NaAc entre 0,2 M y 0,5 M.

La absorbancia obtenida para la muestra dopada con Cr(III) usando la disolución tampón 0,5M HAc/ 0,5 M NaAc es menor que para la disolución tampón 0,2M HAc/ 0,2 M NaAc. Esto indica que el aumento de la fuerza iónica favorece la reacción de formación del complejo Cr(TFA)₃. El mínimo de absorbancia se obtiene a pH 6, lo que implica una mayor eficacia en la separación del Cr(III). Además con la disolución tampón de 0,5M HAc/ 0,5 M NaAc evitamos la adicción de NaOH para alcanzar el pH deseado.

2.2.2.2 Potencia del microondas y el tiempo de calentamiento

Para estudiar el tiempo de calentamiento y la potencia del microondas preparamos una serie de disoluciones dopadas con 5 µg l⁻¹ Cr(III) y otras con la misma concentración de Cr(VI). A continuación se someten a diferentes tiempos de exposición entre 1 y 5 min variando la potencia entre 100 y 300 W.

Se ha observado que con tiempos de calentamiento superiores a 2 min se volatiliza tanto el Cr(III) como el Cr(VI). Esta pérdida de Cr(VI) contradice el objetivo de este método que consiste en la separación de Cr(III) para la determinación selectiva de Cr(VI). Entonces se ha probado con secuencias de calentamiento gradual intercalando períodos de enfriamiento de 1 min.

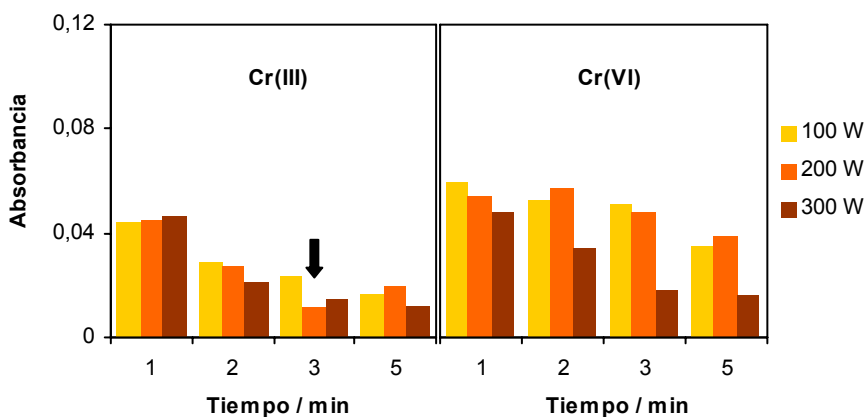


Figura 21. Potencia del microondas y tiempo de calentamiento para agua de mar sintética dopada con 5 µg l⁻¹ Cr(III) o 5 µg l⁻¹ Cr(IV).

Como se puede ver en la gráfica (Figura 21), la señal de absorbancia disminuye a 300 W para ambas disoluciones dopadas con Cr(III) o Cr(VI), respecto a las señales obtenidas a potencias inferiores. Por ello, se descarta 300 W como potencia de calentamiento.

La formación del complejo $\text{Cr}(\text{TFA})_3$ sin pérdida de Cr(VI) se ha logrado cuando las muestras son sometidas a 200 W de potencia durante 3 min (2 min calentando, seguido de 1 min de reposo y 1 min más calentando). Por lo que se han seleccionado estas condiciones para la formación del complejo.

2.2.2.3 Cantidad de agente complejante TFA

La influencia de la cantidad de TFA sobre la absorbancia producida por una muestra dopada con Cr(III) se ha estudiado variando la concentración entre 0 y 20%. Una reducción de la señal de absorbancia indica un incremento en la eficacia de la formación del complejo $\text{Cr}(\text{TFA})_3$. Los resultados obtenidos en una primera aproximación se muestran en la figura 22.

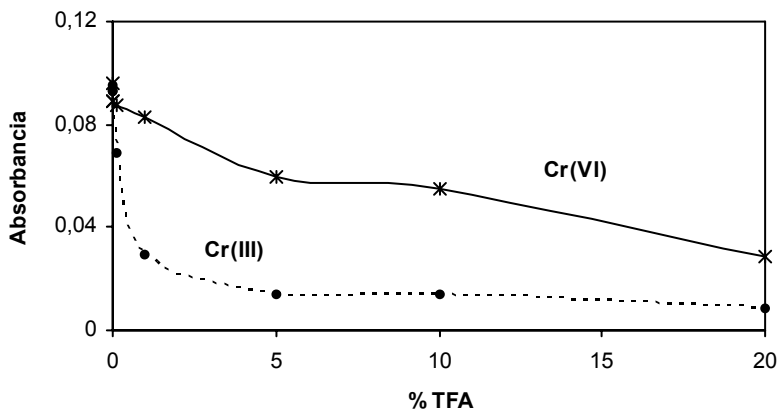


Figura 22. Estudio preliminar de la concentración de TFA para agua de mar.

De ella se deduce que el valor óptimo está entorno al 5%. Entonces se ha realizado un segundo experimento con incrementos de concentración menores.

A la vista de los resultados que se muestran en la figura 23 se podría tomar TFA al 10% como cantidad idónea porque la señal de Cr(III) correspondiente, es la menor de las obtenidas. Sin embargo, la disminución de la absorbancia para Cr(III) respecto al 5% no es tan significativa en comparación con el aumento de la masa de TFA necesaria. Por lo que se ha seleccionado como concentración óptima el 5% de TFA teniendo en cuenta el ahorro de la cantidad de agente complejante necesaria. Además realizando el mismo experimento para una disolución de agua de mar sintética dopada con Cr(VI) (Figura 22) se ha observado disminución en la sensibilidad al añadir concentraciones de TFA por encima del 5%.

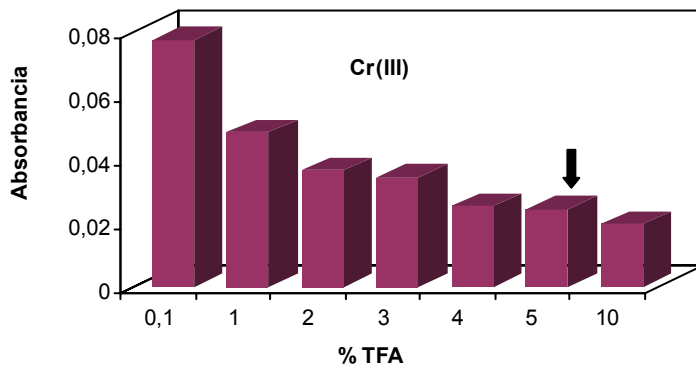


Figura 23. Optimización de la cantidad de TFA para agua de mar.

2.2.3 Optimización del programa de temperaturas de la cámara de grafito

Una vez estudiadas las condiciones de formación del complejo, se ha optimizado el programa de temperatura de la cámara de grafito para:

- patrón con $5 \mu\text{g l}^{-1}$ Cr(VI) preparado en agua de mar sintética.
- patrón con $5 \mu\text{g l}^{-1}$ Cr(III) preparado en agua de mar sintética tratado como la muestra, tamponado a pH 6, añadiendo TFA al 5% y calentándolos gradualmente 3 min a 200 W en un microondas.

- patrón con $5 \mu\text{g l}^{-1}$ Cr(VI) preparado en agua de mar sintética tratado como la muestra.

Por un lado, se han realizado los ensayos sin modificador de matriz y por otro lado se han empleado como modificadores de matriz una disolución de 200 mg l^{-1} de Pd ó una disolución de 20 mg l^{-1} de CaCl_2 . Los resultados obtenidos se representan en la figura 24.

Con la muestra dopada con Cr(III) se ha estudiado únicamente la curva de mineralización. Así comprobamos que temperatura es posible alcanzar durante la etapa de mineralización, de tal modo que se volatilice la mayor parte de Cr(III) sin reducir la señal correspondiente al Cr(VI), que es lo que deseamos determinar.

Comparando los valores de absorbancia, la forma de los picos y la señal de fondo obtenidos para cada temperatura de mineralización y atomización, para el patrón y para la muestra, con y sin modificador se han elegido como temperaturas óptimas de mineralización y atomización 1600°C y 2300°C , respectivamente.

Considerando únicamente los valores de absorbancia no se aprecia una mejoría considerable con la adición de modificadores de matriz, por ello debemos tener en cuenta la forma de las señales (Figura 25) para tomar una decisión respecto al uso de modificador. La adición de Pd mejora la forma de la señal mientras que con el CaCl_2 empeora, volviéndose más ruidosa en todos los casos. Claramente se descarta el uso de CaCl_2 como modificador de matriz.

La duda surge con el Pd porque, a pesar de conseguir una ligera mejoría en la sensibilidad para los patrones acuosos se produce un aumento considerable en la señal de fondo de la muestra. Por ello, se ha decidido descartar el uso de Pd, simplificándose así el análisis de las muestras.

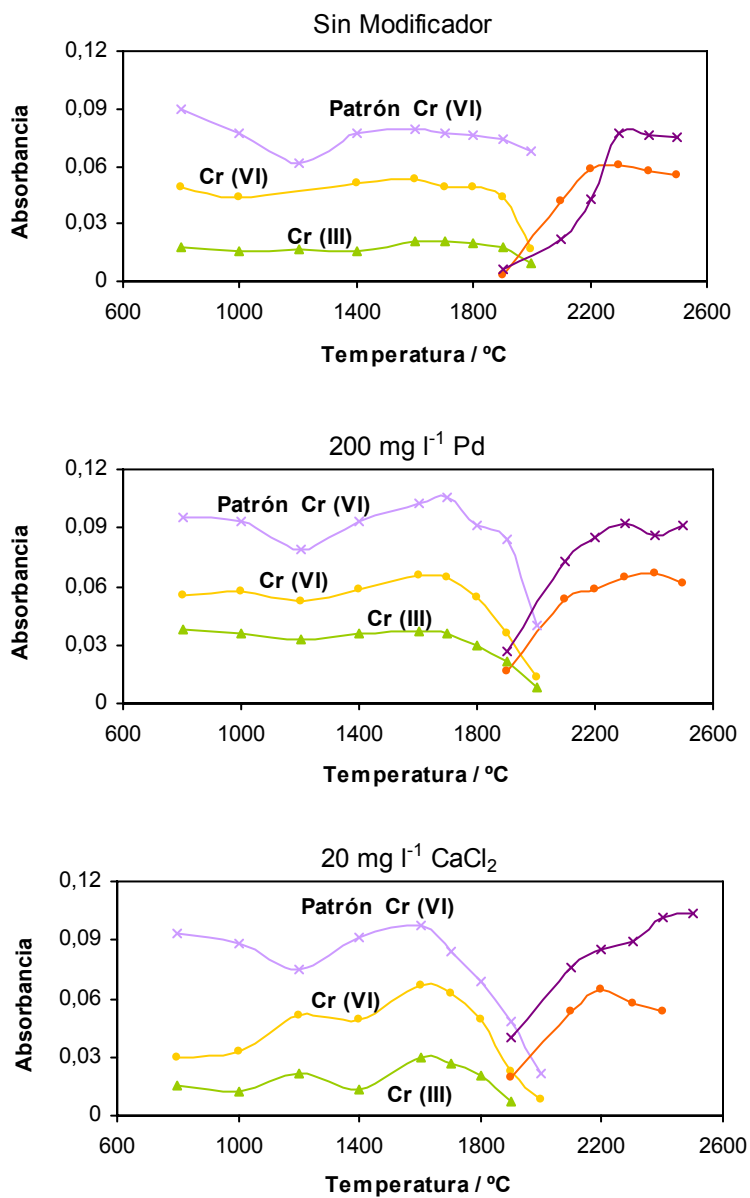


Figura 24. Curvas de mineralización- atomización para muestras de agua de mar sintética dopadas con Cr(III) y Cr(VI) y patrón con 5 µg l⁻¹ de Cr(VI).

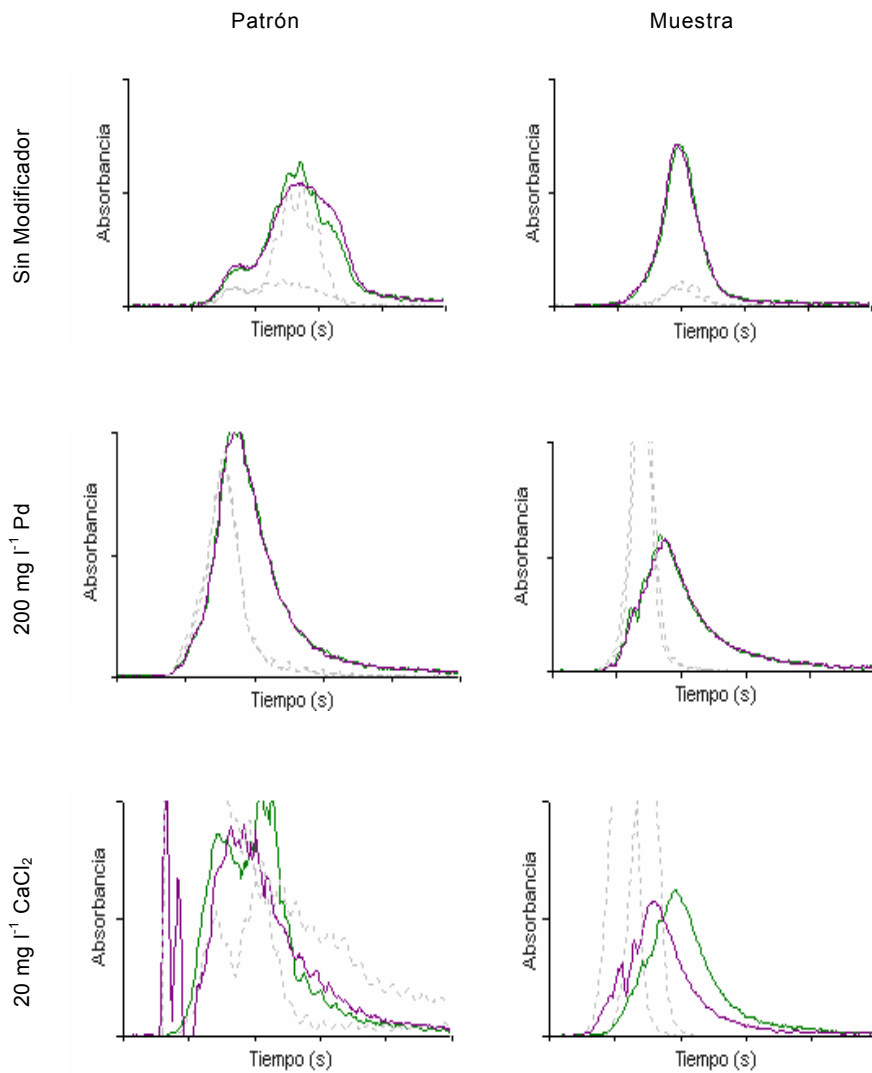


Figura 25. Perfiles de absorbancia obtenidos a 1600°C en la etapa de mineralización para el patrón y la muestra de agua de mar sintética de 5 $\mu\text{g l}^{-1}$ de Cr(VI)

En conclusión, no es necesaria la adición de modificador de matriz empleando el programa de temperaturas de la cámara de grafito optimizado que se resume en la tabla 8.

Tabla 8. Programa de temperaturas de la cámara de grafito para la determinación selectiva de Cr(VI) en agua de mar.

Etapa	Temperatura / °C	Rampa / s	Permanencia / s	Flujo Ar / ml min ⁻¹
Secado I	110	1	10	250
Secado II	130	5	30	250
Mineralización	1600	10	20	250
Atomización	2300	0	5	0
Limpieza	2450	1	3	250

2.2.4 Características analíticas

A continuación se han estudiado las rectas de calibrado y adición, la sensibilidad, la precisión y la exactitud del método para la determinación selectiva de Cr(VI) en muestras de agua de mar mediante la formación de un quelato volátil.

2.2.4.1 Rectas de calibrado y adición

Con el fin de seleccionar el método de calibración para la cuantificación de Cr(VI) en muestras de agua de mar comparamos las rectas de calibración y de adición estándar (Figura 26).

La recta de calibrado directo se ha obtenido analizando directamente varias disoluciones de agua de mar sintética variando entre 0 y 8 $\mu\text{g l}^{-1}$ la concentración de Cr(VI). Por otro lado, se ha considerado el proceso de formación del complejo, tratando los patrones con el mismo procedimiento que para las muestras. En tubos

de ensayo se pipetea diferentes volúmenes de una disolución patrón de $100 \mu\text{g l}^{-1}$ Cr(VI) para obtener las concentraciones deseadas, teniendo en cuenta el volumen final. Se añaden 2 ml de disolución tampón HAc/NaAc a pH 6 y 1 ml de TFA al 5%, completando con agua de mar sintética hasta un volumen final de 4 ml. Finalmente se agitan los tubos y se calientan durante 3 min a 200 W. Para la preparación de la adición estándar se ha tomado un volumen fijo de una muestra de agua de mar, 500 μl y se repite el proceso.

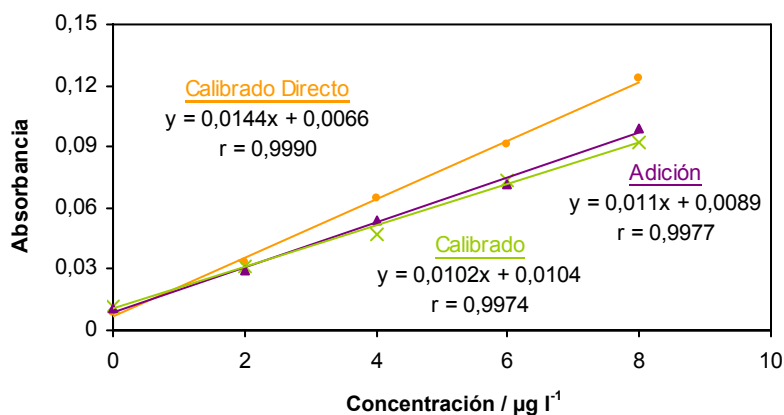


Figura 26. Rectas de calibrado y adición para la determinación de Cr(VI) en agua de mar.

Se han comparado los resultados aplicando un test estadístico, *t-Student*, con un nivel de confianza del 95%. No se han encontrado diferencias significativas entre las pendientes de las rectas de calibrado y de adición estándar tratando los patrones como a las muestras. Sin embargo, si existen diferencias significativas respecto a la recta de calibrado directo. Esto implica que el tratamiento de las muestras afecta a la calibración; lo cual es razonable puesto que estamos diluyen los patrones y modificando la matriz.

De este estudio se concluye que el método de calibración más adecuado es la calibración preparando las disoluciones siguiendo el mismo tratamiento que para las muestras.

2.2.4.2 Sensibilidad

La sensibilidad se ha calculado mediante el límite de detección (LOD) el límite de cuantificación (LOQ) y la masa característica. El cálculo de estos parámetros se ha realizado empleando las ecuaciones detalladas en el apartado 1.2.6.2. Se han medido 11 réplicas del blanco para el cálculo del LOD y LOQ, resultando $0,5 \mu\text{g l}^{-1}$ y $1,8 \mu\text{g l}^{-1}$, respectivamente.

Además se ha calculado la masa característica analizando una muestra dopada con diferentes niveles de concentración de Cr(VI). La masa característica obtenida para este método fue de $7,3 \pm 0,5 \text{ pg}$. En la Tabla 9 se resumen los valores de absorbancia obtenidos y la masa característica para cada uno de los niveles de concentración.

Tabla 9. Cálculo de la masa característica para la determinación de Cr(VI) en agua de mar.

Concentración / $\mu\text{g l}^{-1}$	Absorbancia	Masa característica / pg
0	0,0138	
2	0,0389	7,0
4	0,0590	7,8
6	0,0847	7,5
8	0,1168	6,8
	Media	7,3
	σ	0,5

Debido a que la concentración normal de Cr en agua de mar se encuentra entorno al límite de cuantificación, LOQ, es probable que sea necesario preconcentrar antes de aplicar este método para la especiación de Cr(VI) en ciertas muestras;

sobre todo, en muestras de agua de mar oceánica donde los niveles de Cr suelen ser más bajos.

2.2.4.3 Precisión

A continuación, se ha estudiado la precisión del método teniendo en cuenta los factores instrumentales y de la matriz mediante la reproducibilidad; así como la repetibilidad de la inyección.

La repetibilidad se ha calculado como el coeficiente de variación correspondiente a 11 réplicas consecutivas de una muestra. En este caso se ha obtenido 1,2% de coeficiente de variación (Tabla 10).

Tabla 10. Repetibilidad para la determinación selectiva de Cr(VI) en agua de mar.

Absorbancia					
0,0466	0,0458	0,0456	0,0445	Media	0,0455
0,0455	0,0453	0,0457	0,0458	σ	0,001
0,045	0,0454	0,0458		% CV	1,2

La reproducibilidad se expresa como el coeficiente de variación de varias réplicas de distintas muestras dopadas a diferentes niveles de concentración que van de 2 a 6 $\mu\text{g l}^{-1}$ Cr(VI). El coeficiente de variación medio de las 3 series ha sido 6,4 % (Tabla 11). Este valor, aunque aceptable, es ligeramente alto debido a la variabilidad acumulada de la preparación de la muestra y de la medida en el equipo de ETAAS.

Finalizado este estudio se puede afirmar que el método propuesto es preciso ya que los coeficientes de variación son inferiores al 10% tanto para la repetibilidad como para la reproducibilidad.

Tabla 11. Estudio de la reproducibilidad del método de determinación de Cr(VI) en agua de mar.

	Concentración/ $\mu\text{g l}^{-1}$		
	2	4	6
Absorbancia	0,0317	0,0498	0,0864
	0,0366	0,0535	0,0821
	0,0353	0,0497	0,0835
	0,0348	0,0612	0,0843
	0,0353	0,0577	0,0835
	0,0303	0,0541	0,0791
	0,0334	0,0567	0,0747
Media	0,0339	0,0547	0,0819
σ	0,0022	0,0042	0,0039
% CV	6,6	7,7	4,8

2.2.4.4 Exactitud

La exactitud del método se ha evaluado únicamente mediante la recuperación analítica, porque no existe un material de referencia certificado para Cr(VI) de agua de mar. Los materiales de referencia disponibles sólo certifican la concentración de Cr total.

La recuperación analítica representa la diferencia entre la concentración obtenida y la concentración adicionada, expresada en porcentaje. Para ello, se ha preparado una muestra dopada con 2, 4, 6 y 8 $\mu\text{g l}^{-1}$ Cr(VI). Los cocientes obtenidos entre la concentración calculada y la concentración adicionada para cada una de las series se resumen en la Tabla 12, dan una recuperación media de un 101,8%.

La recuperación analítica está muy próxima al 100%, lo que nos indica que el método propuesto para la determinación selectiva de Cr(VI) en agua de mar es un método exacto.

Tabla 12. Cálculo de la recuperación analítica de la determinación selectiva de Cr(VI) en agua de mar.

Concentración / $\mu\text{g l}^{-1}$	Absorbancia	Concentración calculada / $\mu\text{g l}^{-1}$	Recuperación / %
0	0,0100	----	----
2	0,0292	1,8	92,2
4	0,0537	4,2	106,1
6	0,0717	6,0	100,2
8	0,0993	8,7	108,9
		Media	101,8
		σ	7,5
Recta calibrado $y = 0,0102 x + 0,0104$			

2.2.5 Método propuesto

Después de haber revisado todos los parámetros, únicamente se ha variado la cantidad de agente complejante, TFA y el calentamiento en el microondas respecto al método de partida para la determinación selectiva de Cr(VI) en agua.

El tratamiento de las muestras de agua de mar para la formación del complejo $\text{Cr}(\text{TFA})_3$ es el siguiente:

- Tomar 1 ml de muestra
- Añadir 2 ml de disolución tampón 0,5M ácido acético/ 0,5 M acetato sódico.
- Añadir 1 ml de TFA al 5%.
- Calentar gradualmente en el microondas. (2 min a 200W, 1 min de reposo y 1 min más de calentamiento a 200W).

2.3 APLICACIÓN

El método desarrollado ha sido aplicado para la especiación de Cr en muestras tomadas en la Ría de Arousa. Las muestras fueron recogidas el 7 de febrero del 2003 en 21 estaciones distribuidas uniformemente por toda la Ría a bordo del buque oceanográfico *Mitylus* del CSIC y en 7 estaciones en la desembocadura del Río Ulla en la embarcación auxiliar tal y como se representa en la figura 27.

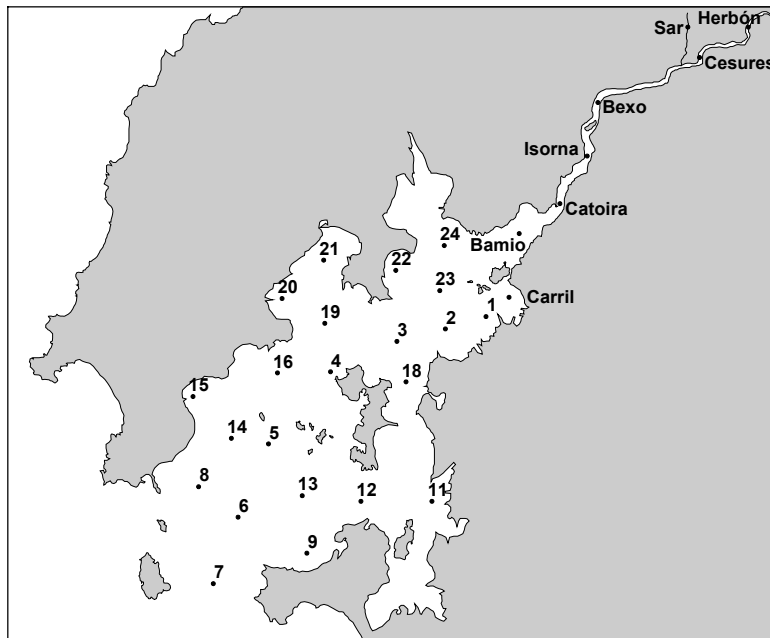


Figura 27. Mapa de estaciones de muestreo en la Ría de Arousa

Las muestras fueron tomadas en la superficie y a 1 m del fondo usando botellas “Niskin”. Además se tomaron muestras a 20 m de profundidad en las estaciones situadas a lo largo del eje de la Ría. En las estaciones de la desembocadura únicamente se han tomado muestras en la superficie. De cada una de las botellas se tomaron 3 réplicas en botes de polietileno de alta densidad. Una vez en el laboratorio se filtraron a través de un filtro de 45 μm y se congelaron hasta el análisis. A su vez cada una de las réplicas fue analizada por triplicado.

En primer lugar se ha analizado la concentración de Cr total siguiendo el método publicado por Bermejo-Barrera et al.⁵⁹ Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 13 y las figuras 28 y 29.

Tabla 13. Concentración de Cr total en muestras de la Ría de Arousa (07/02/03)

Estación	Profund. / m	Cr Total / $\mu\text{g l}^{-1}$	σ
1	0	0,7	0,03
	5	0,2	0,01
2	0	0,7	0,02
	17	0,4	0,02
3	0	1,0	0,08
	20	0,5	0,04
4	0	0,6	0,02
	20	0,4	0,03
	45	0,4	0,01
5	0	0,6	0,03
	20	0,5	0,03
	50	0,6	0,03
6	0	0,6	0,04
	20	0,5	0,15
	43	0,6	0,09
7	0	1,4	0,22
	20	0,9	0,10
	58	0,9	0,04
8	0	0,3	0,01
	40	0,2	0,06
9	0	n. d.	----
	19	n. d.	----
11	0	n. d.	----
	6	n. d.	----
12	0	0,6	0,04
	18	0,3	0,03
13	0	0,3	0,02
	27	0,32	0,03

Estación	Profund. / m	Cr Total / $\mu\text{g l}^{-1}$	σ
14	0	0,7	0,03
	36	0,4	0,01
15	0	0,4	0,01
	25	0,3	0,02
16	0	0,7	0,06
	31	0,3	0,03
18	0	0,3	0,03
	12	n. d.	----
19	0	0,2	0,01
	32	0,3	0,10
20	0	0,5	0,01
	10	n. d.	----
21	0	0,4	0,05
	14	n. d.	----
22	0	1,6	0,03
	9	1,4	0,09
24	0	1,5	0,09
	6	1,5	0,06
Carril	0	0,5	0,00
Bamio	0	0,5	0,06
Isorna	0	n. d.	----
Catoira	0	0,3	0,02
Bexo	0	0,2	0,14
Cesures	0	0,3	0,02
Herbón	0	n. d.	----
Sar	0	0,4	0,05

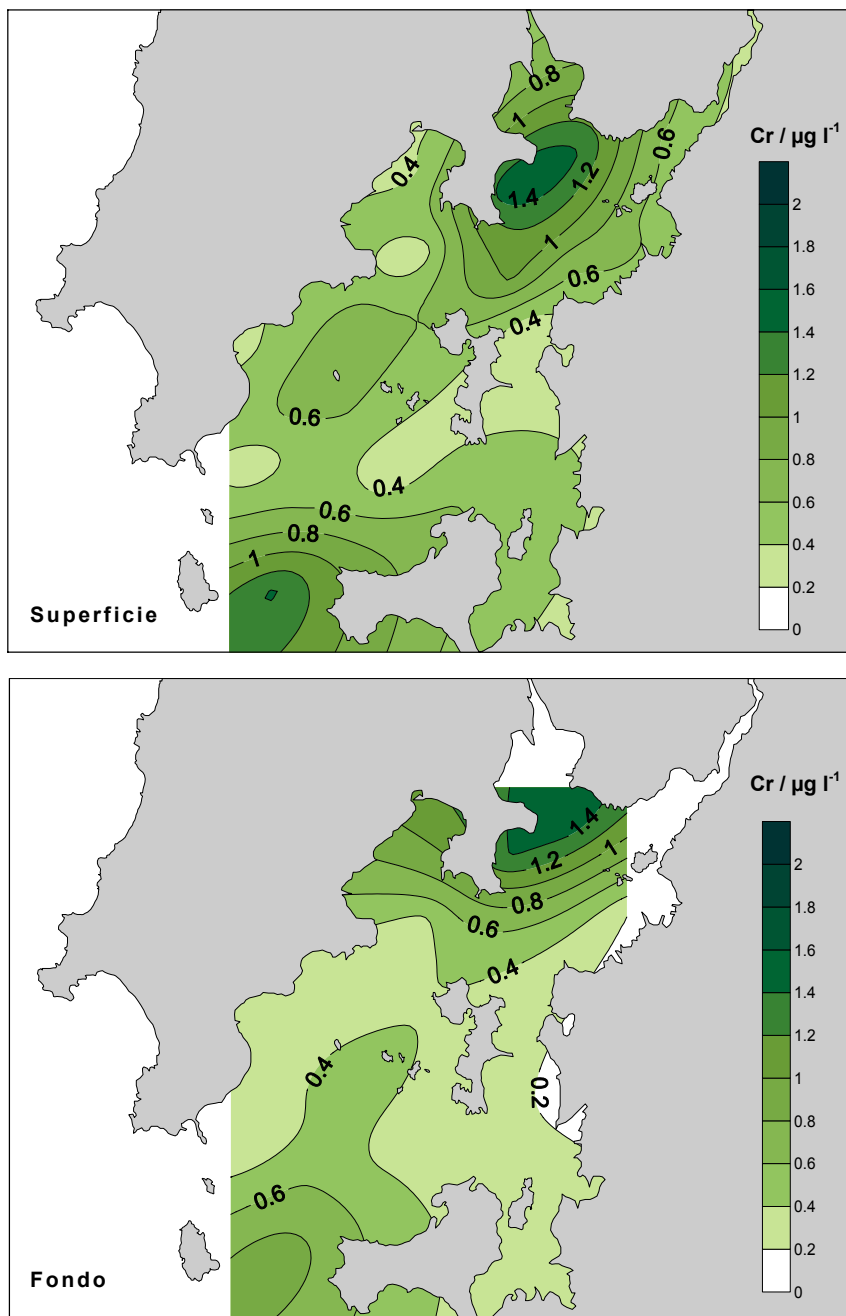


Figura 28. Distribución de Cr total en la superficie y el fondo de la Ría de Arousa (07/02/03).

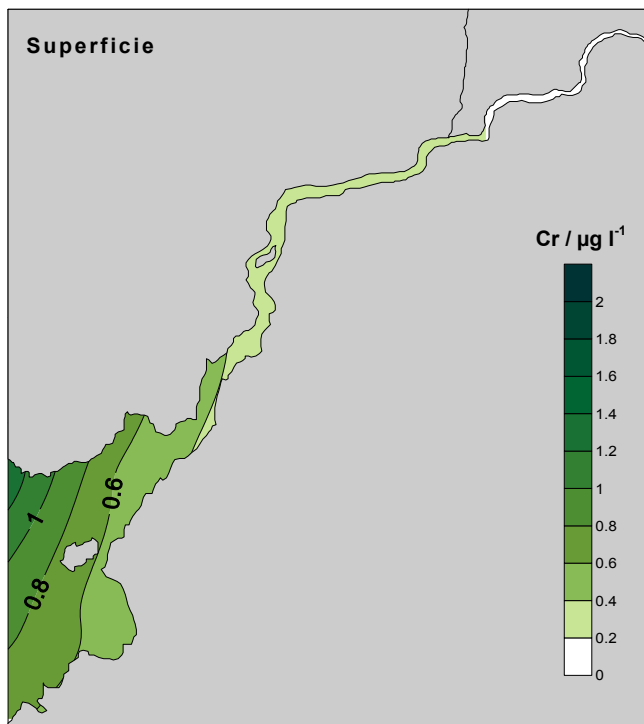


Figura 29. Distribución de Cr total en la superficie de la desembocadura del Río Ulla (07/02/03).

Posteriormente se ha determinado la concentración de Cr(VI) aplicando el método propuesto en aquellas muestras cuya concentración de Cr total supere el límite de detección de este método. Se han tomado 2 alícuotas de cada bote y cada una de ellos se ha analizado por triplicado.

Los valores de concentración obtenidos para la mayoría de las muestras están por debajo del límite de cuantificación del método $1,8 \mu\text{g l}^{-1}$ (Tabla 14). La determinación de Cr(VI) en estas muestras requiere un método más sensible o incluir una etapa de preconcentración, ya que como se ha comprobado con el método propuesto no es posible.

Tabla 14. Concentración de Cr (VI) en muestras de la Ría de Arousa (07/02/03)

Estación	Replica	Concentración Cr(VI)		
		$\mu\text{g l}^{-1}$	Media	σ
1-0	1	0,8		
	2	0,6		
	3	1,0	0,8*	0,2
2-0	1	0,7		
	2	----		
	3	1,1	0,9*	0,3
3-0	1	0,9		
	2	0,4		
	3	0,4	0,7*	0,3
4-0	1	0,7		
	2	1,0		
	3	0,5	0,7*	0,2
5-0	1	0,5		
	2	0,5		
	3	0,8	0,6*	0,2
6-0	1	1,1		
	2	1,1		
	3	1,6	1,3*	0,3
7-0	1	3,1		
	2	2,6		
	3	2,4	2,7	0,4
7-20	1	1,5		
	2	3,9		
	3	4,3	3,2	1,6
7-58	1	3,3		
	2	1,1		
	3	4,2	2,9	1,6
12-0	1	0,8		
	2	1,5		
	3	1,0	1,1*	0,4
14-0	1	0,1		
	2	0,4		
	3	0,1	0,2*	0,2
22-0	1	----		
	2	1,5		
	3	1,3	1,4*	0,1
22-9	1	0,9		
	2	1,4		
	3	----	1,2*	0,4
24-0	1	----		
	2	0,8		
	3	----	0,8*	----
24-6	1	----		
	2	----		
	3	0,8	0,8*	----

* Estos valores son inferiores al límite de cuantificación 1,8 $\mu\text{g l}^{-1}$

3 Bibliografía

- [1]. Kotal, C., Volatile metal chelate complexes. *Journal of Chemical Education* **1975**, 52, (5), 319-322.
- [2]. Berg, E. W.; Truemper, J. T., A study of the volatile characteristics of various metal beta-diketone chelates. *J. Phys. Chem.* **1960**, 64, 487-490.
- [3]. Berg, E. W.; Truemper, J. T., Vapor Pressure-Temperature Data for Various Metal β -diketone Chelates. *Anal. Chim. Acta* **1965**, 32, 245-252.
- [4]. Sievers, R. E.; Ponder, B. W.; Morris, M. L.; Moshier, R. W., Gas Phase Chromatography of Metal Chelates of Acetylacetone, Trifluoroacetylacetone and Hexafluoroacetylacetone. *Inorganic Chemistry* **1963**, 2, (4), 693-698.
- [5]. Scriber, W. G.; Treat, W. J.; Weis, J. D., Solvent extraction of Metal Ions with Trifluoroacetylacetone. *Anal. Chem.* **1965**, 37, (9), 1136-1142.
- [6]. Bailey, B. W.; Lo, F., Direct Volatilization of Inorganic Chelates as a Method of Sample Introduction in Atomic Absorption Spectrometry. *Anal. Chem.* **1972**, 44, (7), 1304-1306.
- [7]. Wolf, W. R.; Taylor, M. L.; Hugnes, B. M.; Tiernan, T. O.; Sievers, R. E., Determination of Chromium and Beryllium at the Picogram Level by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **1972**, 44, (3), 616-618.
- [8]. Wolf, W. R., Coupled Gas Chromatography-Atomic Absorption Spectrometry for the Nanogram Determination of Chromium. *Anal. Chem.* **1976**, 48, (2), 1717-1720.
- [9]. Black, M. S.; Thomas, M. B.; Browner, R. F., Determination of Metal Chelates by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry and Applications to Biological Materials. *Anal. Chem.* **1981**, 53, 2224-2228.
- [10]. Black, M. S.; Browner, R. F., Volatile Metal-Chelate Sample Introduction for Inductively Coupled Plasma. *Anal. Chem.* **1981**, 53, 249-253.
- [11]. Fahlam, B. D.; Barron, A. R., Substituent Effects on the Volatility of Metal β -diketonates. *Adv. Mater. Opt. Electron.* **2000**, 10, 223-232.
- [12]. Berg, E. W.; Acosta, J. J. C., Fractional Sublimation of the β -diketone Chelates of the Lanthanide and Related Elements. *Anal. Chim. Acta* **1968**, 40, 101-113.
- [13]. Leskelä, M.; Niinistö, L.; Nykänen, E.; Soininen, P.; Tiitta, M., Thermoanalytical and Mass Spectrometric Studies on Volatile β -diketone Chelates. *Thermochemica Acta* **1991**, 175, 91-98.
- [14]. Uden, P. C.; Henderson, D. E.; DiSanzo, F. P.; Lloyd, R. J.; Tetu, T., Applications of Dexsil and Other Gas Chromatographic Prous-Layer Open Tubular Columns to Metal Compound Separations and Pyrolysis. *J. Chromatogr.* **1980**, 196, 403-414.
- [15]. Castillo, J. R.; Mir, J. M.; Bendicho, C., Determination of Chromium by AAS using Volatile β -Diketonate Complexes. *Fresenius Z. Anal. Chem.* **1987**, 328, 56-60.
- [16]. Siu, K. W. M.; Bednas, M. E.; Berman, S. S., Determination of Chromium In Seawater by Isotope Dilution Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **1983**, 55, 473-476.

- [17]. Mugo, R. K.; Orians, K. J., Seagoing method for the determination of chromium(III) and total chromium in sea water by electron-capture detection gas chromatography. *Anal. Chim. Acta* **1993**, 271, (1), 1-9.
- [18]. Castillo, J. R.; Garcia, E.; Delfa, J.; Mir, J. M.; Bendicho, C., Determination of Chromium, Cobalt and Iron by Flame-Atomic Absorption Spectrophometry using Volatilization of Metal Trifluoroacetyl Acetonates. *Microchemical Journal* **1990**, 42, 103-109.
- [19]. An, Y.; Willie, S. N.; Sturgeon, R. E., In situ concentration of volatile chromium β -diketonate for the determination by GFAAS. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1992**, 344, 64-65.
- [20]. Castillo, J. R.; Mir, J. M.; Bendicho, C., Effect of Matrix Components on Chromium Atomization Processes in Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B* **1988**, 43, 263-271.
- [21]. Fung, Y.; Sham, W., Determination of Chromium in River Water Samples by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. *Analyst* **1994**, 119, 1029-1032.
- [22]. Dungs, K.; Lippmann, C.; Neidhart, B., Speciation Analysis by Graphite Furnace AAS. In *Trace Element-Analytical Chemistry in Medicine and Biology*, Brätter, P.; Schramel, P., Eds. Gruyter: Berlin, **1983**; Vol. 2, pp 981-990.
- [23]. Arpadjan, S.; Krivan, V., Preatomization Separation of Chromium(III) from Chromium(VI) in the Graphite Furnace. *Anal. Chem.* **1986**, 58, 2611-2614.
- [24]. Schimtt, Y.; Kruse-Jares, J. D., Separation of Chromium(III) from Chromium(VI) using Graphite Furnace Chemistry. In *Trace Element Analytical Chemistry in Medicine and Biology*, Walter de Gruyter: Berlin, **1988**; pp 167-173.
- [25]. Marques, M. J.; Salvador, A.; Morales-Rubio, A.; De la Guardia, M., Chromium Speciation in Liquid Matrices: a Survey of the Literature. *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, 367, 601-613.
- [26]. Skoog, D. A.; Leary, J. J., *Análisis Instrumental*. 4ª ed.; McGraw-Hill: Madrid, **1995**.
- [27]. Broekaert, J. A. C., *Analytical Atomic Spectrometry with Flames and Plasmas*. 2ª ed.; Wiley-VCH: Weinheim, **2005**.
- [28]. Harnly, J. M., Instrumentation. In *Electrothermal Atomization for Analytical Atomic Spectrometry*, Jackson, K. W., Ed. John Wiley and Sons: Chischester, **1999**; pp 177-310.
- [29]. L'vov, B. V., Electrothermal atomization-the way toward absolute methods of atomic absorption analysis. *Spectrochim. Acta Part B* **1978**, 33, 153-193.
- [30]. Jackson, K. W., Electrothermal Atomization and its Application in Analytical Atomic Absorption Spectrometry. In *Electrothermal Atomization for Analytical Atomic Spectrometry*, Jackson, K. W., Ed. John Wiley and Sons: Chischester, **1999**; pp 1-30.
- [31]. Hinderberger, E. J.; Kaiser, M. L.; Koirtjohann, S. R., Furnace Atomic Absorption Analysis of Biological Samples using the L'vov Platform and Matrix Modification. *Atomic Spectroscopy* **1981**, 2, (1), 1-7.
- [32]. Miller-Ihli, N. J., Graphite furnace atomic absorption spectrometry for the analysis of biological materials. *Spectrochim. Acta Part B* **1989**, 44, (12), 1221-1227.
- [33]. Broekaert, J. A. C., Zeeman Atomic Absorption Instrumentation. *Spectrochim. Acta Part B* **1982**, 37, 65-69.
- [34]. Fernandez, F. J.; Myers, S. A.; Slavin, W., Background correction in atomic absorption utilizing the Zeeman effect. *Anal. Chem.* **1980**, 52, (4), 741-746.

- [35]. Smith, S. B.; Hieftje, G. M., A new background-correction method for atomic absorption spectrometry. *Appl. Spectrosc.* **1983**, *37*, 419-424.
- [36]. Welz, B.; Sperling, M., *Atomic Absorption Spectrometry*. 3rd ed.; Wiley-VCH: Weinheim, **1999**.
- [37]. Styris, D. L., Modifiers in the Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. In *Electrothermal Atomization for Analytical Atomic Spectrometry*, Jackson, K. W., Ed. John Wiley and Sons: Chichester, **1999**; pp 311-358.
- [38]. Bermejo-Barrera, P.; Barciela-Alonso, M. C.; Pérez-Fernández, B.; Bermejo-Barrera, A., Direct speciation analysis of Cr(VI) by electrothermal atomic absorption spectrometry based on the volatilisation of Cr(III)-thenoyltrifluoroacetone from the graphite furnace. *Spectrochim. Acta Part B* **2002**, *58*, (1), 167-173.
- [39]. Fonseca, R. W.; Wolfe, K. I.; Holcombe, J. A., Mechanisms of vaporization for Cr using electrothermal atomization. *Spectrochim. Acta Part B* **1994**, *49*, (4), 399-408.
- [40]. Cabon, J. Y.; Bihan, A. L., The determination of Cr, Cu and Mn in seawater with transversely heated graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B* **1995**, *50*, 1703-1716.
- [41]. Huang, Y.; Chuang, I.; Pan, C.; Hsieh, C.; Shi, T.; Lin, T., Determination of Chromium in Whole Blood and Urine by Graphite Furnace AAS. *Atomic Spectroscopy* **2000**, *21*, (1), 10-16.
- [42]. Benling, G.; Yongming, L., Determination of Cr by GFAAS with Ca and Mg as Matrix Modifier. *At. Spectrosc.* **1990**, *11*, 229-232.
- [43]. Bruhn, C. G.; Neira, J. Y.; Guzman, M. I.; Darder, M. M.; Nobrega, J. A., Study of chemical modifiers for the determination of chromium in biological materials by tungsten coil electrothermal atomic absorption spectrometry. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1999**, *364*, 273-278.
- [44]. Huang, S.; Lai, W.; Shih, K., Direct determination of molybdenum, chromium and manganese in seawater by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B* **1995**, *50*, 1237-1246.
- [45]. Apte, S. C.; Comber, S. D. W.; Gardner, M. J.; Gunn, A. M., Direct Determination of Chromium in Estuarine and Coastal Waters by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. *JAAS* **1991**, *6*, 169-172.
- [46]. Slavin, W.; Carnrick, G. R.; Manning, D. C., Magnesium Nitrate as a Matrix Modifier in the Stabilized Temperature Platform Furnace. *Anal. Chem.* **1982**, *54*, 621-624.
- [47]. Garcia, E. M.; Cabrera, C.; Sanchez, J.; Lorenzo, M. L.; Lopez, M. C., Chromium levels in potable water, fruit juices and soft drinks: influence on dietary intake. *The Science of the Total Environment* **1999**, *241*, 143-150.
- [48]. Thomaidis, N. S.; Piperaki, E. A.; Polydorou, C. K.; Efstathiou, C. E., Determination of Chromium by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry with Various Chemical Modifiers. *JAAS* **1996**, *11*, 31-36.
- [49]. Grobowski, Z.; Lehmann, R.; Radziuk, B.; Voellkopf, U., Determination of Trace Metals in Seawater using Zeeman Graphite Furnace AAS. *Atomic Spectroscopy* **1984**, *5*, (3), 87-90.

- [50]. Beceiro-Gomez, E.; Bermejo-Barrera, P.; Bermejo-Barrera, A.; Barciela-Garcia, J.; Barciela-Alonso, M. C., Speciation of Chromium by the Determination of Total Chromium and Chromium by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. *JAAS* **1993**, 8, 649-653.
- [51]. Dyg, S.; Cornelis, R.; Griepink, B.; Adams, F., Stability Study of Cr(III) and Cr(VI) in Water for Production of An Aqueous Chromium Reference Material. In *Metal Speciation in the Environment*, Broekaert, J. A. C.; Güçer, S.; Adams, F., Eds. Springer-Verlag: Berlin, **1990**; pp 361-375.
- [52]. Bermejo-Barrera, P.; Herbelo-Hermelo, P.; Barciela-Alonso, M. C.; Bermejo-Barrera, A., Chromium Speciation by ETAAS using 1,1,1-trifluoro-2,4-pentadione to Form a Volatile Chelate with Cr(III). *At. Spectrosc.* **2003**, 24, (1), 22-26.
- [53]. Bermejo-Barrera, P.; Moreda-Piñeiro, J.; Moreda-Piñeiro, A.; Bermejo-Barrera, A., Chromium determination in sea water by electrothermal atomic absorption spectrometry using Zeeman effect background correction and a multi-injection technique. *Fresenius' J. Anal. Chem.* **1998**, 360, (2), 208-212.
- [54]. Turekian, K. K., *Oceans*. Prentice-Hall: New York, **1968**.
- [55]. Grasshoff, K.; Ehrhardt, M.; Kremling, K., *Methods of Seawater Analysis*. 2^a ed.; Verlag Chemie: Weinheim, **1983**.
- [56]. Fujiwara, K.; Toda, S.; Fuwa, K., Selective Separation of Cr(VI) from Cr(III) in Seawater by Cobalt-1-pyrrolidinedicarbodithioate Coprecipitation Method. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1981**, 54, 3209-3210.
- [57]. Comber, S.; Gardner, M., Chromium Redox Speciation in Natural Waters. *J. Environ. Monit.* **2003**, 5, 410-413.
- [58]. Baxter, D. C.; French, W., Determination of mercury by atomic absorption spectrometry using a platinum-lined graphite furnace for in situ preconcentration. *Anal. Chim. Acta* **1989**, 225, 175-183.
- [59]. P. Bermejo-Barrera, J. M.-P., A. Moreda-Piñeiro, A. Bermejo-Barrera, Chromium determination in sea water by electrothermal atomic absorption spectrometry using Zeeman effect background correction and a multi-injection technique. *Fresenius' J. Anal. Chem.* **1998**, 360, (2), 208-212.

CAPÍTULO 3

CAPÍTULO 3

Uso de reactores anudados para la preconcentración de As mediante FI-ETAAS en muestras de agua de mar

1 INTRODUCCIÓN GENERAL	89
1.1 Análisis por inyección en flujo (FIA)	89
1.1.1 Origen de la técnica FIA.....	89
1.1.2 Definición de FIA.....	90
1.1.3 Fundamentos FIA	91
1.1.3.1 Dispersión	92
1.1.4 Instrumentación FIA	95
1.1.4.1 Mecanismo de propulsión	95
1.1.4.1.1 Bombas peristálticas.....	96
1.1.4.1.2 Bombas de pistón recíprocas	97
1.1.4.1.3 Bombas de jeringa.....	98
1.1.4.2 Sistemas de inyección	99
1.1.4.2.1 Válvula rotatoria de 6 vías.....	99
1.1.4.2.2 Válvula multifunción	100
1.1.4.2.3 Válvula de conmutación	101
1.1.4.3 Sistemas de transporte y reacción	101
1.1.4.3.1 Tubos y conectores.....	101
1.1.4.3.2 Reactores de mezcla	103
1.1.4.4 Sistemas de detección.....	104
1.1.5 Características de los sistemas FI-AAS	105
1.2 Técnicas de separación y preconcentración	108
1.2.1 Ventajas de la técnica de separación y preconcentración por FIA.....	108
1.2.2 Evaluación de la eficacia de la preconcentración en sistemas FIA.....	109
1.2.3 Clasificación de las técnicas de separación por FIA.....	112
1.2.3.1 Extracción en fase sólida	113
1.2.3.2 Precipitación y coprecipitación	114
1.2.3.3 Sistemas de extracción líquido-sólido	115
1.2.3.3.1 Columnas.....	115
1.2.3.3.2 Reactores anudados.....	117
1.3 Agente complejante (APDC)	120

2 DETERMINACIÓN SELECTIVA DE As(III) EN AGUA DE MAR.....	121
2.1 INTRODUCCIÓN	121
2.1.1 Especiación de As en agua de mar.....	121
2.1.2 Técnica analítica empleada	122
2.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL	124
2.2.1 Equipamiento.....	124
2.2.1.1 Aparatos	124
2.2.1.2 Reactivos.....	125
2.2.1.3 Limpieza del material	126
2.2.2 Diseño del montaje FI	127
2.2.3 Optimización del programa de temperaturas de la cámara de grafito	130
2.2.4 Formación del complejo. Optimización	134
2.2.4.1 Efecto de la concentración de HCl	134
2.2.4.2 Efecto de la cantidad de APDC.....	136
2.2.4.3 Efecto de la proporción de mezcla muestra/APDC	137
2.2.4.4 Efecto del tiempo de preconcentración.....	139
2.2.4.5 Elección de la disolución de lavado.....	140
2.2.4.6 Efecto de la longitud del reactor anudado y del volumen de elución	141
2.2.5 Características analíticas	143
2.2.5.1 Rectas de calibrado y adición estándar	143
2.2.5.2 Sensibilidad.....	146
2.2.5.3 Precisión.....	147
2.2.5.4 Exactitud.....	148
2.2.5.5 Factor de preconcentración y eficacia de adsorción	148
2.2.5.6 Interferencias	150
2.2.6 Método propuesto.....	152
2.3 APLICACIÓN	153
3 DETERMINACIÓN DE AS TOTAL EN MUESTRAS DE AGUA DE MAR MEDIANTE FI-ETAAS	154
3.1 INTRODUCCIÓN	154
3.1.1 Pre-reducción	154
3.1.2 Microondas focalizado	157
3.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL	159
3.2.1 Equipamiento.....	159
3.2.1.1 Aparatos	159
3.2.1.2 Reactivos.....	160
3.2.1.3 Limpieza del material	160

3.2.2	Modificación del esquema FI.....	161
3.2.3	Elección del reductor. Ensayos preliminares.....	162
3.2.3.1	Tiourea.....	162
3.2.3.2	L-cisteína.....	165
3.2.4	Optimización de la etapa de reducción.....	166
3.2.4.1	Concentración de L-cisteína.....	166
3.2.4.2	Efecto de la potencia del microondas focalizado.....	167
3.2.5	Características analíticas.....	169
3.2.5.1	Recta de calibrado y adición estándar.....	169
3.2.5.2	Sensibilidad.....	171
3.2.5.3	Precisión.....	172
3.2.5.4	Exactitud.....	173
3.2.5.5	Factor de preconcentración y eficacia de adsorción.....	174
3.2.6	Método propuesto.....	175
3.3	APLICACIÓN.....	177
4	BIBLIOGRAFÍA.....	178

1 Introducción general

1.1 Análisis por inyección en flujo (FIA)

1.1.1 Origen de la técnica FIA

La búsqueda de una mayor eficiencia y la automatización del trabajo en los laboratorios de análisis rutinarios dieron lugar al desarrollo de las técnicas FIA. Un importante avance en la automatización fue la introducción de análisis en flujo continuo (*continuous flow analysis*) basado en la segmentación con burbujas de aire propuesto por Skeggs en 1957. El equipo diseñado para la aplicación de estos métodos fue posteriormente comercializado como Technicon AutoAnalyser, convirtiéndose en el analizador automatizado más popular. A mediados de la

década de los setenta comenzaron a desarrollarse métodos de flujo no segmentado.

La principal diferencia entre el análisis en flujo continuo y el análisis por inyección en flujo es la segmentación del flujo con burbujas de aire. La ausencia de burbujas confiere al FIA una serie de ventajas como:

- Caudales más reproducibles.
- Equipamiento sencillo y relativamente económico.
- Sistemas que pueden ser miniaturizados.
- Frecuencia de muestreo considerablemente alta.
- Multitud de aplicaciones.

1.1.2 Definición de FIA

A la hora de establecer una definición para esta técnica de análisis por inyección en flujo existen discrepancias; posiblemente debido a la gran versatilidad y constante evolución.

La primera definición para esta técnica fue dada por Ruzicka and Hansen (1981) en la primera edición de su libro *“Flow Injection Analysis”*; quien define FIA como: “Un método basado en la inyección de una muestra líquida en una corriente continua no segmentada en movimiento de un líquido conveniente. La muestra inyectada forma una zona, la cual es entonces transportada hacia el detector que graba continuamente la absorbancia, el potencial electrolítico o algún otro parámetro físico y como este cambia continuamente como resultado del paso de la muestra a través de la celda”. Siete años más tarde en la segunda edición del libro Ruzicka¹ propone una nueva definición como: “Una técnica para la recopilación de información de un gradiente de concentración formado a partir de una zona

inyectada y bien definida de un fluido, disperso en una corriente continua no segmentada de un portador”.

Fang² propone otra definición para FIA como: “Una técnica de análisis en flujo caracterizada por la manipulación reproducible de la muestra y zonas de reactivos en una corriente en flujo bajo condiciones termodinámicamente no equilibradas”; basándose en las características diferenciadoras con otras técnicas de análisis en continuo. FIA es similar a HPLC en muchos aspectos, haciendo extremadamente difícil excluir HPLC de las definiciones de FIA. No obstante, en cuanto concierne al equilibrio, HPLC se basa en un principio en el cual se busca el equilibrio en cada plato de la columna de separación. Por el contrario, FIA se fundamenta en el estado no estacionario para alcanzar mayor eficacia.

A pesar de los esfuerzos en definir con precisión FIA, este tema aún parece ser una fuente de considerable controversia.

1.1.3 Fundamentos FIA

Ruzicka¹ uno de los pioneros de esta técnica propone: la inyección de la muestra, la dispersión controlada y la reproducibilidad en el control de los tiempos, como los principios básicos o piedras angulares de FIA.

La muestra es inyectada o introducida directamente en el flujo en lugar de ser aspirada dentro de él. Inmediatamente, la muestra es transportada a lo largo del sistema mientras ocurren los procesos fisicoquímicos. La dispersión parcial del analito puede ser modificada controlando la geometría y las características hidrodinámicas del sistema. Durante la detección no se han alcanzado ni el equilibrio físico, el cual implicaría la homogeneización de la porción de flujo, ni el equilibrio químico, es decir la reacción entre el analito y los reactivos no se ha completado. Por lo tanto, el control del tiempo debe ser altamente reproducible ya que las medidas se realizan en condiciones no estacionarias.

En la bibliografía puede encontrarse la distinción entre dos modos de FIA: normal y reverso. El modo normal, nFIA, se refiere a los casos en los que la muestra se inyecta en la corriente del portador; mientras el modo reverso, rFIA, a los casos en que los reactivos son mezclados con la muestra mientras fluye por el circuito³. Sin embargo esta clasificación resulta ambigua, porque el término reverso puede dar a entender que se cambia el sentido del flujo hacia el lado opuesto. Por ello, la IUPAC no recomienda el uso de esta terminología⁴.

Para comprender un poco mejor los fundamentos de esta técnica, a continuación se exponen algunos términos relacionados con una corriente continua de un fluido.

1.1.3.1 Dispersión

La dispersión es el fenómeno que sufre la muestra durante el transporte hacia el detector que permite la mezcla con el fluido portador y los reactivos. El grado de mezcla está determinado por difusión molecular, pero fundamentalmente por convención debido a las diferencias en la velocidad de flujo de un fluido en los distintos puntos a lo largo de eje radial. Con conductos finos, entre 0,3 y 1,5 mm i.d., usados habitualmente en sistemas FIA y en ausencia de segmentos de aire, no se produce turbulencia aleatoria, lo cual hace posible que la mezcla por convención sea reproducible. En la figura 1 se representa la evolución de una muestra durante su transporte poco después de ser inyectada.

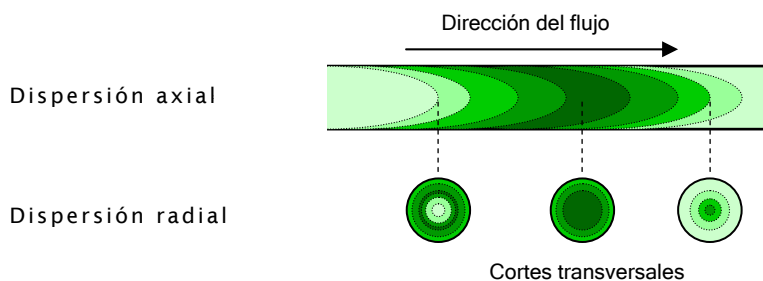


Figura 1. Dispersión de una muestra en un sistema FIA.

El coeficiente de dispersión, D , es la relación de concentraciones antes y después de la inyección.

$$D = \frac{C^o}{C}$$

donde C^o representa la concentración inicial y C , la concentración después de la inyección. En función del valor de D , la dispersión se considera baja (<2), media (2-10) o alta (>10)⁵.

Sobre la dispersión influyen diversos parámetros como:

- Volumen de muestra. Cuanto mayor sea este menor será la dispersión. Se considera como cantidad de muestra idónea entre 100-200 μl .
- Caudal del portador. Aunque trabajando entre 1,6 y 4 ml min^{-1} la influencia es mínima.
- Relación entre el caudal de la muestra y los reactivos cercanos.
- Dimensiones y configuración geométrica de los componentes.
- Viscosidad de los fluidos.
- Temperatura.

Aunque estos dos últimos parámetros, viscosidad y temperatura, normalmente pueden ser despreciados.

Con el fin de minimizar la dispersión se puede sustituir los capilares rectos por otros reactores de mezcla cuya función principal es lograr la mezcla de la muestra y los reactivos lo más rápidamente posible. Pero además reducen la dispersión axial, incrementando la mezcla debido a un flujo secundario.

En los conductos rectos predomina el flujo laminar, paralelo a la corriente principal, con un perfil parabólico de la velocidad. Mientras que en los capilares enrollados o

anudados, los continuos cambios en la dirección de la corriente provocan un flujo secundario, perpendicular a la dirección principal de flujo (Figura 2).

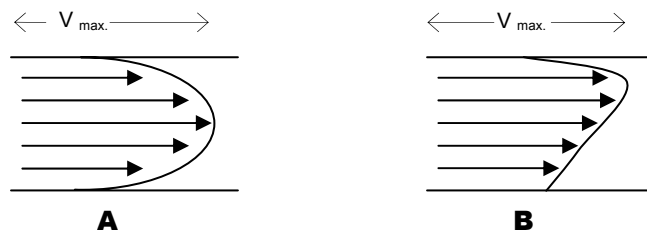


Figura 2. Perfiles de velocidades para el flujo laminar (A) y el flujo secundario (B).

La dispersión de la muestra debe ser reproducible y controlable en los métodos FIA. Si se cumple esta condición no es necesario alcanzar el equilibrio termodinámico lo que permite acortar los tiempos de análisis; a diferencia de lo que sucede cuando se mezclan dos líquidos de forma manual. Por ejemplo, al añadir unas gotas de reactivo a una muestra que tenemos en un tubo de ensayo, se debe agitar para mezclar y homogeneizar la disolución y además de tener que esperar a que se alcance el equilibrio termodinámico (Figura 3).

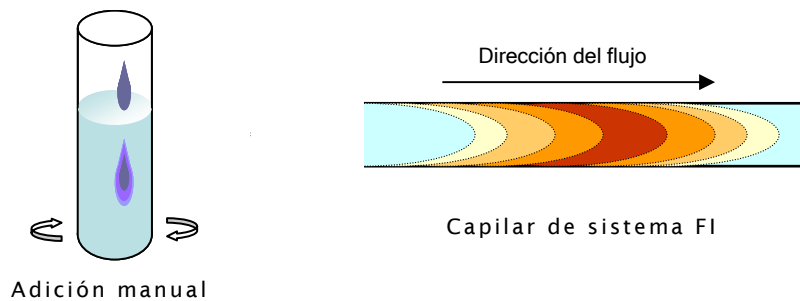


Figura 3. Comparación de la mezcla de muestra y reactivos de forma manual y en un sistema de flujo continuo no segmentado.

1.1.4 Instrumentación FIA

El esquema básico (Figura 4) de un sistema FIA consta de 4 partes:

- Mecanismo de propulsión, el cual produce el flujo de una o varias disoluciones ya sea reactivos o actúen simplemente como portador.
- Sistema de inyección, el cual permite la introducción reproducible de un volumen de muestra dentro del flujo sin pararlo.
- Sistemas de transporte y reacción, que une los diferentes elementos y donde se produce la mezcla o dispersión del analito.
- Sistema de detección, el cual transforma la variación de una propiedad del analito en una señal.

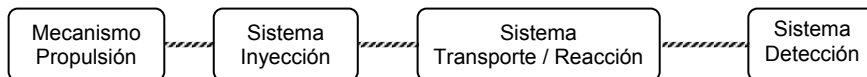


Figura 4. Esquema básico de los componentes básicos de un sistema FIA

1.1.4.1 Mecanismo de propulsión

Los sistemas de análisis con inyección en flujo requieren que los mecanismos de propulsión del líquido no generen pulsos y la velocidad de flujo se mantenga constante debido a que esta técnica se basa en una alta reproducibilidad en el control del tiempo de cada etapa. Otras propiedades que deberían cumplir para asegurar una elevada versatilidad son: Capacidad multicanal, al menos 4 canales; velocidad de flujo ajustable; resistencia a reactivos fuertes y disolventes; pequeña inversión inicial y bajo coste de mantenimiento.

1.1.4.1.1 Bombas peristálticas

Las bombas peristálticas son indudablemente el mecanismo de propulsión de líquido más empleado debido a su alta versatilidad. A pesar de ello presentan algunas desventajas como: produce pulsaciones, problemas con la estabilidad en la velocidad de flujo a largo plazo, deterioro de los tubos con disolventes orgánicos o con elevadas concentraciones de ácidos fuertes (Figura 5).

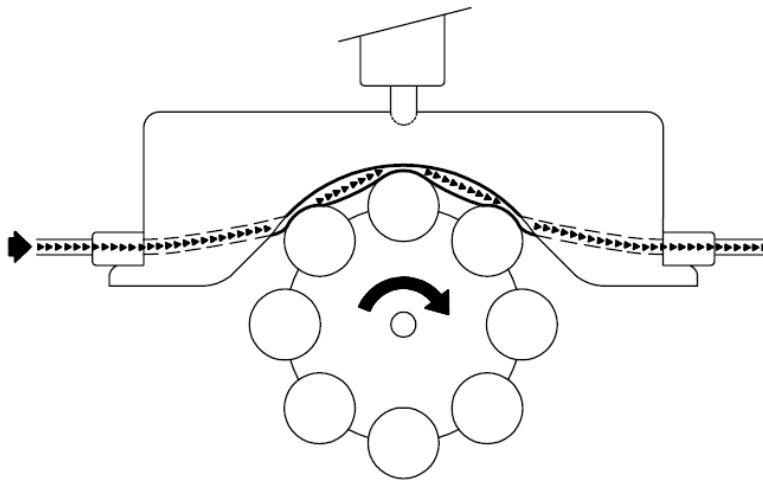


Figura 5. Representación esquemática de una bomba peristáltica.

Sin embargo, estos inconvenientes se pueden evitar o al menos minimizar haciendo un uso correcto de las bombas peristálticas, teniendo en cuenta los siguientes consejos:

✓ *Presión sobre los tubos*

Después de colocar los tubos se debe incrementar gradualmente la presión con los tornillos que aproximan los tubos a los rodillos de la bomba peristáltica hasta obtener una corriente continua en todos los canales. Si los tornillos se aprietan demasiado los tubos sufren demasiado reduciendo su duración.

✓ *Lubricación*

Para aumentar el tiempo de vida de los tubos se recomienda la aplicación de una pequeña cantidad de lubricante, lavar los tubos con agua y liberarlos al final de cada sesión de trabajo.

✓ *Estado de los tubos*

No deben usarse tubos nuevos y usados o de distintos materiales bajo el mismo bloque de compresión porque requieren distinta presión. Por ello se recomienda en los casos que sea posible colocar cada tubo en un bloque de compresión diferente.

✓ *Control del caudal*

El caudal debería modificarse únicamente cambiando la velocidad de bombeo o el diámetro del tubo, nunca modificando la presión con el tornillo ya que de este modo no se puede obtener un flujo estable y reproducible. Las variaciones que sufre el caudal a largo plazo son inevitables originadas por la degradación gradual de los tubos. No obstante, se puede asegurar una buena precisión chequeando regularmente los caudales.

✓ *Elección del tipo de tubo*

Los disolventes orgánicos son empleados con frecuencia en sistemas de separación con inyección en flujo, pero la mayoría no pueden ser bombeados mediante los tubos comúnmente empleados en las bombas peristálticas, tipo Tygon®. Estos deben ser reemplazados por otros tipos de tubos fabricados con materiales resistentes a los diferentes disolventes tales como, Solvaflex, Verdroprene, Neoprene, Marprene o Viton. Ninguno de estos materiales puede ser usado con todos los disolventes orgánicos comunes, además suelen ser mucho más caros aunque aseguren una mayor duración.

1.1.4.1.2 Bombas de pistón recíprocas

Las bombas de pistón recíprocas se asemejan a las empleadas en HPLC, pero con presiones de trabajo máximas mucho más bajas entre 30 y 60 bars. Este tipo

de bombas presentan algunas ventajas frente a las bombas peristálticas como: mayor estabilidad de flujo tanto a corto como a largo plazo; mayor capacidad de bombeo incluso sin alterar la estabilidad de flujo con elevada impedancia, como en columnas empaquetadas y gran resistencia a disolventes orgánicos. Por contra, dispone de pocos canales disponibles, usualmente 2, lo cual limita su aplicabilidad. Otra desventaja de las bombas de pistón son los problemas de acoplamiento con sistemas de detección de espectrometría atómica equipados con nebulizadores neumáticos. Únicamente es posible su uso cuando la velocidad de bombeo supera a la velocidad de aspiración libre del nebulizador, en caso contrario, la bomba no controla el flujo, pasando a ser determinado por la intensidad de succión del nebulizador.

1.1.4.1.3 Bombas de jeringa

Este tipo de bombas produce un flujo sinusoidal libre de pulsaciones en un amplio rango de velocidades de flujo (Figura 6). Se utilizan junto con válvulas multicanal controladas por ordenador dotando al sistema de una alta reproducibilidad. Otras de las ventajas de este tipo de mecanismo de propulsión son: la fuerte resistencia a ácidos y bases concentradas y a disolventes orgánicos; soporta impedancias relativamente elevadas sin alterar el flujo y además el coste de mantenimiento es bajo en comparación a las bombas peristálticas porque no consume tubos.

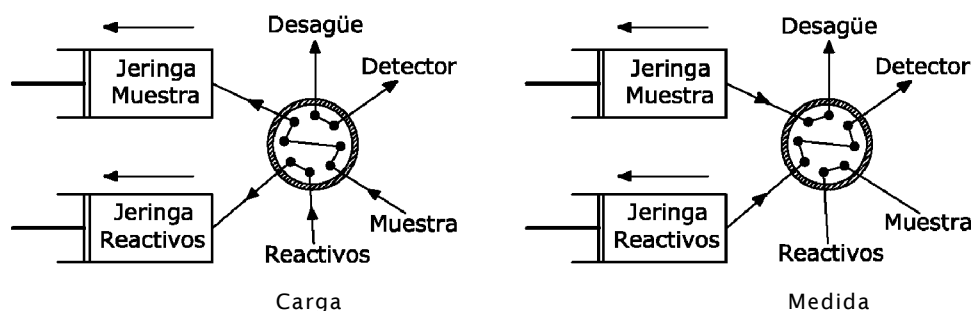


Figura 6. Bombas de jeringa

Sin embargo, presenta las siguientes desventajas: menor frecuencia de análisis porque requiere una etapa de carga del portador, menor versatilidad debido al menor número de canales disponibles y a las restricciones en la relación de caudales de los distintos canales. Y al igual que en el caso de las bombas de pistón, la succión puede distorsionar el flujo cuando se acopla a sistemas de detección de espectrometría atómica equipados con nebulizadores neumáticos.

1.1.4.2 Sistemas de inyección

Este componente ha recibido especial atención en el desarrollo de la técnica FIA, ya que la inyección de la muestra es uno de los pilares sobre los que se sustenta esta técnica. Habitualmente se emplea el término de sistema de inyección para referirnos a los mecanismos de introducción de muestra aunque no se trate realmente de una inyección propiamente dicha. Se ha conservado el nombre de los primeros sistemas que consistían en una simple jeringa. Su función principal es la introducción reproducible de un volumen definido de muestra en la corriente del portador. Es fundamental controlar el volumen de muestra introducido porque la respuesta analítica obtenida dependerá de esta variable.

Existe un gran número de diseños diferentes de válvulas de inyección descritas en la bibliografía algunas tomadas de otros campos como la cromatografía líquida. A continuación, únicamente se describen aquellos diseños más empleados para los sistemas de separación "on-line".

1.1.4.2.1 Válvula rotatoria de 6 vías

Este tipo de válvula se caracteriza por su reproducibilidad y simplicidad, admite un amplio rango de volúmenes cambiando el bucle de muestra. Sin embargo, no son lo suficientemente versátiles para las complicadas funciones necesarias en los

sistemas de separación “on-line”, las cuales se resuelven combinado un conjunto de válvulas (Figura 7).

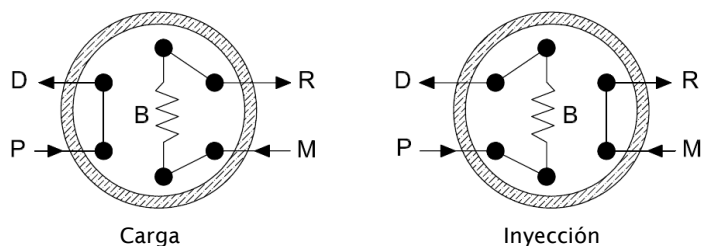


Figura 7. Válvula rotatoria de 6 vías. D detector, R residuo, P portador, M muestra y B bucle.

1.1.4.2.2 Válvula multifunción

El uso de válvulas multifunción aumenta las posibilidades de aplicación de los sistemas FIA. La válvula se caracteriza por una construcción muy simple. Se compone de 2 partes, una estacionaria y otra móvil, con 8 canales en cada una enfrentados, obteniendo 16 vías. Los canales están distribuidos uniformemente entorno al eje del rotor y separadas 45°. Cuando el motor actúa la parte móvil gira 45° cambiando la combinación de los canales enfrentados (Figura 8).

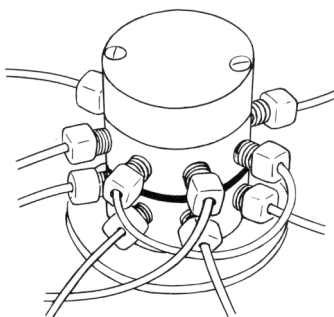


Figura 8. Válvula multifunción de 8 canales.

En los casos en que no todos sus canales sea necesarios pueden bloquearse con conectores ciegos o simplemente dejándolos abiertos.

1.1.4.2.3 Válvula de conmutación

Este tipo de válvula está formada por 3 capas colocada en forma de sandwich (Figura 9), la capa interna se desliza entre las capas exteriores.

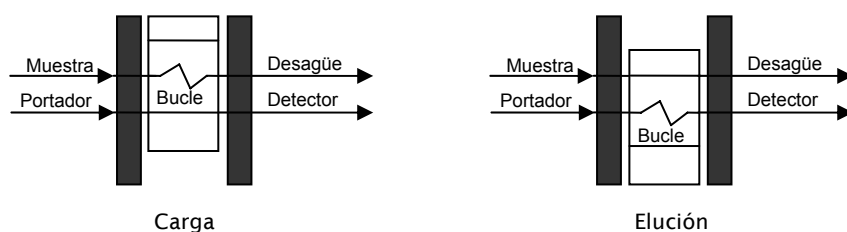


Figura 9. Válvula de conmutación

A pesar de la simplicidad de su diseño, esta válvula es capaz de desempeñar multitud de funciones complejas.

1.1.4.3 Sistemas de transporte y reacción

1.1.4.3.1 Tubos y conectores

Las funciones de estos componentes son el transporte de la corriente a lo largo del montaje y la interconexión entre los diferentes componentes del sistema FIA. Los tubos de PTFE con 0,35-1 mm de diámetro interno (i.d.) suelen ser los más frecuentes en los sistemas FIA. Dependiendo de la aplicación se selecciona un diámetro interno (i.d.) determinado aunque normalmente se emplean los capilares de 0,35 mm i.d. con el fin de minimizar los volúmenes muertos y la dispersión. En el caso de que exista peligro de obstrucción debido a la introducción accidental de materia particulada en suspensión son más apropiados los capilares de diámetro entre 0,5 y 0,7 mm i.d. Los capilares de 1 mm i.d. son usados trabajando con

velocidades de flujo elevadas y con formación de gases como en los sistemas de generación de hidruros (HG-AAS). El material de los tubos debe ser químicamente inerte y estable ante cambios de temperatura.

Las conexiones se pueden realizar insertando tubos de diferentes diámetros o uniendo tubos del mismo diámetro con la ayuda de un manguito. Otro tipo de conexión es mediante conectores de rosca, colocado en el extremo del tubo con el borde ensanchado y con una junta de goma. Además para la mezcla de distintas disoluciones se emplean conexiones en forma de T, Y o W individuales o en bloques como el "Chemifold" (Figura10) formado por una conexión en Y y dos en W.

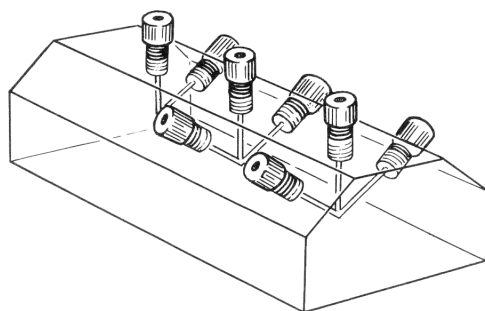


Figura 10. Conexiones en bloque conocida como "Chemifold".

Es fundamental una correcta conexión de los capilares con los distintos componentes del sistema para evitar volúmenes muertos, burbujas de aire y reducir la dispersión, especialmente cuando se unen dos tubos del mismo diámetro con un manguito. Se recomienda realizar el corte de los tubos en inglete, lo cual permite una mejor conexión (Figura 11).



Correcta



Incorrecta

Figura 11. Unión entre tubos del mismo diámetro.

1.1.4.3.2 Reactores de mezcla

La función principal de los reactores de mezcla consiste en favorecer la mezcla axial reproducible de 2 o más componentes.

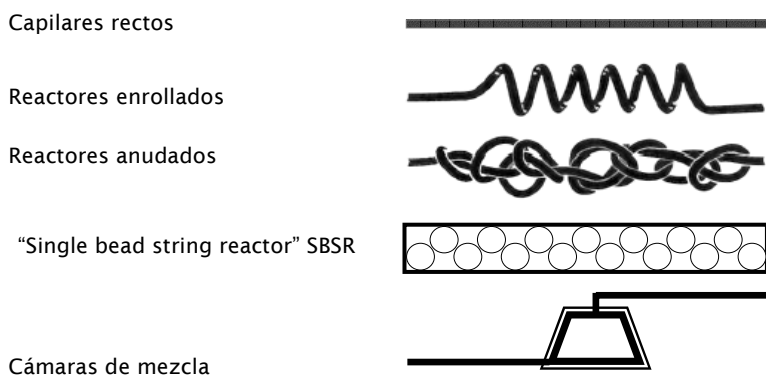


Figura 12. Tipos de reactores de mezcla.

Existen varios tipos de reactores^{1,3} como se muestran en la figura 12.

- **Capilares rectos.** Básicamente se emplean para unir distintas partes del sistema FIA.
- **Reactores enrollados (*coil*), anudados (*knotted*) o tejidos (*knitted*).** Están hechos usualmente con capilares de PTFE adoptando diferentes formas, las cuales producen variación en la dirección del flujo, favoreciendo la mezcla axial de 2 o más componentes.
- **Reactores empaquetados (*Packed reactors*).** Tubos rellenos con un material químicamente activo o inerte. No han sido muy utilizados por problemas de reproducibilidad en el flujo.

- “*Single bead string reactor*” (SBSR). Una pieza de tubo rellena con perlas de vidrio o polímeros químicamente inertes, cuyo diámetro es del 60-80% del diámetro del tubo de modo que en cada sección solamente haya una perla. Este tipo de relleno permite aumentar el tiempo de residencia y disminuir la dispersión considerablemente.
- Cámaras de mezcla. Se emplean para mejorar la homogeneidad de la mezcla de la muestra con los reactivos sobre todo cuando existen diferencias de viscosidad, temperatura o contenido de detergentes o surfactantes.

Más adelante se describirán detalladamente los reactores anudados, por tratarse de uno de los componentes fundamentales en varios de los métodos desarrollados en este proyecto.

1.1.4.4 Sistemas de detección

Los detectores ideales para los sistemas FIA deberían cumplir una serie de requisitos: respuesta rápida y lineal para un amplio rango de concentración, elevada sensibilidad, buena reproducibilidad, bajo nivel de ruido, pequeño volumen de muestra necesario y sin efecto memoria^{3, 6}.

Existen gran variedad de sistemas de detección que pueden emplearse en FIA: ópticos (espectroscópicos y no espectroscópicos); eléctricos (amperométricos, potenciométricos, conductimétricos) y termoquímicos. Trojanowicz⁷ en los 5 primeros capítulos del libro “*Flow Injection Analysis. Instrumentación and Applications*” describe detalladamente los diferentes sistemas de detección adaptables a la técnica FIA.

1.1.5 Características de los sistemas FI-AAS

Aunque como se ha comentado anteriormente existen multitud de detectores adaptables a los sistemas de inyección en flujo, a continuación nos centraremos en la espectroscopía de absorción atómica (AAS) por ser el método de detección utilizado en este proyecto. En la tabla 1 se resumen los acontecimientos más importantes en el origen y el desarrollo de la técnica FI-AAS.

Tabla 1. Eventos destacables en la evolución histórica de la técnica FI-AAS²

Año	Avances
1979	Primeras publicaciones FI-AAS ⁸⁻¹⁰
1982	Generación de hidruros (FI-HG-AAS) ¹¹
1983	1ª Aplicación del acoplamiento FI-ETAAS ¹²
1986	Digestión de la muestra "on-line" en microondas ¹³
1989	Publicación monografía "Flow Injection Atomic Spectroscopy" ¹⁴
1991	1º Equipo comercial FI-AAS (Perkin-Elmer)

Los primeros trabajos en los que se ha acoplado un sistema de inyección por flujo a la detección con AAS, publicados en 1979, emplearon un equipo de FAAS¹⁵. La conexión del sistema FI al detector es muy simple, sin necesidad de ninguna modificación en el equipo FAAS. La disolución se introduce directamente en el nebulizador por succión. Al igual que sucede con el equipo de ICP-AES, el cual presenta la ventaja frente a FAAS de la posibilidad de la detección multielemental.

La aplicación de la técnica FI-ETAAS comenzó más tarde que las aplicaciones con FAAS y HG-AAS, porque el modo de trabajo discontinuo de ETAAS, en principio suponía una dificultad para acoplarlo a una técnica de flujo continuo¹⁶. De hecho, en el 1º trabajo publicado en 1983¹² en el que se combina FI-ETAAS, el tratamiento de la muestra se realiza en modo discontinuo. No fue hasta unos años

más tarde cuando surgieron los primeros trabajos donde la técnica FI-ETAAS se emplea en sistemas de preconcentración “on-line”¹⁷.

La introducción de la muestra en la cámara de grafito se realiza de modo discreto por lo que la conexión del equipo ETAAS requiere algunas modificaciones en la forma de trabajo. El sistema FI puede funcionar en paralelo, simultáneamente con el programa de temperaturas de la cámara de grafito o de forma secuencial, permaneciendo en modo de espera mientras está funcionando el programa de la cámara de grafito. A pesar de que en este segundo caso el tiempo invertido en cada análisis es mucho mayor debe emplearse en algunos casos debido a dificultades técnicas¹⁸.

Otro factor a tener en cuenta a la hora de diseñar el acoplamiento FI-ETAAS es la capacidad del tubo de grafito, siendo el volumen máximo permitido entre 70-100 μ l. Algunas de las posibles soluciones a esta limitación son: la inyección múltiple con etapas de secado intermedio, la delimitación de la muestra mediante una corriente de aire, o la formación de un aerosol con un nebulizador de alta presión¹⁹.

Además la técnica ETAAS es mucho más sensible a las interferencias de matriz en comparación con FAAS, por lo que resulta casi imprescindible el lavado del circuito FI o el uso de mecanismo de separación para reducir las posibles interferencias de matriz.

En conjunto, todos estos factores justifican que la primera aplicación del acoplamiento FI-ETAAS trabajando en modo continuo no se haya publicado hasta 1990¹⁷.

La combinación de los sistemas de inyección en flujo y detección con AAS presenta una serie de ventajas tal como:

- ***Sensibilidad***
Se amplía el rango analítico en varios ordenes de magnitud mediante técnicas de dilución o preconcentración en línea.
- ***Selectividad***
Las posibles reacciones interferentes afectan en menor medida ya que los tiempos de reacción son muy cortos. De este modo se minimizan las interferencias y como consecuencia aumenta la selectividad. Además permite la separación o modificación de la matriz en modo continuo.
- ***Rapidez***
Al no ser necesario alcanzar el estado estacionario permite aumentar la frecuencia de muestreo. Por ejemplo la preconcentración en columna mediante un sistema FI requiere 30-100 s, por la contra para obtener un factor de enriquecimiento similar trabajando en modo discontinuo se necesitarían unas pocas horas.
- ***Simplicidad***
A primera vista se trata de un sistema muy sencillo, basado en procedimientos simples que se puede desarrollar con equipamiento básicos; aunque realmente no sea una técnica tan simple como parece.
- ***Economía***
El consumo de muestra y reactivos es bajo. Además el equipamiento no es muy sofisticado pudiendo ser modificado fácilmente según las necesidades de cada tipo de análisis. Esto supone una gran versatilidad.
- ***Exactitud***
Mejora la exactitud en análisis de ultra-traza porque se disminuye el riesgo de contaminación al trabajar en un sistema cerrado automatizado.

Existen varias revisiones bibliográficas sobre las aplicaciones del acoplamiento de sistemas de inyección en flujo y espectroscopía atómica, entre las que destaca la base de datos “*Flow Injection Analysis Database*” disponible en la web²⁰.

1.2 Técnicas de separación y preconcentración

FIA pronto se convirtió en una poderosa técnica no solo para análisis en serie sino también para técnicas de separación como diálisis, extracción líquida, difusión gaseosa, intercambio iónico y electrodeposición. El uso de la inyección en flujo para procesos de preconcentración fue introducido mucho más tarde. Los procesos tradicionales de separación y preconcentración realizados en modo discontinuo son generalmente tediosos y requieren mucho tiempo, incluyen múltiples pasos de operación cuidadosa, con frecuentes transferencias de disoluciones de unos recipientes a otros y exponiendo a las muestras a serios riesgos de contaminación, particularmente en análisis de trazas. La secuencia de separación frecuentemente representaba el cuello de botella de un proceso analítico y por lo tanto, ha sido uno de los cuales requería una renovación urgentemente. Por ello, la separación y preconcentración “on line” se convirtió en un campo de un gran interés y ha cambiado la situación drásticamente²¹.

Actualmente se ha demostrado que el análisis por inyección en flujo es la mejor alternativa para la preconcentración de elementos traza y también para eliminar la matriz, mejorando la sensibilidad y la selectividad de las técnicas de espectroscopía atómica clásicas²².

1.2.1 Ventajas de la técnica de separación y preconcentración por FIA

Son numerosas las ventajas que presenta las técnicas de separación y preconcentración mediante sistemas FIA:

- Elevada frecuencia de análisis, 1 ó 2 órdenes de magnitud superior respecto a los procesos en discontinuo. El tiempo necesario por determinación suele estar entre 10 y 200 s.

- Los sistemas de preconcentración presentan elevados factores de enriquecimiento, habitualmente entre 5 y 50 veces mayor que los procesos en discontinuo.
- Bajo consumo de muestra, 1 ó 2 ordenes de magnitud inferior a los procesos en discontinuo. Esta característica resulta de vital importancia cuando el volumen de muestra disponible es pequeño. Además, facilita el transporte entre el lugar de muestreo y el laboratorio y su almacenamiento.
- Bajo consumo de reactivos, lo cual redundará en una reducción de costes por análisis.
- Alta reproducibilidad, habitualmente entre 1 y 3 % de desviación estándar relativa.
- La automatización permite su implementación en procesos de control usados como sistemas de monitorización.
- Bajo riesgo de contaminación debido a que se trabaja en sistemas cerrados e inertes. Esta característica es fundamental para el análisis de elementos traza.
- Posible aumento de selectividad aplicando discriminaciones cinéticas.
- Requiere poco espacio en el laboratorio para el montaje del sistema de inyección en flujo y pocos utensilios.

1.2.2 Evaluación de la eficacia de la preconcentración en sistemas FIA

Se han establecido una serie de parámetros para la evaluación y la comparación de diferentes sistemas de preconcentración realizados en modo continuo.

✓ *“Enrichment Factor” (EF)*

Este parámetro es uno de los criterios habitualmente empleado para evaluar los sistemas de preconcentración. A pesar de ello, su significado exacto no está bien

definido. Teóricamente, el término se refiere a la relación entre concentración del analito en el concentrado, C_e y en la muestra original, C_s .

$$EF = \frac{C_e}{C_s}$$

En la práctica, la evaluación del EF no es tan sencilla como parece porque la concentración actual del analito en el concentrado frecuentemente se desconoce. Sin embargo una aproximación al EF aceptada es la relación de las pendientes del rango lineal de las curvas de calibración antes y después de la preconcentración. Los valores de EF calculados así, podrían ser muy próximos al verdadero valor si las condiciones analíticas, incluyendo la respuesta del detector, se mantienen durante las dos calibraciones. A veces el EF se deduce simplemente por comparación de las alturas de pico antes y después de la preconcentración. Este modo de evaluación no es recomendable porque se puede cometer un error significativo debido a que la señal antes de la preconcentración es extremadamente baja.

✓ “*Enhancement Factor*” (N)

En los sistemas FIA, las señales del analito son aumentadas durante la introducción del analito en el detector mediante otros mecanismos aparte del incremento de la concentración del analito. Como por ejemplo el uso de disolventes orgánicos en FAAS aumenta la sensibilidad porque generalmente son menos viscosos y tienen menor tensión superficial que el agua favoreciendo la aspiración y nebulización de la muestra. Además la combustión de los disolventes orgánicos suele ser exotérmica, aumentando la temperatura de la llama y por tanto su eficacia²³.

El “*enhancement factor*” es el producto de los N_i individuales y el EF.

$$N_t = N_1 \cdot N_2 \cdot \dots \cdot N_n \cdot EF$$

✓ *Eficiencia de concentración (CE)*

Aunque EF es indispensable para la evaluación de los sistemas de preconcentración, este no proporciona toda la información sobre su eficiencia. Factores de enriquecimiento elevados no están necesariamente asociados con eficiencias elevadas, ya que podrían ser obtenidos con tiempos de preconcentración muy largos, de horas o días, o consumiendo grandes volúmenes de muestra. La eficiencia de concentración se define como el producto del EF y la frecuencia de muestreo expresada como el número de muestras analizadas por minuto.

$$CE = EF \cdot \frac{f}{60}$$

donde f representa el número de muestras analizado por hora. Dado que EF es un parámetro adimensional, CE se expresa en min^{-1} .

A pesar de ser un factor propuesto en la bibliografía para evaluar la eficacia del método de preconcentración, presenta cierta ambigüedad ya que la frecuencia de muestreo, f , es un parámetro relativo que depende del criterio del analista⁴. La manera más sencilla de calcular f sería considerando el tiempo teórico que requiere el análisis de cada muestra según la secuencia del sistema FIA y el tiempo necesario para la detección. Aunque lo más correcto sería anotar el número de muestras analizadas cada hora, durante un número representativo de sesiones de trabajo y calcular la media, obteniendo así la frecuencia de muestreo real. Además debería considerarse el tiempo empleado en la preparación de la muestra y el ajuste y estabilización del sistema FIA. Por tanto, esta segunda forma de estimar la frecuencia de análisis, f , resulta más compleja.

✓ *Índice de consumo*

Este es otro criterio de evaluación de la eficacia de preconcentración con sistemas FIA, complementario al CE, que además tiene en cuenta el volumen de muestra

necesario. Se define como el volumen de muestra necesario para obtener una unidad de EF.

$$CI = \frac{V_s}{EF}$$

donde V_s es el volumen de muestra consumido expresado en ml, empleado para alcanzar el EF del método propuesto.

En los sistemas FI de preconcentración, la muestra puede ser introducida basándose en el volumen de muestra o en el tiempo. En el primer caso, la muestra se carga en un bucle de volumen conocido que a continuación pasa a la corriente del portador. En el segundo caso basado en el tiempo, la cantidad de muestra analizada dependerá del tiempo de bombeo de la muestra y de su caudal.

Cuando la introducción de la muestra se basa en el tiempo, el factor de enriquecimiento, EF, está directamente relacionado con la cantidad de muestra consumida. Usualmente el caudal de la muestra es el factor principal que determina la eficacia del proceso aunque deben tenerse en cuenta las propiedades cinéticas del sistema de reacción y de retención. Con caudales excesivamente elevados la retención podría resultar incompleta porque el tiempo de contacto sea insuficiente. Por ello, se recomiendan caudales de 4-5 ml min⁻¹ para la muestra como punto de partida en la optimización de un método⁶.

1.2.3 Clasificación de las técnicas de separación por FIA

Las técnicas de separación por inyección el flujo se clasifican según el tipo de interfase a través de la cual tiene lugar la transferencia de masa. Se agrupan en tres grandes bloques dentro de los cuales existen diferentes tipos de procesos de separación:

- Líquido-líquido - extracción
 - diálisis
- Líquido-gas
 - difusión gaseosa
 - generación de hidruro o vapor frío
- Líquido-sólido
 - extracción sólida
 - precipitación y coprecipitación-disolución
 - electrodeposición

A continuación se hace una breve descripción de los mecanismos de separación líquido-sólido ya que dentro de este grupo se encuentra el sistema separación y preconcentración en el cual se basan algunos de los métodos desarrollados en este proyecto.

1.2.3.1 Extracción en fase sólida

Las aplicaciones de esta técnica de separación han crecido rápidamente en los últimos años. La muestra se hace pasar a través de un material adsorbente capaz de retener al analito que posteriormente será eluido. Aunque su función principal es la separación y la preconcentración del analito, también puede emplearse para la eliminación de componentes de la matriz que interfieran en la detección. Para ello, se utilizan columnas empaquetadas con distintos rellenos, sistemas de membranas o simplemente la adsorción en las paredes de tubos abiertos.

Las principales ventajas respecto a la extracción en fase líquida son:

- Se elimina el uso de disolventes orgánicos tóxicos aunque en algunos casos se emplean pequeñas cantidades de disolventes orgánicos para la elución.
- La simplificación del sistema FIA, ya que no son necesarios los segmentadores, separadores o reactores de extracción.
- La posibilidad de aspirar continuamente la muestra durante un tiempo ilimitado, lo cual facilita la obtención de un mayor factor de

preconcentración. No obstante la aspiración continua de la muestra puede sufrir fluctuaciones en el caudal debido a pequeñas variaciones en la velocidad de bombeo o a cambios en el adsorbente, lo cual podría causar errores en la determinación.

1.2.3.2 Precipitación y coprecipitación

La precipitación es una de las técnicas de separación más antigua empleado en el análisis químico clásico. La técnica convencional de precipitación es muy laboriosa ya que requiere mucho tiempo, un volumen de muestra grande y gran habilidad del analista, siendo además difícil de diseñar dispositivos para su automatización. Por ello ha sido sustituida por otras técnicas de separación más versátiles y fáciles de automatizar. La primera referencia donde se aplica la manipulación de precipitados en línea usando la técnica de inyección en flujo fue publicada en 1986 por Petersson et al.²⁴, para la determinación indirecta de sulfuros mediante la formación del precipitado de sulfuro de cadmio por FAAS.

Como resultado de los recientes avances, los procesos de separación y preconcentración por precipitación, que originalmente requerían horas de trabajo y unos cientos de mililitros de muestra y reactivos, ahora pueden completarse en menos de 1 minuto con sistemas automatizados de inyección en flujo consumiendo unos pocos mililitros de muestra y reactivos. El riesgo de contaminación también se reduce drásticamente, lo cual implica una mejora en la fiabilidad y precisión de las determinaciones.

Un componente importante del sistema FIA para la precipitación es el colector, el cual debería caracterizarse por:

- Capacidad de atrapar unos pocos mg de precipitado sin aumentar la impedancia.
- Diseño que facilite la dilución y el lavado del colector.

- Construido con materiales inertes, con el fin de minimizar el riesgo de contaminación.
- Estructura robusta que se debe mantener estable a pesar de un uso continuo y prolongado.
- Capacidad de atrapar diferentes formas de precipitado.

Algunos de los colectores empleados son: filtros de acero inoxidable, planos o cilíndricos; filtros de membranas, los cuales suelen caracterizarse por tiempos de vida útil muy cortos; filtros “*packed-bed*”, contruidos con tubos de PTFE o Tygon® empaquetados con gránulos de poliestireno, no son aptos para atrapar grandes cantidades de precipitado en procesos de coprecipitación; y reactores anudados.

En principio la adaptación tanto de la precipitación como de la coprecipitación a un sistema FIA es igualmente factible. No obstante, la precipitación está limitada por el número de reacciones de precipitación selectivas, las cuales produzcan un precipitado con una solubilidad lo suficientemente baja que cumpla los requisitos del análisis de trazas. Mientras que en el caso de la coprecipitación el producto de solubilidad no juega un papel tan importante ya que puede obtenerse el precipitado por adsorción, oclusión o formación de cristales isomórficos. Además presenta menos problemas de interferencias de matriz, lo cual la convierte en una técnica más selectiva. A pesar de todo, la aplicación de la coprecipitación en sistemas FIA es menor respecto a la precipitación.

1.2.3.3 Sistemas de extracción líquido-sólido

1.2.3.3.1 Columnas

Las columnas empaquetadas con intercambiadores iónicos u otro tipo de adsorbentes representan los sistemas de extracción más ampliamente usados en sistemas de separación “on-line”. También pueden utilizarse para eliminar interferencias, modificar la matriz de la muestra y/o preconcentrar elementos traza.

Para que una columna de adsorción pueda ser empleada en un sistema FIA debería cumplir los siguientes requisitos:

- Alta capacidad de adsorción
- Impedancia hidrodinámica baja
- Coeficiente de dispersión bajo
- Estabilidad y gran fiabilidad durante largos periodos de trabajo
- Tiempo de vida que superen al menos un centenar de ciclos

La eficiencia en la preconcentración depende fundamentalmente del diseño de la columna, la elección adecuada del adsorbente empaquetado y de la velocidad de carga y volumen de muestra. Además deben considerarse algunos factores que intervienen durante la etapa de elución como la elección del eluyente, el volumen empleado, el cual debería ser el menor posible y la velocidad de elución^{2, 7, 21}

Los tipos de materiales de relleno más comunes utilizados en sistemas FIA con extracción en fase sólida en columna son: resinas quelatantes de intercambio iónico, como por ejemplo, Chelex-100; Muromac A-1 o Quinolin-8-ol; C₁₈-silica gel empleada para la extracción de complejos metálicos de baja polaridad en fase acuosa; o alumina activada, la cual presenta gran estabilidad tanto en condiciones ácidas como básicas.

Desde la primera aplicación de una columna de intercambio iónico en un sistema FI-FAAS trabajando en modo continuo²⁵ los montajes se han ido perfeccionando para mejorar la eficacia de la preconcentración. Xu et al.²⁶ propone la introducción de un pequeño segmento de aire antes y después de la zona de muestra, mejorando significativamente el factor de preconcentración y obteniendo, además, una mayor precisión en los resultados al reducir la dispersión del analito²⁷.

1.2.3.3.2 Reactores anudados

Los reactores anudados consisten en un capilar de PTFE anudado sobre si mismo. Esta configuración tridimensional produce un flujo secundario en el plano radial debido a variación de la dirección del flujo (Figura 13). Originalmente los reactores anudados han sido empleados como reactores de mezcla propuestos por primera vez por Engelhardt et al²⁸ en 1982. Hasta años más tarde no fue publicada la 1ª aplicación de los reactores anudados a un proceso de precipitación-disolución “on-line” en un sistema de coprecipitación propuesta por Fang et al²⁹. El reactor se usa para atrapar sobre sus paredes el precipitado negro formado por la reacción entre el portador de coprecipitación Fe(II) y el agente complejante hexametilenditiocarbamato.

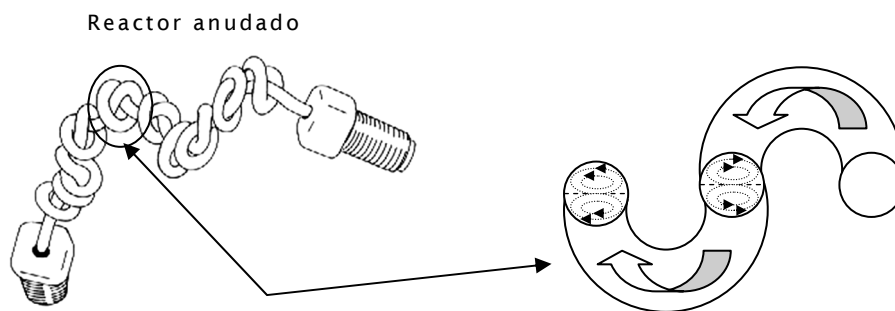


Figura 13. Reactor anudado. Flujo radial secundario característico.

El mecanismo de adsorción en las paredes internas de un reactor anudado se produce por una fuerza centrífuga en la corriente debida al flujo secundario creado por la configuración tridimensional del reactor. Se ha comprobado que la adherencia en el mismo tubo sin anudar, estirado o enrollado, es mucho menos eficaz.

Los reactores anudados de PTFE se pueden emplear únicamente cuando el precipitado es de naturaleza hidrofóbica ya que otra de las razones para que se

produzca la fuerte adherencia del precipitado a las paredes del tubo es que compartan la naturaleza hidrofóbica³⁰.

Garrido-Troche et al.³¹ han realizado un estudio sobre la adsorción de los quelatos en el interior del reactor anudado, en concreto del complejo Cd-DDC, mediante microscopía electrónica y fluorescencia de rayos-X. Se ha observado como a medida que se aumenta el tiempo de carga de la muestra la retención del complejo es mayor, pudiendo llegar en algunos casos a la obstrucción. Por ello, siempre debe tenerse en cuenta la capacidad de adsorción del reactor anudado durante la optimización de un método de preconcentración por adsorción, ya que la saturación produce una disminución de la eficacia en la retención.

A parte de la colección de precipitado, el reactor anudado cumple con otras funciones. En primer lugar, el diseño tridimensional asegura la mezcla rápida de la muestra y los reactivos minimizando la heterogeneidad de las condiciones de reacción. Entonces ya no es necesario el uso de un reactor de reacción antes de la separación. En segundo lugar, limita la dispersión del precipitado disuelto cuando está siendo transportado hacia el detector; lo cual permite obtener factores de enriquecimiento altos.

Las ventajas de los reactores anudados como colectores de precipitados se resumen en:

- La gran superficie de las paredes interiores del reactor proporciona una gran capacidad para la recolección de precipitado. Esto resulta muy útil en las técnicas de coprecipitación en las cuales la cantidad de precipitado suele ser elevada.
- La ausencia de sistemas de filtración evita la sobrepresión a velocidades de flujos altos de 5-6 ml min⁻¹.
- Pérdida de sensibilidad debida a la dispersión resulta despreciable favorecida por la configuración tridimensional.

- Hecho con materiales inertes, reduciendo el riesgo de contaminación.
- Fácil de construir a muy bajo coste.
- El tiempo de vida es muy largo, casi permanente.

El uso de reactores anudados para la preconcentración y separación de adsorción en sistemas FI ha sido aplicado para la determinación de: Cr³²⁻³⁶, Mn^{37, 38}, Fe²⁹, Co^{32, 39-42}, Ni^{32, 38, 40}, Cu^{32, 37, 38, 40, 41, 43, 44}, Zn^{32, 41}, As^{45, 46}, Se⁴⁷, Mo^{32, 40}, Rh⁴⁸, Pd⁴⁸, Ag⁴⁰, Cd^{30-32, 40, 41, 49}, In⁴⁰, Sb^{40, 50, 51}, W³², Pt^{48, 52}, Hg^{53, 54}, Tl⁵⁵ y Pb^{32, 40, 56-59} en muestras ambientales y biológicas.

La preconcentración del analito se logra por la mezcla de la muestra con un agente complejante, dando lugar a un complejo con cierta afinidad con PTFE, material con el que se construyen los reactores anudados. Este complejo queda adherido en las paredes en el interior del reactor anudado hasta su posterior elución. Los agentes complejantes más estudiados son, entre otros: Dietilditiocarbamato sódico (NaDDC)^{30, 44, 49, 54, 57}, amonio pirrolidinditiocarbamato (APDC)^{31, 32, 34-36, 38, 40, 46, 50-52, 55, 56}, dietilditiofosfato (DDP)⁵⁸, 8-hidroxiquinolina (8-HQ)^{38, 42}, 1-fenil-3-metil-4-benzoilpirazol-5-ona (PMBP)³⁷, ditiona⁴¹, dietiltiourea⁴⁸. Tanto NaDDC como APDC se han empleado para la preconcentración de varios metales ya que pueden formar complejos con numerosos elementos.

El quelato retenido en el reactor anudado se eluye en el menor volumen posible para obtener factores de preconcentración elevados. Los eluyentes más empleados son: metilisobutilcetona (MIBK), el etanol, metanol y ácidos minerales, HCl o HNO₃.

Las primeras aplicaciones de los reactores anudados para la preconcentración "on-line" han empleado como eluyente MIBK^{29, 30, 34, 35, 44, 50}. La elución con disolventes orgánicos como MIBK exige el uso de tubos específicos en las bombas peristálticas y separadores de fase debido a su inmiscibilidad con disoluciones

acuosas. Se descarta su uso en sistemas FAAS porque los disolventes orgánicos producen un incremento de sensibilidad que puede inducir errores en los resultados de los análisis.

Los alcoholes, etanol^{36, 51, 55, 57, 58} y metanol^{37, 38, 42, 52}, se han utilizado en los métodos de preconcentración mediante FI-ETAAS, dada su elevada volatilidad y baja señal de fondo. Sobre todo, la elección de los alcoholes se fundamenta en el cumplimiento de una de las limitaciones de ETAAS, el volumen de inyección no debería superar los 50 μl . Se ha comprobando que con ambos eluyentes, etanol y metanol, se obtiene una elución eficaz cumpliendo esta premisa.

Cuando la detección se realiza con ICP-MS se utiliza como eluyente el HNO_3 ^{32, 40, 48, 60} con el fin de evitar los efectos adversos de los disolventes orgánicos, la inestabilidad o incluso la posible extinción del plasma¹⁹. En otros casos se ha empleado el HCl, para la detección en FAAS⁵⁶ y HG-AFS⁴⁶. En este último caso ha sido elegido como eluyente el HCl porque además facilita la generación de hidruros.

1.3 Agente complejante (APDC)

Amonio pirrolidinditiocarbamato (APDC) es un reactivo muy estudiado que reacciona con más de 30 elementos formando complejos muy estables (Figura 14). La diferencia entre las constantes de formación entre los metales de transición y el grupo de los alcalinos y alcalinotérreos ha sido aplicada para la determinación de metales traza en matrices salinas, como el agua de mar. A diferencia de NaDDC, el cual debe prepararse tamponando a pH 9, APDC es estable en medio ácido.

Este compuesto ha sido utilizado para la preconcentración de diversos metales, seguida de la separación por diferentes mecanismos: extracción con MIBK^{35, 61, 62},

adsorción en columna sobre C₁₈-silica gel⁶³⁻⁶⁵, Amberlita XAD-4⁶⁶ o adsorción sobre reactores anudados^{38-41, 46, 53}.

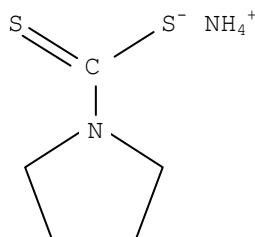


Figura 14. Fórmula del amonio pirrolidinditiocarbamato (APDC)

2 Determinación selectiva de As(III) en agua de mar

2.1 INTRODUCCIÓN

2.1.1 Especiación de As en agua de mar

En el agua de mar tanto en el océano como en zonas costeras, el As se encuentra en concentraciones entre 1-3 $\mu\text{g l}^{-1}$ aunque estos valores varían entre el agua superficial y el agua del fondo y en diferentes partes del mundo⁶⁷. Las formas predominantes de As en agua de mar son las formas inorgánicas, As(III) y As(V) y las formas metiladas MMA y DMA, las cuales se forman mediante biotransformación del As(V) por el fitoplancton. Según cálculos termodinámicos el arsénico en agua de mar suficientemente oxigenada debería encontrarse mayoritariamente como arsenato, (HAsO_4^{-2} y H_2AsO_4^-); sin embargo, debido a la reducción biológica pueden obtenerse niveles apreciables de arsenito, H_3AsO_3 ⁶⁷⁻⁷⁰.

En los organismos marinos: algas, pescado y marisco, las concentraciones de arsénico orgánico son especialmente altas. La arsenobetaina, que se encuentra fundamentalmente en el pescado, no es considerada tóxica; mientras que de los arsenoazúcares, especies dominantes en algas, moluscos y mariscos, no se conocen con detalle sus consecuencias para el ser humano⁷¹.

2.1.2 Técnica analítica empleada

Para la determinación de las especies de As en aguas, donde las concentraciones son inferiores a $2 \mu\text{g l}^{-1}$, se requieren técnicas analíticas altamente sensibles y selectivas. Técnicas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía de intercambio iónico permiten la separación de las diferentes especies de arsénico; pero los elevados tiempos de análisis y factores de dilución altos limitan su aplicabilidad⁷²

La espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS) es un sistema de detección muy selectivo pero no suficientemente sensible por lo que es necesario recurrir a la preconcentración. Una de las técnicas de preconcentración empleada en métodos de especiación es la formación de complejos, ya que esta reacción suele ser específica para un sólo estado de oxidación⁷².

Con el fin de automatizar la separación de las distintas especies y la preconcentración utilizaremos un sistema de inyección en flujo (FI). El acoplamiento FI-ETAAS permite la complejación, preconcentración y determinación selectiva de As(III) en continuo, evitando la manipulación de muestra y por lo tanto minimizando el riesgo de contaminación. Además es posible la automatización de todo el proceso de especiación ya que para la determinación de As total se puede utilizar el mismo método con la inclusión de una etapa de prerreducción de la muestra, para que todo el arsénico presente se transforme en

As(III). De este modo, se puede determinar la concentración de As(III) y la concentración de As total, obteniendo la concentración de As(V) por diferencia.

En 1991 Sperling et al.⁷² ha desarrollado un método para la determinación selectiva de As basado en la preconcentración “on-line” usando una microcolumna. Sin embargo, los mecanismos de adsorción en microcolumnas se caracterizan por una alta impedancia hidrodinámica, lo cual limita el volumen de muestra a tratar¹⁹.

Una alternativa a este sistema de preconcentración es el uso de reactores anudados, propuesta por primera vez por Fang et al.³⁰ acoplado a un equipo de FAAS. Posteriormente Sperling et al.⁵⁷ y Yan et al.⁵¹ extienden el uso de los reactores anudados a sistemas de preconcentración “on-line” acoplados a ETAAS. Los reactores anudados presentan algunas ventajas frente a las microcolumnas: se puede introducir una mayor cantidad de muestra, lo que implica una mayor capacidad de preconcentración; no es necesario utilizar sustancias adsorbentes de relleno, reduciendo la impedancia; el tiempo de vida útil es más elevado y además los costes son más bajos^{5, 46, 73}

A continuación se describe el procedimiento elegido para la especiación de As mediante un sistema FI-ETAAS. El flujo de la muestra se mezcla con los reactivos para la complejación de As(III). El quelato que se forma tras la adición de APDC a la muestra en medio ácido quedará adherido a las paredes de un reactor anudado de politetrafluoroetileno (PTFE); mientras que el As(V) será eliminado, dando lugar a la separación de las dos especies inorgánicas de As. El complejo As-APDC que queda retenido en el reactor anudado, se eluye posteriormente con una pequeña cantidad de etanol mediante un flujo de aire segmentado, logrando así, la preconcentración. El volumen de etanol utilizado como eluyente se introduce en el tubo de grafito pirolítico mediante la conexión de la salida del reactor anudado al capilar de inyección, acoplando el sistema de inyección en flujo al equipo de ETAAS.

2.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.2.1 Equipamiento

2.2.1.1 Aparatos

Las medidas se han realizado usando un espectrómetro Perkin-Elmer Model 4100ZL equipado con una cámara de grafito de calentamiento transversal (THGA) y el automuestreador AS 71. Se han utilizado tubos de grafito pirolítico con plataforma L'vov. Este equipo además dispone de un corrector de fondo Zeeman. Se ha usado una lámpara de descarga de As la cual proporciona una longitud de onda de 193,7 nm con un ancho de banda espectral de 0,7 nm conectada a una fuente de alimentación trabajando a 380 mA. Para la evaluación de los resultados se ha empleado la absorbancia integrada durante 5 segundos.

El espectrómetro se ha acoplado al sistema de inyección en flujo PerkinElmer FIAS-400 equipado con 2 bombas peristálticas controladas individualmente y una válvula de inyección estándar de 5 vías. Ambos equipos se controlan desde un único ordenador con el software AAWinLab 4.01, funcionando en modo "*FIAS-Furnace*". En la tabla 2 se resumen la secuencia de trabajo del FIAS-400. Además se ha empleado dos válvulas Rheodyne, una de selección con 6 entradas y 1 salida y otra de conmutación de 6 posiciones. Para impulsar la muestra, los reactivos, el eluyente y el aire se han usado tubos Tygon® (Perkin-Elmer). El bucle de carga se ha construido con capilar de PTFE de 0,5 mm de diámetro interno variando la longitud (10, 15, 20, 25, o 30 cm) para obtener diferentes volúmenes de eluyente 20, 30, 40, 50, 60 µl etanol. Todas las conexiones están construidas con capilar de PTFE de 0,35 mm de diámetro interno. Varios reactores anudados de diferentes longitudes se han hecho con un capilar de PTFE de 0,5 mm de diámetro interno.

2.2.1.2 Reactivos

- Disolución patrón de As(III) de 1000 mg l⁻¹ As SpectroSol (BDH, Reino Unido)
- Disolución patrón de As(V) de 1000 mg l⁻¹ As preparada disolviendo Na₂HSO₄ para análisis (Merck, Alemania) y conservada a 4°C.
- Amonio pirrolindinitiocarbamato (APDC) (Sigma, Alemania). A partir de esta sal se prepara un disolución stock del 1% (m/v) APDC y se conserva a 4°C.
- HCl 35% Hiperpur (Panreac, España).
- HNO₃ 69% Hiperpur (Panreac, España).
- Etanol absoluto para análisis (Panreac, España)
- NaCl para análisis, (Merck, Alemania),
- MgSO₄·7H₂O, PA-ACS (Panreac, España)
- NaHCO₃ para análisis (Merck, España)
- Molibdato amónico para análisis (Merck, Alemania)
- Disolución patrón de 1000 mg l⁻¹ Ni SpectroSol (BDH, Reino Unido)
- Disolución patrón de 1000 mg l⁻¹ Zn (Merck, Alemania)
- Disolución patrón de 1000 mg l⁻¹ Fe Atomic Spectroscopy Standard (PerkimElmer, USA)
- Disolución patrón de 1000 mg l⁻¹ V Certipur (Merck, Alemania)
- Disolución patrón de 1000 mg l⁻¹ Al (Merck, Alemania)
- Disolución patrón de 1000 mg l⁻¹ Se (Merck, Alemania)
- Disolución patrón de 1000 mg l⁻¹ Cu Atomic Spectroscopy Standard (PerkimElmer, USA)
- Disolución patrón de 1000 mg l⁻¹ Sn SpectroSol (BDH, Reino Unido)
- Disolución patrón de 1000 mg l⁻¹ Mn (Panreac, España)

- Disolución patrón de 1000 mg l⁻¹ Co (BDH, Reino Unido)
- Disolución patrón de 1000 mg l⁻¹ Sb (Baker, USA)
- Disolución patrón de 1000 mg l⁻¹ Ag (BDH, Reino Unido)
- Disolución patrón de 1000 mg l⁻¹ Cr CertiPur (Merck, Alemania)
- Disolución patrón de 1000 mg l⁻¹ Hg Atomic Spectroscopy Standard (PerkimElmer, USA)
- Disolución patrón de 1000 mg l⁻¹ Cd (Merck, Alemania)
- Disolución patrón de 1000 mg l⁻¹ Pb (Merck, Alemania)
- Disolución patrón de 1000 mg l⁻¹ Ga SpectroSol (BDH, Reino Unido)
- Bi(NO₃)₃ para análisis (Merck, Alemania).
- Agua ultrapura. Resistividad 18 MΩ cm usando el sistema de purificación de agua Milli-Q[®] (Millipore).
- IrCl₃ (Sigma, Alemania). Se prepara una disolución de 1g l⁻¹ para el recubrimiento del tubo de grafito.
- Argón N50 pureza: 99,999%, empleado como gas de purga y refrigeración en el atomizador.

2.2.1.3 Limpieza del material

Todo el material necesario, antes de ser utilizado, fue lavado cuidadosamente con agua y jabón, se enjuagan con agua Milli-Q[®] y se mantienen durante 48 horas en una disolución de HNO₃ al 10%. Posteriormente se vuelve a enjuagar con agua Milli-Q[®] y se almacena seco y listo para su uso en un lugar libre de polvo.

2.2.2 Diseño del montaje FI

Teniendo en cuenta los procesos que debe seguir la muestra para la determinación selectiva de As(III), se ha diseñado el circuito del sistema de inyección en flujo basándonos en un trabajo anterior⁵¹. A diferencia del equipo FIAS empleado en dicho trabajo no disponemos de una válvula de inyección de 8 vías. El modelo FIAS-400 (Perkin-Elmer) con el cual trabajaremos está equipado con una válvula de inyección de 5 vías, la cual resulta insuficiente. Con el fin de suplir esta carencia se ha colocado una válvula de selección en una de las salidas de la válvula de inyección para controlar la entrada al reactor anudado. Aunque la válvula de selección nos resuelva el problema de equipamiento presenta un inconveniente. Esta válvula no se puede controlar con el mismo software que el FIAS-400, por lo que debemos cambiarla manualmente; entonces el sistema deja de ser totalmente automático y requiere la participación del analista. Aunque durante el proceso de optimización del método no supone una desventaja utilizar la válvula de inyección de 5 vías; no obstante, para el análisis de un número elevado de muestras recomendamos el uso de la válvula inyección de 8 vías, con la cual el análisis puede ser automatizado. El hecho de usar una u otra válvula de inyección no debiera afectar al proceso de separación y preconcentración; simplemente el montaje FI sería algo diferente.

A continuación se explican con detalle cada una de las etapas para el montaje del sistema FI empleando el equipamiento disponible (Figura 15).

A. Preconcentración

La bomba peristáltica 1 (B1) se pone en marcha a una velocidad de 60 rpm, obteniendo un caudal de 5 ml min^{-1} para la muestra y el HCl y de $1,5 \text{ ml min}^{-1}$ para el APDC empleando tubos Tygon[®] de 1,52 y 0,76 mm de diámetro interno respectivamente. En esta etapa la muestra se acidifica con HCl antes de mezclarla con el agente complejante, APDC, porque la reacción de complejación es favorable en medio ácido. Inmediatamente después la mezcla muestra acidificada/APDC entra en un reactor anudado de 100 cm de longitud, donde el

As(III) complejado con el APDC quedará retenido en las paredes de este reactor. Mientras el As(V) se elimina con el resto de la muestra por el desagüe.

B. Limpieza

Después de 1 min se detiene la bomba 1 y se cambia la posición de la válvula de selección de la posición 2 a la 3. Se pone en marcha la bomba peristáltica 2 (B2), con la cual se impulsa la disolución de lavado durante 10 s a un caudal de 3 ml min⁻¹ utilizando un tubo Tygon[®] de 1,14 mm de diámetro interno.

C. Vaciado

Se detiene momentáneamente la bomba 2 mientras se cambia la posición de la válvula de selección de la posición 3 a la 1. En esta posición una corriente de aire, con un caudal de 3 ml min⁻¹ aproximadamente, pasa por la válvula de inyección en posición de inyección vaciando el reactor anudado y el circuito hasta el extremo que se inyectará en el interior de tubo de grafito. Durante esta etapa la disolución de lavado está recirculando.

D. Carga del eluyente

Una vez eliminado la disolución de lavado, el sistema está preparado para la elución del complejo As(III)-APDC retenido en el reactor anudado. Antes se cambia la válvula de inyección a la posición de carga manteniendo la válvula de selección en la posición 1. Aspirando a 35 rpm se carga el pequeño bucle con etanol, el cual actuará como eluyente.

E. Elución

El brazo del inyector del equipo ETAAS mueve el capilar hacia el interior del tubo de grafito. Mientras tanto, la válvula de inyección vuelve a la posición de inyección y el etanol se impulsa lentamente con una corriente de aire con un caudal aproximado de 1 ml min⁻¹. El complejo As(III)-APDC retenido en el reactor anudado se eluye con un pequeño volumen de etanol. Transcurridos 40 s, el etanol se deposita en el tubo de grafito y el brazo del inyector regresa a su posición inicial. Entonces comienza el programa de temperaturas de la cámara de

grafito para la detección del As presente en el volumen inyectado, correspondiente al As retenido en el reactor anudado.

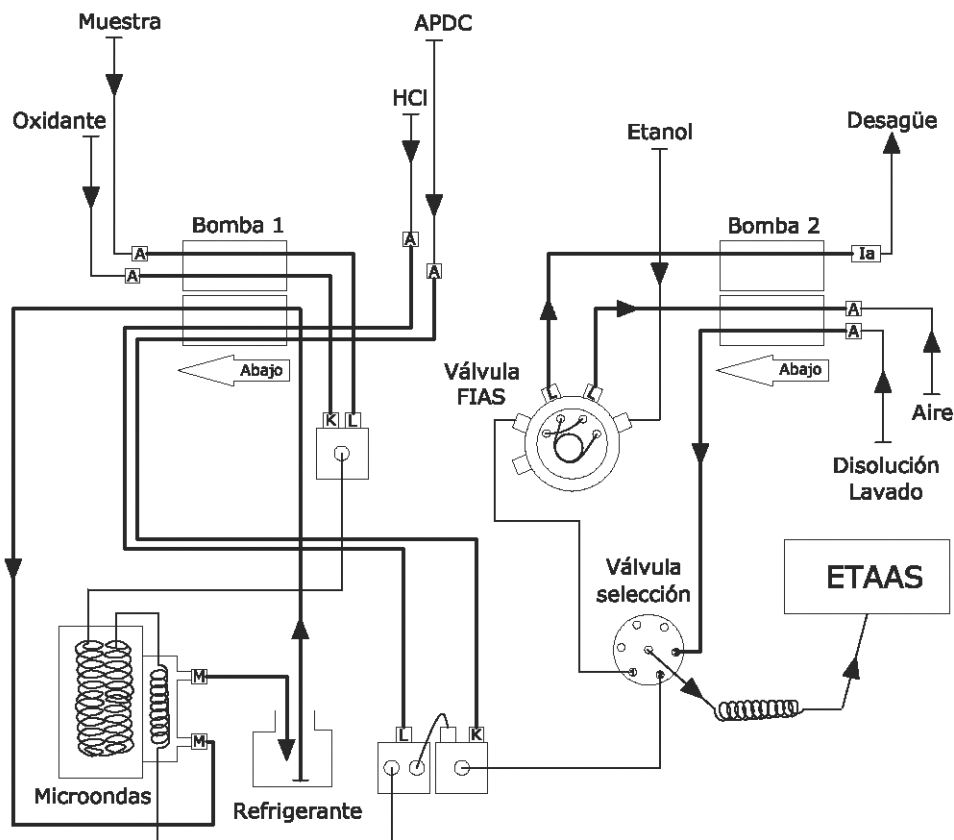


Figura 15. Esquema de montaje del sistema FI-ETAAS para la determinación selectiva de As(III) en agua de mar.

Esta sería la secuencia lógica del proceso de determinación selectiva de As(III), pero con el fin de acortar el tiempo necesario para cada réplica se ha comenzado por la etapa "d", carga de eluyente. De este modo durante la etapa de preconcentración, el programa de temperaturas de la cámara de grafito está en funcionamiento. La duración de un ciclo completo (Tabla 2) es de 3 min 20 s.

Debe tenerse en cuenta que el valor de As obtenido corresponde siempre a la réplica anterior.

Tabla 2. Secuencia del sistema FIAS-400 para la preconcentración y determinación de As(III).

Etapa	Tiempo/ s	Bombeo/ rpm		Descripción
		B1	B2	
Carga etanol	3	0	35	Bucle 40µl de etanol Se introduce el capilar dentro de la cámara
Elución	45	0	20	Deposita el etanol en el tubo y sale el capilar Se inicia el programa de temperaturas ETAAS
Preconcentración	120	60	0	Reacción muestra/APDC Circula a través de reactor anudado
Limpieza	10	0	60	Disolución lavado APDC + HNO ₃
Vaciado	20	0	60	Preparación para la siguiente elución Finaliza el programa de temperaturas ETAAS

2.2.3 Optimización del programa de temperaturas de la cámara de grafito

La optimización del programa de temperaturas de la cámara de grafito se ha realizado trabajando únicamente con el equipo ETAAS de momento el sistema FI se mantendrá apagado. En primer lugar, se ha chequeado la sensibilidad inyectando distintos patrones de As preparados en etanol, utilizando el programa de temperaturas recomendado por el fabricante del equipo ETAAS para la determinación de As (Tabla 3).

Los valores de absorbancia obtenidos son menores a lo esperado, probablemente debido a la pérdida del analito antes de la atomización provocada por la elevada volatilidad tanto del As como del etanol.

Esto nos hizo pensar en la necesidad del uso de un modificador de matriz, el cual permitiría trabajar a temperaturas de mineralización más elevados sin pérdida del analito. Uno de los modificadores de matriz más adecuados para la determinación

de As es el Pd²³. Sin embargo, en este caso no se puede añadir Pd a la muestra tal y como se ha diseñado el montaje del sistema de inyección en flujo.

Tabla 3. Programa de temperaturas de la cámara de grafito recomendado por Perkin-Elmer para la determinación de As.

Etap	Temperatura / °C	Rampa / s	Permanencia / s	Flujo Ar / ml min⁻¹
Secado I	110	1	30	250
Secado II	130	15	30	250
Mineralización	1200	10	20	250
Atomización	2000	0	5	0
Limpieza	2450	1	3	250

Otra forma de utilizar un modificador de matriz consiste en el recubrimiento del tubo de grafito. Sin embargo, el recubrimiento con Pd presenta un inconveniente: la duración. Se pierde después de varias inyecciones; lo cual supondría estar recubriendo el tubo constantemente. Otra solución consiste en el uso de metales refractarios como iridio, wolframio o zirconio como recubrimiento permanente⁷⁴⁻⁷⁶.

Tabla 4. Programa de temperaturas de la cámara de grafito para el recubrimiento con Ir de los tubos de grafito para la determinación de As.

Etap	Temperatura / °C	Rampa / s	Permanencia / s	Flujo Ar / ml min⁻¹
1	150	25	40	250
2	200	20	30	250
3	2000	0	5	250

Basándonos en trabajos anteriores realizados en nuestro grupo de investigación⁷⁷,⁷⁸ se ha optado por el recubrimiento con Ir. El tubo de grafito se recubre inyectando 100 µl de una disolución de 1 g l⁻¹ Ir y calentando según las etapas 1 y

2 del programa dado en la tabla 4. Esta secuencia se repite 4 veces, y para finalizar se inyecta una vez más 100 µl de la disolución de Ir ejecutando el programa de temperaturas hasta el final. Este tratamiento resulta efectivo a lo largo del tiempo de vida útil del tubo de grafito, al menos 300 ciclos.

Se ha observado una mejora sustancial en la sensibilidad de la determinación de As empleando los tubos recubiertos con Ir tal como se ha descrito anteriormente, por lo tanto ya se puede optimizar el programa de temperaturas de la cámara de grafito. Al revisar la etapa de secado se observa que la disolución de As en etanol se seca a temperaturas algo menores a las aconsejadas por el fabricante del equipo de ETAAS; lo cual tiene sentido por tratarse de una disolución bastante volátil. Seleccionamos, entonces, 90°C y 120°C como temperaturas de secado manteniendo los tiempos de rampa y permanencia.

Para la optimización de la temperatura de mineralización se ha estudiado el comportamiento de una disolución de 20 µg l⁻¹ As(III) preparada en etanol a distintas temperaturas entre 150°C y 1700°C (Figura 16). El valor de absorbancia se mantiene prácticamente constante hasta 1400°C, sin embargo la forma de la señal obtenida a 1200°C es mucho mejor, por ello hemos elegido 1200°C como la temperatura óptima de mineralización.

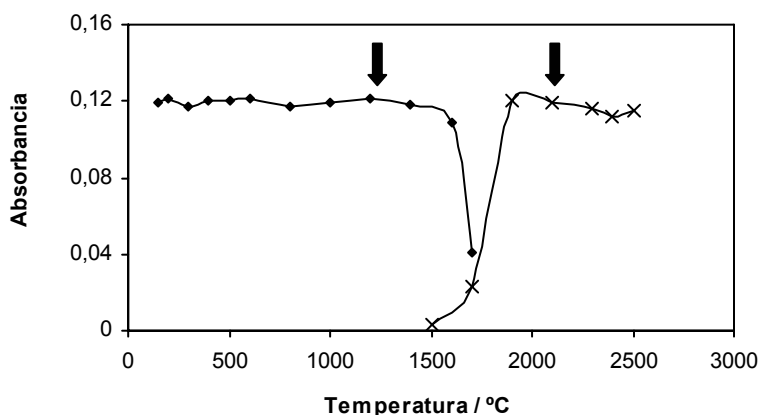


Figura 16. Curvas de mineralización y atomización para etanol dopado con de 20 µg l⁻¹ As(III).

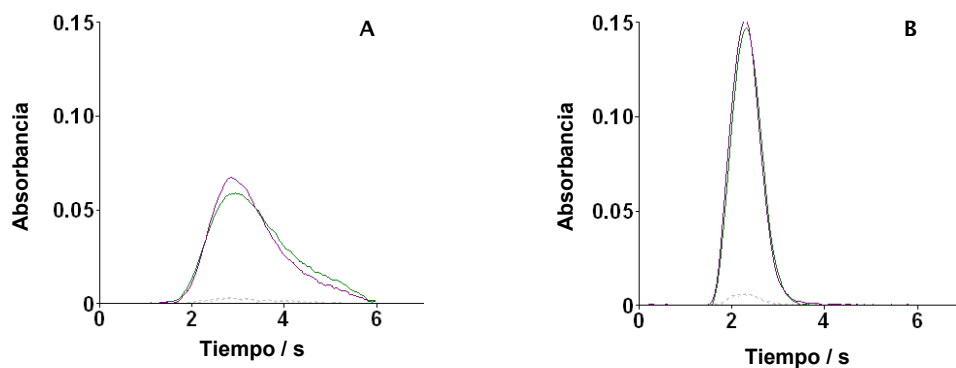


Figura 17. Comparación entre los perfiles de absorbancia obtenidos: A. 1900°C y B. 2100°C.

Estudiando la influencia de la temperatura de atomización sobre el perfil de absorbancia entre 1500°C y 2500°C (Figura 16), se observa una mejora considerable en la forma del pico a 2100°C (Figura 17). La señal a esta temperatura es mucho más alta y estrecha, a pesar de que el máximo de absorbancia se alcance a 1900°C. Por lo que se ha seleccionado 2100°C como temperatura óptima de atomización.

El programa de temperaturas de la cámara de grafito optimizado se resume en la tabla 5.

Tabla 5. Programa de temperaturas de la cámara de grafito para la determinación de As(III)

Etapa	Temperatura / °C	Rampa / s	Permanencia / s	Flujo Ar / ml min ⁻¹
Secado I	90	1	30	250
Secado II	120	15	30	250
Mineralización	1200	10	20	250
Atomización	2100	0	5	0
Limpieza	2450	1	3	250

Una vez finalizada la optimización del programa de temperaturas se acopla el montaje FI con el equipo ETAAS para trabajar en modo continuo.

2.2.4 Formación del complejo. Optimización

Tomando como referencia el trabajo para la determinación de Sb(III) mediante FI-ETAAS⁵¹, las condiciones de partida para la formación del complejo son:

- 0,02% m/v APDC,
- 0,02% v/v HCl,
- 0,02% m/v APDC/0,02% v/v HNO₃ como disolución de lavado.

2.2.4.1 Efecto de la concentración de HCl

La adición de HCl resulta necesaria porque, como se ha demostrado, la reacción de complejación con APDC se produce en medio ácido y el agua de mar tiene pH básico, pH 8.

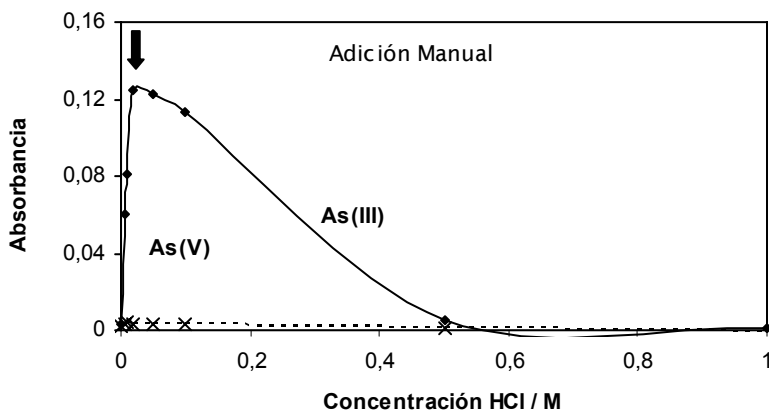


Figura 18. Optimización de la concentración de HCl para la formación del complejo As-APDC en agua de mar sintética. Adición manual del ácido a las muestras.

Inicialmente para la optimización del pH se han añadido manualmente diferentes cantidades de ácido a las muestras, con el fin de simplificar el montaje FI mientras nos familiarizamos con el funcionamiento del sistema. Para ello se han preparado una serie de disoluciones de agua de mar sintética dopadas con $2 \mu\text{g l}^{-1}$ As(III) variando la concentración de HCl entre 0 y 1 M.

En ausencia de ácido y para concentraciones inferiores a 0,005 M HCl (Figura 18), los valores de absorbancia son prácticamente nulos; lo cual implica que el As(III) no quedó adherido a las paredes del reactor anudado, posiblemente porque la formación del complejo no tuvo lugar. Analizando los resultados de este experimento las condiciones óptimas de acidez para la reacción de complejación se dan a pH entorno a 2, correspondiente a la disolución de 0,02 M HCl; porque a medida que aumentamos la concentración de HCl por encima de 0,1 M, la señal vuelve a disminuir. Esto significa que un exceso de ácido perjudica la formación del complejo, probablemente debido a una degradación del APDC en medio ácido.

Para comprobar la selectividad del proceso se ha repetido el mismo experimento con agua de mar dopada con As(V). Independientemente de la acidez de la muestra la señal es nula (Figura 18). Entonces se puede afirmar que el APDC reacciona selectivamente con As(III) y que únicamente queda retenido en las paredes del reactor el arsénico complejado y no en forma iónica. Las muestras se han analizado inmediatamente después de ser preparadas para evitar posibles cambios en la especiación.

Después de optimizar las demás variables que afectan a la formación del complejo y antes de proceder al estudio de las características analíticas; se ha modificado el montaje FI para la adición del HCl automatizada. El ácido se bombea a través de un capilar del mismo diámetro que la muestra para que el caudal sea el mismo; de manera que la mezcla del ácido y la muestra sea lo más homogénea posible, la cual se produce en una intersección en forma de "T" antes de la adición del APDC.

Entonces se ha revisado la optimización de la concentración de HCl adicionada en modo continuo. En este caso la concentración óptima, 0,01 M HCl, es ligeramente inferior a la resultante con la adición manual del ácido (Figura 19).

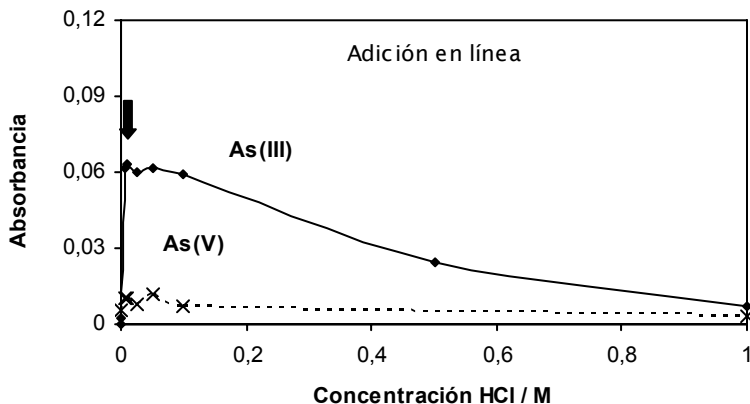


Figura 19. Optimización de la concentración de HCl para la formación del complejo As-APDC en agua de mar sintética. Adición en línea.

2.2.4.2 Efecto de la cantidad de APDC

Se ha preparado una disolución del 1% m/v APDC, la cual se mantiene por debajo de 4°C para su conservación. Esta disolución se ha empleado para la preparación de varias disoluciones variando la concentración de APDC entre 0-0,5%. Con estas disoluciones se ha realizado el estudio de la influencia de la cantidad del agente complejante sobre la retención de As en las paredes interiores del reactor anudado, analizando una muestra de agua de mar sintética dopada con 2 µg l⁻¹ As(III).

La formación del complejo comienza a ser efectiva por encima de 0,005% m/v APDC, como se puede comprobar en la figura 20. El máximo de absorbancia se alcanza a 0,05%, por lo que se ha seleccionado esta como la cantidad idónea de agente complejante, APDC.

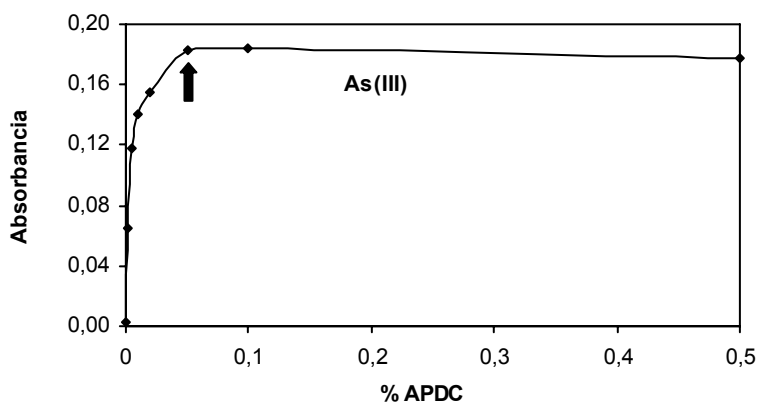


Figura 20. Optimización de la cantidad de APDC para la formación del complejo As-APDC en agua de mar sintética.

2.2.4.3 Efecto de la proporción de mezcla muestra/APDC

Otro parámetro a estudiar es la proporción de mezcla entre la muestra y el agente complejante que depende de los caudales a los que fluyen la muestra y el APDC. Utilizando tubos Tygon® de diferentes diámetros para impulsar la muestra (Tabla 6) se puede variar su caudal mientras se mantiene constante el caudal del APDC a 3 ml min^{-1} .

Tabla 6. Características de los tubos Tygon utilizado. Los caudales corresponden a una velocidad de bombeo de 60 rpm.

Código color	Diámetro / mm	Caudal / ml/min^{-1}
Negro/Negro	0,76	1,5
Rojo/Rojo	1,14	3
Amarillo/Azul	1,52	5
Violeta/Violeta	2,06	10

Estos ensayos se han realizado empleando una disolución de agua de mar sintética dopada con $2 \mu\text{g l}^{-1}$ As(III) y un tiempo de preconcentración de 1 min. Los valores de absorbancia máximos se obtienen con el tubo de mayor diámetro interno, 2,06 mm, dando un caudal de 10 ml min^{-1} (Figura 21); lo cual implica que la capacidad de la retención del complejo en las paredes del reactor anudado se mantiene a pesar de un aumento en la cantidad de As que pasa a través de él.

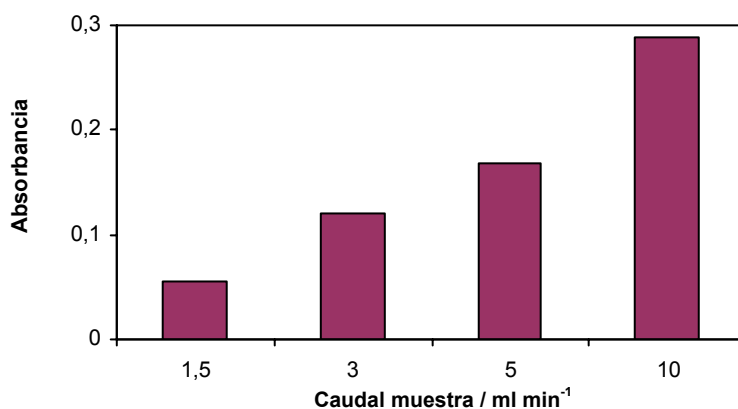


Figura 21. Optimización del caudal de la muestra para la determinación selectiva de As(III) en agua de mar mediante FI-ETAAS.

Cabe resaltar la mejoría sustancial de la sensibilidad del método; ya que hasta ahora se ha empleado una muestra de agua de mar sintética dopada con $2 \mu\text{g l}^{-1}$ As(III) y para continuar con la optimización la reduciremos un poco para que los valores de absorbancia entren dentro de las condiciones de trabajo recomendadas por el fabricante del equipo ETAAS.

Sin embargo, la elección del caudal estará condicionada por el volumen de muestra consumido, el cual depende tanto del caudal de la muestra como del tiempo de preconcentración.

2.2.4.4 Efecto del tiempo de preconcentración

A continuación se ha realizado otra serie de experimentos para los dos tubos de mayor diámetro 1,52 mm y 2,06 mm, variando el tiempo de preconcentración entre 10 y 120 s, para el análisis de una disolución de agua de mar sintética dopada con $0,5 \mu\text{g l}^{-1}$ As(III).

Los resultados representados en la figura 22 confirman que el factor de preconcentración depende de la cantidad de muestra que pase a través del reactor anudado. Se ha obtenido el mismo factor de preconcentración usando el tubo Tygon® de 1,52 mm bombeando la muestra durante 60 s y 120 s; y usando el tubo de 2,06 mm durante 30 s y 60 s, respectivamente; porque entre ellos el volumen de muestra consumido es equivalente.

Sin embargo con el tubo de 2,06 mm se produce mayor variabilidad en los resultados, por lo que se ha decidido utilizar el tubo 1,52 mm. Aunque con este tubo el tiempo de preconcentración deba ser mayor, 120 s, para obtener el mismo resultado, esto no repercute en el tiempo total del análisis porque la etapa de preconcentración ocurre simultáneamente a la determinación de la réplica anterior en el ETAAS. El volumen de muestra consumido por réplica es 10 ml.

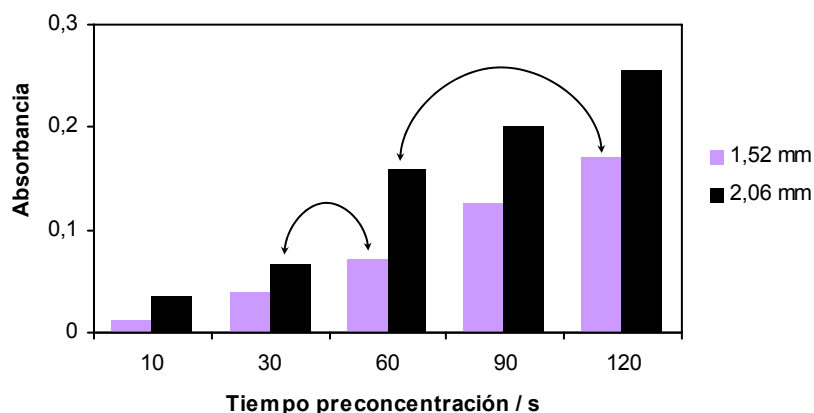


Figura 22. Efecto del tiempo de preconcentración y elección del diámetro del tubo para bombear la muestra en la determinación selectiva de As(III) en agua de mar mediante FI-ETAAS.

2.2.4.5 Elección de la disolución de lavado

Dada la complejidad de la matriz de las muestras de agua de mar resulta imprescindible la etapa de lavado previa a la elución con el objetivo de eliminar las posibles interferencias debidas a las sustancias débilmente adheridas a las paredes del reactor anudado. Se ha realizado una serie de experimentos variando el tiempo de lavado entre 5 y 60 s empleando como disoluciones de lavado: agua Milli-Q[®]; 0,02% v/v HNO₃ y una mezcla 0,02% m/v APDC/ 0,02% v/v HNO₃.

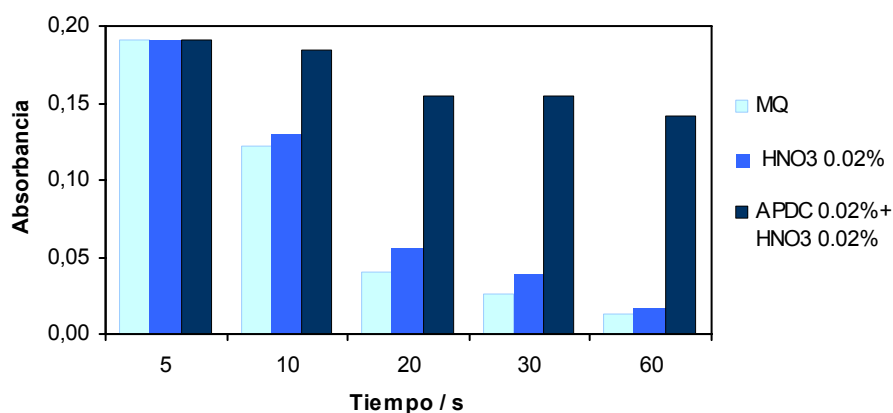


Figura 23. Estudio de la disolución de lavado para la determinación de As(III) en agua de mar mediante FI-ETAAS.

Tanto el agua Milli-Q[®] como el HNO₃ arrastran el As retenido en las paredes del reactor si la etapa de lavado supera los 5 s (Figura 23). Y como el tiempo mínimo para que la disolución de lavado recorra todo el reactor anudado es de 10 s, se descarta el agua Milli-Q[®] y el HNO₃ como disoluciones de lavado porque provocarían la pérdida de parte del analito. Este fenómeno probablemente sea debido a la relativamente débil retención del complejo por el reactor anudado o a la baja estabilidad del quelato¹⁹.

No obstante, empleando la mezcla APDC/HNO₃ la señal disminuye gradualmente siendo insignificante la diferencia entre las señales de absorbancia a 5 ó 10 s. La

adición del agente complejante en la disolución de lavado impide que se produzca la disociación del complejo As-APDC y como consecuencia que se libere parte del As retenido en las paredes del reactor y sea arrastrado junto a las posibles interferencias hacia el desagüe.

A continuación se ha optimizado la cantidad de APDC de la disolución de lavado variando la concentración entre 0-0,1%, manteniendo la concentración de HNO₃ al 0,02% (v/v). Los valores de absorbancia obtenidos presentan una variación mínima (Figura 24), por lo que se ha considerado que la adición de 0,01% m/v APDC será suficiente para evitar la liberación de As retenido.

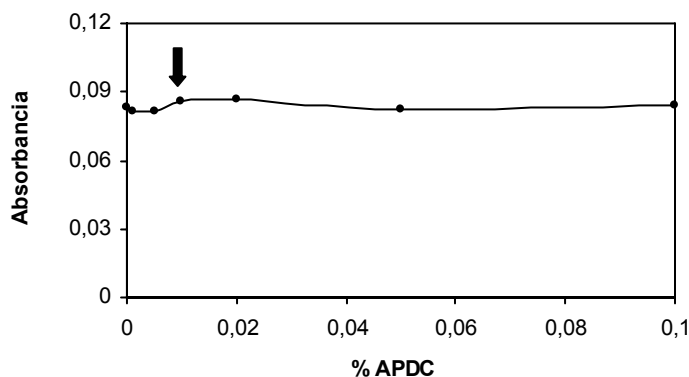


Figura 24. Optimización de concentración de APDC en la disolución de lavado para la determinación de As(III) en agua de mar mediante FI-ETAAS.

2.2.4.6 Efecto de la longitud del reactor anudado y del volumen de elución

Se ha estudiado el efecto de la longitud del reactor anudado y el volumen de elución conjuntamente por estar ambos parámetros estrechamente relacionados. Se han construido reactores de diferentes longitudes: 50, 75, 100, 125, 150 y 200 cm, anudando capilares de PTFE de 0,5 mm de diámetro interno. Y para cada uno de los reactores anudados se realizaron distintas pruebas variando los volúmenes de elución entre 20 y 60 μ l de etanol absoluto. El etanol es impulsado por aire usando un tubo Tygon[®] de 1,14 mm de diámetro interno.

En el caso del reactor de 200 cm solamente se ha logrado repetibilidad en los resultados con los volúmenes de elución mayores, 50 ó 60 μl . La resistencia que ofrecen las paredes del reactor provocan la fragmentación del etanol, por ello empleando volúmenes menores de etanol no llegan al final del circuito en el tiempo establecido y si lo alcanzan producen salpicaduras dentro del tubo. Por lo tanto, se ha descartado la combinación de reactor de 200 cm y los volúmenes de inyección 20, 30 ó 40 μl por la ineficiencia o la elevada variabilidad en la inyección. Por la misma razón se ha descartado también, el uso de 20 μl de etanol, es un volumen muy pequeño para recorrer todo el circuito quedando la mayor parte retenida en las paredes del reactor independientemente de la longitud de este.

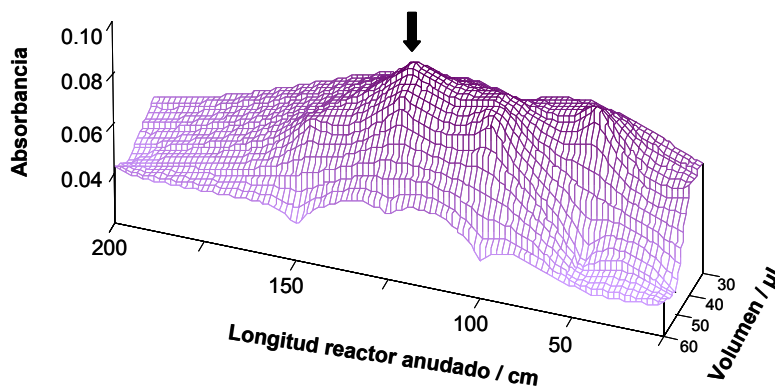


Figura 25. Relación entre longitud del reactor anudado y volumen de elución para la determinación de As(III) en agua de mar mediante FI-ETAAS.

Como se puede ver en la figura 25, los mejores resultados se han obtenido con el reactor anudado de 125 cm y 40 μl de volumen de elución.

Con el fin de mejorar la eficacia de la elución se ha variado la velocidad de bombeo durante la etapa de elución. En principio cuanto más lenta sea la elución mayor será el tiempo de contacto del etanol con el reactor anudado y como consecuencia, más efectiva sería la desorción del complejo As-APDC. A la velocidad de bombeo mínima permitida por el FIAS 400, 20 rpm, se han obtenido

los valores de absorbancia máximos, y a medida que se aumentan las revoluciones de la bomba peristáltica la absorbancia disminuye, lo cual confirma la hipótesis inicial.

Otra manera de aumentar el tiempo de contacto del eluyente en el interior del reactor anudado consiste en la reducción del caudal de la corriente de aire con el que se impulsa el etanol empleando tubos de menor diámetro interno. Sin embargo, a la vista de los resultados descartamos los tubos de diámetro inferior, 0,51 mm y 0,76 mm, porque presentan dificultades para impulsar el fragmento de etanol hasta el interior de la cámara de grafito.

En definitiva, se eluirá a la menor velocidad permitida, 20 rpm, e impulsando el aire con el tubo Tygon[®] de 1,14 mm. En estas condiciones, la etapa de elución tarda 40 s.

2.2.5 Características analíticas

Finalizado la optimización de las variables que afectan a la formación del complejo y a la eficacia de la preconcentración, se han estudiado las rectas de calibrado y adición; la sensibilidad, la precisión, la exactitud, el factor de preconcentración y la eficacia de adsorción del método propuesto. Además se ha realizado un estudio de interferencias.

2.2.5.1 Rectas de calibrado y adición estándar

En primer lugar, se han comparado los diferentes modos de calibración:

1. Calibrado con patrones acuosos
2. Calibrado con patrones preparados en agua de mar sintética
3. Adición estándar

- Adición estándar con una muestra dopada con $1 \mu\text{g l}^{-1}$ As(V). Esta última se ha realizado como comprobación de la selectividad del método.

Las concentraciones de As(III) utilizadas fueron 0; 0,05; 0,1; 0,15 y 0,20 $\mu\text{g l}^{-1}$ en todos los casos.

Ya a simple vista, las rectas parecen paralelas (Figura 26), lo cual se confirma al aplicar un test estadístico, *t-Student*, para la comparación de las pendientes. Los valores obtenidos para “*t*” indican que no existen diferencias significativas entre ellas, por lo tanto cualquiera de la rectas sería válida como modo de calibración. No obstante nos hemos decantado por la recta de calibrado con agua de mar sintética por una mayor similitud en la matriz respecto a la muestra.

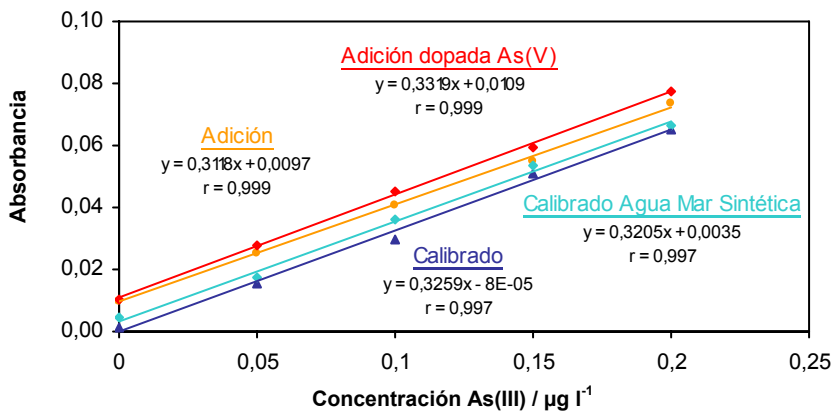


Figura 26. Rectas de calibrado y adición para la determinación selectiva de As(III) en agua de mar mediante FI-ETAAS.

La adición de $1 \mu\text{g l}^{-1}$ de As(V) a una muestra utilizada para la recta de adición estándar aparentemente no influye en los resultados (Figura 26), lo que significa que el método resulta eficaz para la separación de las especies inorgánicas de As. Mediante el cálculo de la recuperación analítica se confirma esta hipótesis. A excepción del nivel de concentración de $0,05 \mu\text{g l}^{-1}$ de As(III) para el cual el %

recuperación roza el mínimo aceptable, para los demás niveles la recuperación es muy próxima a 100% (Tabla 7).

Tabla 7. Comprobación de la selectividad en la determinación selectiva de As(III) en agua de mar mediante FI-ETAAS.

Concentración / $\mu\text{g l}^{-1}$	Absorbancia	Concentración calculada / $\mu\text{g l}^{-1}$	Recuperación / %
0	0,0104	----	----
0,05	0,0282	0,045	90,0
0,10	0,0453	0,098	98,0
0,15	0,0619	0,150	100,0
0,20	0,0776	0,199	99,5
		Media	96,9
		σ	4,7
Recta calibrado $y = 0,3205x + 0,0035$			

Con el fin de definir el rango de linealidad de la recta de calibrado, se ha ampliado el rango de concentración hasta $0,5 \mu\text{g l}^{-1}$ As(III), ya que por encima de esta concentración las señales de absorbancia estarían fuera del intervalo de trabajo recomendado por el fabricante del equipo de ETAAS.

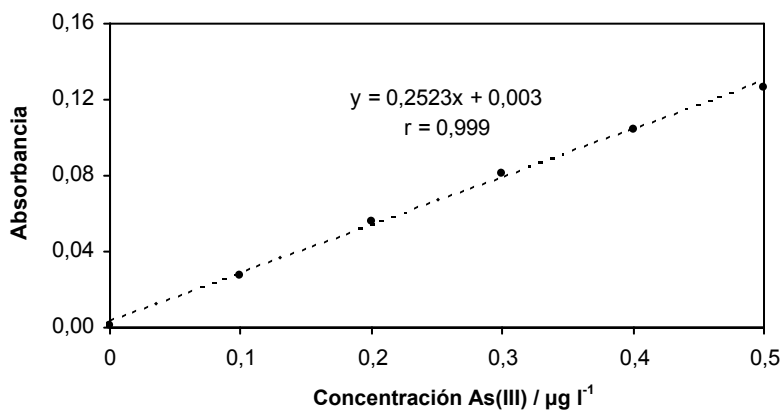


Figura 27. Rango de linealidad para la determinación de As(III) en agua de mar.

Los valores obtenidos se ajustan perfectamente a una recta con un coeficiente de regresión, r , muy bueno (Figura 27). Por lo tanto, el método mantiene un comportamiento lineal de 0 a 0,5 $\mu\text{g l}^{-1}$ de As(III).

2.2.5.2 Sensibilidad

La sensibilidad se expresa mediante: el límite de detección, LOD, el límite de cuantificación, LOQ y la masa característica. El cálculo de estos parámetros se ha realizado empleando las ecuaciones detalladas anteriormente.

Los valores obtenidos tras el análisis de 11 réplicas consecutivas del blanco son: 8 ng l^{-1} para el LOD y 23 ng l^{-1} para el LOQ. Como muestran estos valores, el método propuesto presenta mayor sensibilidad en comparación con otros métodos similares usando ICP-MS⁴⁵ o HG-AFS⁴⁶ para la detección cuyos límites de detección son 0,021 $\mu\text{g l}^{-1}$ y 0,023 $\mu\text{g l}^{-1}$ respectivamente.

Otra forma de expresar la sensibilidad es la masa característica. Para el cálculo de esta se ha analizado una muestra dopada con diferentes niveles de concentración de As(III) (Tabla 8), resultando una masa característica media de $0,5 \pm 0,0$ pg.

Tabla 8. Cálculo de la masa característica para la determinación de As(III) en agua de mar.

Concentración/ $\mu\text{g l}^{-1}$	Absorbancia	Masa característica/ pg
0	0,0104	
0,05	0,0280	0,5
0,10	0,0449	0,5
0,15	0,0596	0,5
0,20	0,0776	0,5
	Media	0,5
	σ	0,0

Finalizado el estudio de la sensibilidad se puede afirmar que el método desarrollado es muy sensible, mejorando sustancialmente la sensibilidad que se obtendría en el ETAAS sin el sistema de preconcentración.

2.2.5.3 Precisión

La precisión del método se ha estudiado únicamente mediante la repetibilidad, dada la inexistencia del tratamiento de la muestra no es necesario el estudio de la reproducibilidad.

La repetibilidad del método viene dada por el coeficiente de variación obtenido de 11 medidas consecutivas de la misma muestra dopada con $0,1 \mu\text{g l}^{-1}$ As(III). En este caso el coeficiente de variación, es 4,5% (Tabla 9).

Si se tiene en cuenta la complejidad del proceso: formación del complejo As-APDC, eficacia de la adsorción en las paredes del reactor anudado, etapa de lavado, elución con etanol e inyección en la cámara de grafito y todo esto, trabajando con un sistema de inyección en flujo donde interviene además, la regularidad en el bombeo de las bombas peristálticas, se comprende este coeficiente de variación ligeramente elevado. A pesar de ello, el método es reproducible ya que se admiten valores hasta el 10% para el coeficiente de variación.

Tabla 9. Repetibilidad para la determinación de As(III) en agua de mar mediante FI-ETAAS.

Absorbancia					
0,0293	0,0260	0,0295	0,0279	Media	0,0284
0,0289	0,0298	0,0288	0,0270	σ	0,001
0,0295	0,0289	0,0267		% CV	4,5

2.2.5.4 Exactitud

Todavía no se dispone de material de referencia certificado de agua de mar para As(III); únicamente existen materiales de referencia con valores certificados del contenido total de As inorgánico. Entonces se ha calculado la recuperación analítica como modo alternativo para evaluar la exactitud del método. Se han realizado una recta de calibrado y otra de adición estándar para calcular el porcentaje de recuperación, el cual expresa la relación entre la concentración calculada y la concentración añadida.

En la tabla 10 se resumen los valores obtenidos, dando una recuperación analítica media de $97,8 \pm 2,6\%$. Este valor está dentro del rango de $100 \pm 10\%$, considerado como aceptable.

Tabla 10. Cálculo de la recuperación analítica para la determinación selectiva de As(III) en agua de mar mediante FI-ETAAS.

Concentración / $\mu\text{g l}^{-1}$	Absorbancia	Concentración calculada / $\mu\text{g l}^{-1}$	Recuperación / %
0	0,0117	----	----
0,05	0,0301	0,047	94,0
0,10	0,0432	0,098	98,0
0,15	0,0569	0,150	100,0
0,20	0,0695	0,198	99,0
		Media	97,8
		σ	2,6
Recta calibrado $y = 0,2606x + 0,0061$			

2.2.5.5 Factor de preconcentración y eficacia de adsorción

Se ha tomado como referencia la definición de factor de enriquecimiento y los modos de calcularlo propuestos por Fang en su libro *“Flow Injection Separation*

and Preconcentration”²¹. En primer lugar se ha calculado el factor de preconcentración comparando las concentraciones con las que se obtiene el mismo valor de absorbancia inyectando directamente en la cámara de grafito 40 µl de etanol dopado y de una disolución sometida a la etapa de preconcentración. Esta relación de concentraciones da un factor de preconcentración de 40.

Sin embargo, esta forma de cálculo puede ser en algunos casos imprecisa, por lo que Fang²¹ recomienda la comparación de las pendientes de las rectas de calibrado sin y con preconcentración. Se preparan varias disoluciones de etanol dopadas con diferentes concentraciones entre 0 y 20 µg l⁻¹ As(III) y las analizamos inyectándolas directamente en la cámara de grafito. A continuación, se preparan varias disoluciones de agua de mar sintética dopadas a diferentes niveles de concentración entre 0 y 0,4 µg l⁻¹ As(III) y se analizan empleando el método propuesto. Las ecuaciones de las rectas de calibración fueron:

Directo.....	$y = 0,0055 x + 0,0016$	$r = 0,999$
Con preconcentración.....	$y = 0,2400 x + 0,0031$	$r = 0,999$

La relación entre pendientes nos da el factor de preconcentración, que en este caso es 44.

La eficacia de la adsorción se ha calculado comparando el factor de preconcentración obtenido con el teórico. En el método propuesto se consumen 10 ml de muestra que posteriormente se eluye con 40 µl de etanol. Considerando la relación de volúmenes, el factor de enriquecimiento teórico debería ser 250. Y como el factor de enriquecimiento calculado es 44, se ha obtenido una eficacia de adsorción del 17,4%.

2.2.5.6 Interferencias

Para finalizar la caracterización del método se ha realizado un estudio de interferencias, considerando todos los elementos que se encuentren habitualmente en el agua de mar, capaces de competir con As(III) en la reacción de formación del complejo con APDC. Dada la complejidad de la matriz salina existen bastantes posibles competidores: Mo, Ni, Zn, Fe, V, Al, Se, Cu, Sn, Mn, Co, Sb, Ag, Cr, Hg, Cd, Pb, Ga y Bi.

Se han preparado una serie de disoluciones de agua de mar sintética dopada con $0,2 \mu\text{g l}^{-1}$ As(III) y con cada uno de los posibles competidores a diferentes niveles de concentración partiendo de la concentración habitual en agua de mar⁷⁹. Los resultados obtenidos se detallan en la tabla 11

Un ión es considerado como interferencia cuando provoca un cambio en la respuesta analítica de $\pm 10\%$ respecto a la ausencia de dicho ion, la cual corresponde al 100% de recuperación. Solamente, se ha encontrado una posible interferencia de Fe(II) para un nivel de concentración ($4 \mu\text{g l}^{-1}$) ligeramente superior al normal en agua de mar ($3,4 \mu\text{g l}^{-1}$). Los demás iones producen interferencia a niveles entre 15 y 100 veces superiores a la concentración normal en agua de mar. En concreto, los elementos y las condiciones en las que aparecen interferencias son: $100 \mu\text{g l}^{-1}$ de Ni(II) y Cu(II); y $10 \mu\text{g l}^{-1}$ Co(II), Sb(III) y Cr(VI). Estas concentraciones superan en un factor de 15, 26, 30, 50 y 111 para Ni, Co, Sb, Cr y Cu, respectivamente.

Además se ha incluido en el estudio el As(V), para comprobar la eficacia de la separación de As(III) mediante la formación del complejo y la retención en el interior del reactor anudado. Cuando se añaden $100 \mu\text{g l}^{-1}$ As(V) a la disolución de agua de mar sintética con $0,2 \mu\text{g l}^{-1}$ As(III) se produce una desviación positiva, +66%, en la concentración de As(III). Sin embargo, la concentración total en agua de mar no contaminada es del orden de $2 \mu\text{g l}^{-1}$ As, por lo que la interferencia aparece a una concentración 39 veces superior.

Tabla 11. Efecto de los iones potencialmente interferentes en la determinación selectiva de $0,2 \mu\text{g l}^{-1}$ As(III) mediante FI-ETAAS.

Ion	SW*/ $\mu\text{g l}^{-1}$	Conc./ $\mu\text{g l}^{-1}$	Recup./ %	Ion	SW*/ $\mu\text{g l}^{-1}$	Conc./ $\mu\text{g l}^{-1}$	Recup./ %
Mo(VI)	10	1	106,4	Mn(II)	0,40	0,4	96,1
		10	104,0			1	107,7
		100	107,2			10	110,1
Ni(II)	6,60	7	105,7	Co(II)	0,39	0,4	97,5
		10	103,5			1	102,9
		100	113,4			10	74,4
Zn(II)	5,00	5	103,9	Sb(III)	0,33	0,4	99,4
		10	99,6			1	97,3
		100	110,2			10	89,0
Fe(II)	3,40	4	111,1	Ag(I)	0,28	0,3	99,8
		10	113,0			1	102,4
		100	119,2			10	98,3
As(V)	2,6	3	98,1	Cr(VI)	0,20	0,2	99,4
		10	94,7			1	102,2
		100	165,9			10	113,9
V(V)	1,90	2	95,1	Hg(II)	0,15	0,2	96,7
		10	96,0			1	105,2
		100	110,0			10	105,4
Al(III)	1,00	1	98,9	Cd(II)	0,11	0,15	96,7
		10	101,7			1	99,9
		100	97,5			10	106,5
Se(IV)	0,90	1	94,2	Pb(II)	0,03	0,03	91,0
		10	103,0			0,1	91,5
		100	108,5			1	92,8
Cu(II)	0,90	1	100,6	Ga(III)	0,03	0,03	101,6
		10	91,0			0,1	101,7
		100	68,6			1	101,3
Sn(II)	0,80	0,8	101,7	Bi(III)	0,02	0,02	96,6
		5	107,3			0,1	105,4
		10	107,2			1	107,3

*SW Concentración total del elemento habitual en agua de mar tomados de Turekian⁷⁹

2.2.6 Método propuesto

Esta parte de la tesis ha sido publicada en la revista *JAAS*⁸⁰. El artículo se puede consultar en el anexo.

En la siguiente tabla 12 se detalla el programa del sistema FI empleado para la determinación selectiva de As(III) en agua de mar mediante un sistema FI-ETAAS usando reactores anudados y la formación del quelato con APDC para la preconcentración.

El tiempo que tarda el tratamiento de la muestra mediante el sistema de inyección en flujo es de 3 min y 18 segundos. Al finalizar la etapa de elución se pone en funcionamiento el programa de la cámara de grafito para la detección del analito.

El programa de temperatura de la cámara de grafito optimizado para la determinación de As(III) eluido con 40 µl de etanol se resume en la tabla 5. Dado que el tiempo necesario para la detección, 1 min y 55 s, es menor que la suma de las etapas 3, 4 y 5 del programa del FIAS-400, el tiempo total de análisis por réplica equivale a la duración del pretratamiento de la muestra, 3 min y 18 s.

Tabla 12. Programa del FIAS-400 para la determinación selectiva de As(III) mediante un sistema FI-ETAAS en agua de mar.

Etapa	Tiempo / s	Bomba 1 / rpm	Bomba 2 / rpm	Válvula Inyección		Válvula selección
				Carga	Inyección	
1. Carga Etanol	3	0	35	<input checked="" type="checkbox"/>		1
2. Elución	45	0	20		<input checked="" type="checkbox"/>	1
3. Preconcentración	120	60	0		<input checked="" type="checkbox"/>	2
4. Lavado	10	60	0		<input checked="" type="checkbox"/>	3
5. Vaciado con aire	20	0	60		<input checked="" type="checkbox"/>	1

Las concentraciones optimizadas de cada uno de los reactivos utilizados, así como el consumo de cada uno de ellos se resumen en la tabla 13.

Tabla 13. Concentraciones optimizadas, caudales y consumo de los reactivos usados en la determinación selectiva de As(III) mediante un sistema FI-ETAAS en agua de mar.

Reactivo	Concentración	Caudal / ml min ⁻¹	Consumo / ml
Muestra	-----	5	10
HCl	0,01 M	5	10
APDC	0,05 % (m/v)	1,5	3
Disol. Lavado	APDC 0,01% (m/v) HNO ₃ 0,02% (v/v)	3	0,5
Aire	-----	1 Elución 3 Vaciado	-----
Etanol	Absoluto	----	40 µl

2.3 APLICACIÓN

Este método propuesto para la determinación selectiva de As(III) en agua de mar mediante FI-ETAAS, se ha utilizado para realizar un estudio de la distribución de As en la Ría da Arousa. Posteriormente se dedica un capítulo a la especiación de As y Cr en esta ría, donde se expondrán los resultados obtenidos.

3 Determinación de As total en muestras de agua de mar mediante FI-ETAAS

3.1 INTRODUCCIÓN

El siguiente objetivo consiste en adaptar el método de preconcentración desarrollado anteriormente usando reactores anudados para la determinación de As total.

La retención del As en las paredes del reactor anudado sucede si el metal se encuentra como quelato y no en forma iónica, como se ha demostrado en el capítulo anterior. Dado que el agente complejante seleccionado, APDC; reacciona selectivamente con la especie trivalente, la determinación de As total requiere una etapa de prerreducción para transformar todo el As(V) a As(III).

3.1.1 Pre-reducción

Dado que se pretende realizar el pretratamiento de la muestra “on-line” debemos encontrar el reductor idóneo, con el cual se obtenga la transformación de As(V) a As(III) lo más rápido posible, casi inmediatamente. Para ello, se ha realizado una revisión bibliográfica centrada en los trabajos que utilizan un sistema de inyección en flujo.

Sperling et al.⁷² proponen la mezcla reductora KI/Na₂S₂O₂/Na₂SO₃/HCl para la especiación de As en muestras de agua usando un sistema de inyección en flujo acoplado a un equipo ETAAS. El método se basa en la preconcentración y separación mediante la extracción en fase sólida empleando una columna C₁₈ de fase reversa y el dietilditiocarbamato sódico (NaDDTC) como agente quelatante. A pesar de su eficacia y rapidez, esta disolución reductora presenta problemas por la inestabilidad de los tiosulfatos en medio ácido. La descomposición de los

tiosulfatos podría derivar en la formación de precipitados; y como consecuencia riesgo de obstrucción de los conductos.

La tiourea se ha empleado con éxito para la determinación conjunta de As, Sb y Se en muestras de agua mediante HG-ICP-MS^{81, 82}. El selenio presenta un comportamiento diferente a las otras dos especies, en presencia de yoduro o L-cisteína, el Se(IV) se transforma en Se elemental, el cual no forma hidruro. Sin embargo, con la tiourea esta reacción es mucho más lenta permitiendo la determinación multielemental de As, Sb y Se.

El yoduro se ha utilizado como NaI⁸³ ó KI⁸⁴⁻⁸⁷, ambos estabilizados con ácido ascórbico. Sin embargo, la reducción con KI requiere un calentamiento a temperatura elevada o condiciones relativamente ácidas tanto para la muestra como para la disolución reductora para garantizar una reducción eficaz del As(V)⁸⁴. En estas condiciones se podría generar niveles considerables de I⁻, lo cual es especialmente desfavorable cuando se emplea la generación de hidruros o la AAS para la determinación del As⁸⁸.

En varios trabajos se ha comparado la eficacia del KI/ácido ascórbico y de la L-cisteína^{85, 89, 90} para la reducción de As(V) en técnicas con generación de hidruros acoplados a equipos de espectroscopía de absorción atómica (HG-AAS). Todos ellos coinciden en la elección de la L-cisteína como mejor reductor fundamentalmente porque la reducción con KI es más lenta. Además la L-cisteína presenta otras ventajas como la reducción en condiciones menos ácidas; reduce las posibles interferencias de los metales de transición en la generación del hidruro y mayor sensibilidad⁹¹⁻⁹³. Esta última se debe a una cinética muy favorable y menor dilución en la fase gaseosa porque se forma menor cantidad de H₂ gas.

Se ha demostrado ampliamente la eficacia de la L-cisteína en métodos que se basan en la generación de hidruros para la especiación del As, tanto de las

especies inorgánicas^{94, 95}, As(III) y As(V), como orgánicas^{92, 96, 97}, ácido monometilarsoniato, MMA, ácido dimetilarsinato, DMA y arsenobetaína, AsB. Además de pre-reductor, la L-cisteína actúa como tampón ácido-base, agente complejante del NaBH₄, incrementando su eficacia, y enmascarando las posibles interferencias.

Restringiendo la búsqueda a los trabajos que hallan empleado la formación de un complejo para la especiación de As se ha encontrado varias propuestas que se resumen a continuación.

En 1981, Subramanian et al.⁹⁸ describe un método para la especiación de As, Sb y Se, basado la extracción con MIBK de los complejos formados con APDC y posterior determinación en ETAAS. La determinación de la concentración total se realiza tras la reducción de las muestras con la mezcla Na₂S₂O₃/HCl. El principal inconveniente de este método es que se trabaja en modo discontinuo.

La primera referencia encontrada que realiza la especiación de As “on-line” usando la extracción en fase sólida mediante la formación de un quelato es el trabajo publicado por Sperling et al.⁷², mencionado anteriormente. El agente complejante utilizado es el NaDDTC y como reductor la mezcla KI/Na₂S₂O₂/Na₂SO₃/HCl.

De entre todos los artículos revisados, se han encontrado un par de ellos en los que emplean reactores anudados y el APDC para la separación y preconcentración del As(III); pero usan detectores diferentes ICPMS⁴⁵ y HG-AFS⁹⁴. En ambos casos utilizan la L-cisteína como prerreductor para la determinación de As total, aunque la reducción de la muestra se realiza en modo discontinuo. En nuestro caso el objetivo consiste en evitar el pretratamiento de la muestra por lo que se busca el modo de realizar la reducción “on-line” con la ayuda de un microondas focalizado. Esta es la principal aportación del método desarrollado en este proyecto, junto a la aplicación a muestras de agua de mar.

3.1.2 Microondas focalizado

La digestión de la muestra es uno de los pretratamientos habituales para la determinación mediante AAS. Uno de los métodos fácilmente adaptable a un sistema FI consiste en la exposición de la muestra a una fuente de calor. La incorporación de un microondas en los sistemas FI permite la digestión “on-line” de la muestra resultando más eficaz que la digestión en modo discontinuo. Las ventajas que presenta frente este último son²⁷:

- Posible automatización del tratamiento de la muestra.
- Reducción del tiempo de digestión.
- Evita problemas asociados a la manipulación como contaminación; peligrosidad de los reactivos empleados o la reproducibilidad.
- Menor volumen de muestra y reactivos consumido
- Aplicable a diferentes tipos de muestra.

Por contra, puede producir algunos problemas vinculados a las características de los sistemas FI como: la destrucción incompleta de la muestra debido a un tiempo de exposición demasiado corto; la formación de gases y, como consecuencia, las posibles sobrepresiones al trabajar en un sistema cerrado.

Burguera et al.^{18, 27} han realizado varias revisiones bibliográficas sobre el tratamiento de la muestra en sistemas FI-ETAAS, en las cuales se puede encontrar un resumen los trabajos publicados donde se emplea la digestión en microondas “on-line”. Esta técnica ha sido aplicada a muestras muy diversas: agua, marisco, sedimento marino, orina, sangre, suero, tejido adiposo y jabones. De entre todas las aplicaciones cabe destacar la determinación de Co en sangre realizado “in vivo”, es decir, la muestra es bombeada directamente del brazo del paciente. Además de las ventajas de los sistemas FI-ETAAS, se evita la posible alteración o contaminación de la muestra entre la toma y el análisis por contacto con el entorno⁹⁹.

El acoplamiento de un horno microondas a un sistema FI, no solamente puede ser empleado para la digestión de la muestra sino también para ayudar en algunos procesos analíticos. Un ejemplo de otras aplicaciones es la aceleración de reacciones de oxidación o reducción que se expondrá en este trabajo.

Se ha utilizado un microondas focalizado Prolabo MX 350 (Figura 28), en cuyo interior se coloca un reactor de 10 m, formado por un capilar de PTFE anudado, a través del cual fluye la muestra. Además cuenta con un refrigerador formado por una camisa cilíndrica por donde circula una corriente de agua fría y en su interior un capilar de PTFE enrollado unido a la salida del microondas. El enfriamiento de la muestra resulta fundamental para evitar problemas en las reacciones posteriores a las que se someterá la muestra, así como para evitar los problemas de sobrepresión mencionados anteriormente.

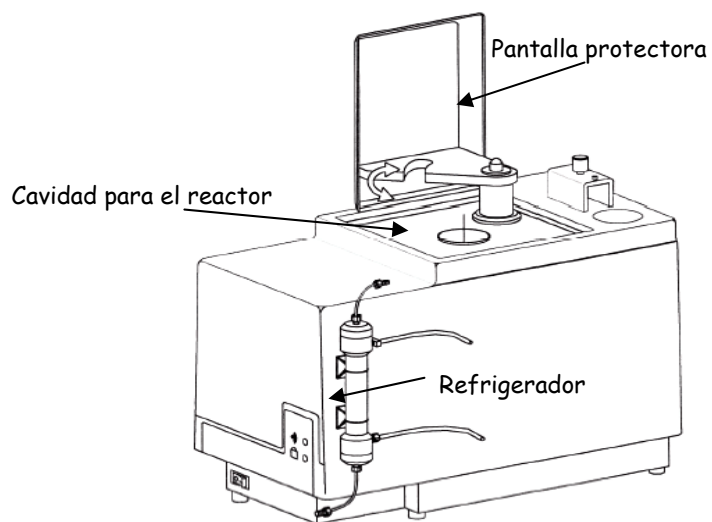


Figura 28. Microondas focalizado Prolabo MX 350

3.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.2.1 Equipamiento

3.2.1.1 Aparatos

Las medidas se han realizado usando un espectrómetro Perkin-Elmer Model 4100ZL equipado con una cámara de grafito de calentamiento transversal (THGA) y el automuestreador AS 71. Se han utilizado tubos de grafito pirolítico con plataforma L'vov. Este equipo además dispone de un corrector de fondo Zeeman. Se ha usado una lámpara de descarga de As la cual proporciona una longitud de onda de 193,7 nm con un ancho de banda espectral de 0,7 nm conectada a una fuente de alimentación trabajando a 380 mA. Para la evaluación de los resultados se ha empleado la absorbancia integrada durante 5 segundos.

El espectrómetro se ha acoplado al sistema de inyección en flujo PerkinElmer FIAS-400 equipado con 2 bombas peristálticas controladas individualmente y una válvula de inyección estándar de 5 vías. Ambos equipos se controlan desde un único ordenador con el software AAWinLab 4.01, funcionando en modo “*FIAS-Furnace*”. Además se ha empleado dos válvulas Rheodyne, una de selección con 6 entradas y 1 salida y otra de conmutación de 6 posiciones. Para impulsar la muestra, los reactivos, el eluyente y el aire se han usado tubos Tygon® (Perkin-Elmer). El bucle de carga se ha construido con un capilar de PTFE de 0,5 mm de diámetro interno variando la longitud (10, 15, 20, 25, o 30 cm) para obtener diferentes volúmenes de eluyente 20, 30, 40, 50, 60 µl etanol. Todas las conexiones están construidas con capilar de PTFE de 0,35 mm de diámetro interno. Varios reactores anudados de diferentes longitudes se han hecho con un capilar de PTFE de 0,5 mm de diámetro interno.

La reducción se acelera con la ayuda de un microondas focalizado Prolabo MX-350, acoplado al sistema FIAS-400.

3.2.1.2 Reactivos

- Disolución patrón de As(III) de 1000 mg l⁻¹ As SpectroSol (BDH, Reino Unido)
- Disolución patrón de As(V) de 1000 mg l⁻¹ As. Preparada disolviendo Na₂HSO₄ para análisis (Merck, Alemania) y conservada a 4°C.
- Amonio pirrolindinditiocarbamato (APDC) (Sigma, Alemania). A partir de esta sal se prepara un disolución stock del 1% (m/v) APDC y se conserva a 4°C.
- HCl 35% Hiperpur (Panreac, España).
- HNO₃ 69% Hiperpur (Panreac, España).
- Etanol absoluto para análisis (Panreac, España)
- NaCl para análisis, (Merck, Alemania),
- MgSO₄·7H₂O, PA-ACS (Panreac, España)
- NaHCO₃ para análisis (Merck, España)
- Tiourea para análisis (Merck, España)
- L-cisteína (Fluka, España)
- Agua ultrapura. Resistividad 18 MΩ cm usando el sistema Milli-Q® (Millipore).
- IrCl₃ (Sigma, Alemania). Se prepara una disolución de 1g l⁻¹ para el recubrimiento del tubo de grafito.
- Argón N50 pureza: 99,999%, empleado como gas de purga y refrigeración en el atomizador.

3.2.1.3 Limpieza del material

Todo el material necesario, antes de ser utilizado, fue lavado cuidadosamente con agua y jabón, se enjuagan con agua Milli-Q® y se mantienen durante 48 horas en una disolución de HNO₃ al 10%. Posteriormente se vuelve a enjuagar con agua Milli-Q® y se almacena seco y listo para su uso en un lugar libre de polvo.

3.2.2 Modificación del esquema FI

Esta etapa se realizará también en modo continuo acoplando al sistema FI-ETAAS un microondas focalizado para acelerar la reacción (Figura 29). La mezcla de la muestra y el reductor se calienta mientras circula a través de un reactor colocado en el interior del microondas. En esta primera parte del montaje tiene lugar la reducción del As(V). A la salida del microondas la muestra reducida se enfría en el refrigerador, antes de acidificarla, añadir el APDC y seguir los mismos pasos que el método propuesto anteriormente para la determinación selectiva de As(III).

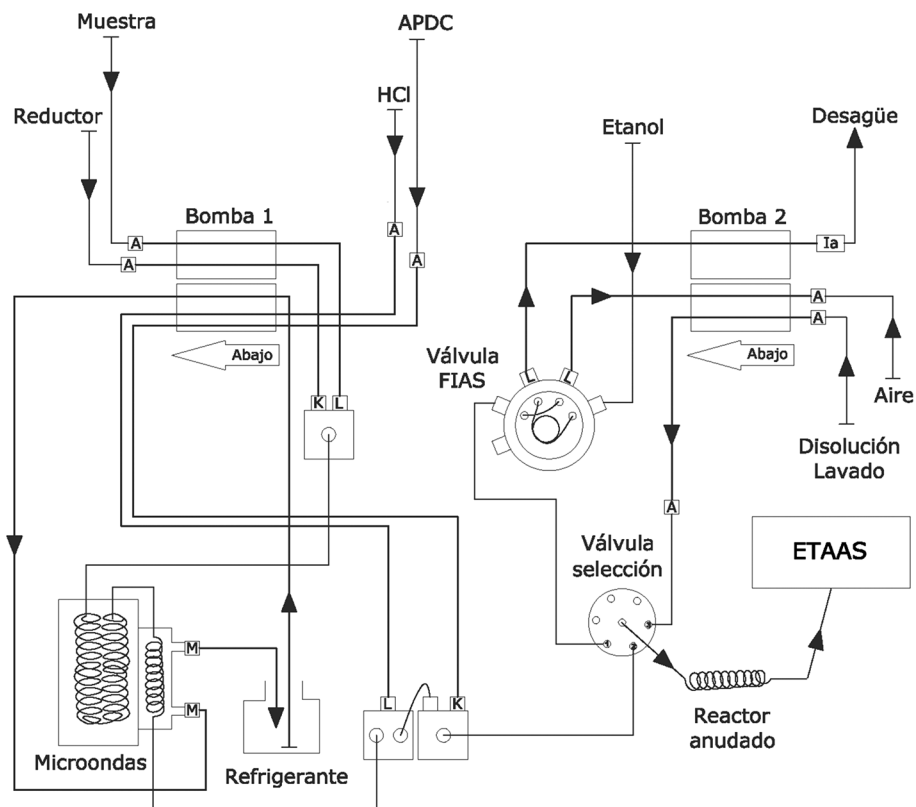


Figura 29. Esquema de montaje del sistema FI-ETAAS para la determinación de As total en agua de mar.

3.2.3 Elección del reductor. Ensayos preliminares

3.2.3.1 Tiourea

En primer lugar se realizaron unos ensayos sin modificar el montaje FI-ETAAS con una disolución de agua de mar sintética dopada con $0,2 \mu\text{g l}^{-1}$ As(V) a la cual se le añade un pequeño volumen determinado de unas disoluciones concentradas de tiourea y HCl, de modo que la concentración final en la muestra sea tiourea 0,5 M y HCl 0,12 M. Se ha tomado como referencia el trabajo propuesto por Bowman⁸² para fijar las concentraciones de partida de tiourea y HCl. Para estudiar la evolución de la reducción a lo largo del tiempo se ha analizado varias veces a lo largo de 3 horas esta disolución colocada a la entrada de la línea de muestra. Se repite el mismo ensayo con un blanco, es decir, una disolución similar a la anterior sin dopar con As(V).

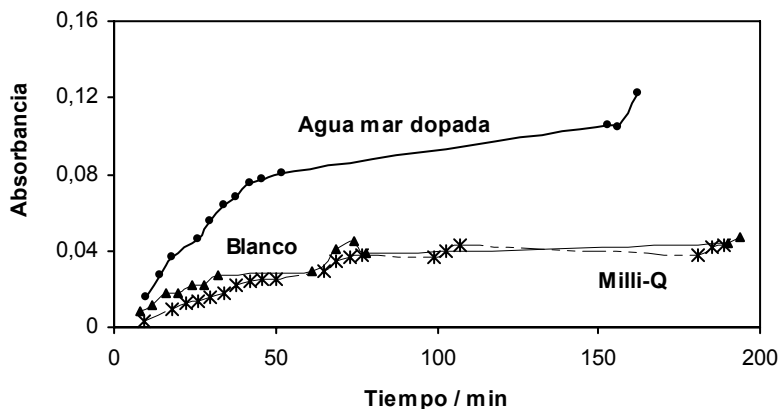


Figura 30. Ensayos preliminares de tiourea como reductor para la determinación de As total mediante FI-ETAAS.

Los resultados muestran un incremento de la señal de absorbancia a medida que transcurre el tiempo desde el momento de la preparación de las disoluciones (Figura 30). En principio podríamos suponer que este incremento está ligado a la reducción progresiva del As(V) añadido. Sin embargo, resulta extraño que la señal del blanco también aumente con el tiempo. ¿Podría ser que el agua de mar

sintética contenga trazas de As(V)?). Para resolver esta duda se ha repetido el mismo ensayo con agua Milli-Q®. Tal como se puede comprobar en la figura 30, el agua Milli-Q® presenta la misma tendencia que el blanco. Podemos descartar entonces, la existencia de trazas de As en el agua de mar sintética, pero seguimos sin poder justificar los resultados obtenidos.

Nos planteamos la posibilidad de una posible contaminación del circuito FI-ETAAS provocada por la tiourea, por lo se ha decidido aumentar el tiempo de la etapa de lavado. Se ha preparado una nueva disolución de agua de mar sintética dopada con menor concentración de As(V), $0,1 \mu\text{g l}^{-1}$ y la misma concentración de reductor, tiourea 0,5 M y HCl 0,12 M. Con el fin de minimizar el efecto de la diferencia de tiempo entre las medidas consecutivas, se ha comenzado a analizar la muestra 2 horas después de su preparación. A pesar de ello se observa un incremento paulatino en la absorbancia desde la primera hasta la última inyección transcurriendo 45 min (Figura 31). El incremento de la duración de la etapa de lavado no supone aparentemente una mejora, aunque quizás esté enmascarada por el aumento de la señal con el tiempo. De todos modos se ha decidido volver a trabajar con 10 s de lavado.

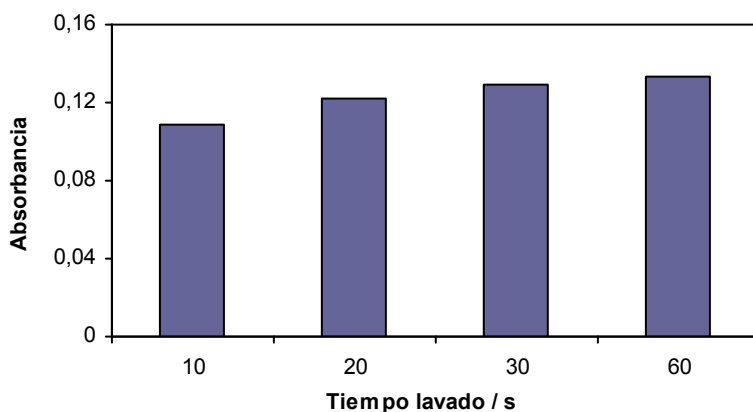


Figura 31. Estudio de la etapa de lavado en los ensayos preliminares con tiourea para la determinación de As total mediante FI-ETAAS.

Aunque todavía no se ha podido justificar el incremento de la señal con el tiempo, se realizan las modificaciones necesarias en el montaje FI-ETAAS (Figura 29) para comprobar si la reducción de As(V) se produce trabajando en continuo. La mezcla reductora, tiourea/HCl será impulsada por la línea que anteriormente ocupaba el HCl de tal modo que la muestra y el reductor confluyen en una intersección en forma de “T”. La mezcla se introducirá en el interior del microondas focalizado, donde está colocado un reactor de mezcla de 10 m de longitud, el cual recorrerán la mezcla de muestra/reductor. Aquí, tendrá lugar la reacción de reducción del As(V) acelerada por el aumento de temperatura. A la salida del microondas la muestra se enfriará pasando por el interior de un refrigerador y a partir de este punto el sistema FI se mantiene como el utilizado en el método propuesto anteriormente para la determinación selectiva de As(III).

La duración de la etapa de preconcentración establecida en el método anterior es de 2 min. Ahora con la modificación del sistema FI-ETAAS para la determinación de As total se debe tener en cuenta:

- ✓ realmente durante este tiempo se produce la reducción del As(V) y la preconcentración del As total presente en la muestra, aunque nos sigamos refiriendo a esta como etapa de preconcentración, y
- ✓ el tiempo que tarda la muestra en recorrer la ampliación del circuito. Con una velocidad de bombeo de 60 rpm la muestra necesita 1 min para llegar hasta la intersección con el APDC, pasando por el interior del microondas focalizado y el refrigerador.

Antes comenzar a realizar los experimentos en modo continuo, se ha chequeado la señal debida a cada uno de los reactivos manteniendo el microondas apagado. Primero sólo con agua Milli-Q® para asegurarnos de la limpieza de todo el circuito. Una vez que la señal producida por el agua Milli-Q®, es mínima, incluimos el APDC, la disolución de lavado, agua de mar sintética. A continuación, se ha comprobado la sensibilidad con un patrón de $0,2 \mu\text{g l}^{-1}$ As(III), obteniendo un valor

similar a la absorbancia correspondiente al mismo patrón antes de la modificación del sistema FI. Una vez que se ha confirmado el perfecto funcionamiento del sistema, se introduce la tiourea, obteniendo una señal muy próxima a cero.

Entonces se enciende el microondas a un 30% de potencia únicamente durante los primeros 95 s porque manteniendo encendido el microondas los 120 s que dura la etapa de preconcentración, se forman muchas burbujas, lo cual implica problemas de reproducibilidad.

Se han preparado varias disoluciones reductoras variando la concentración de tiourea entre 0,1 y 0,5 M y manteniendo la concentración de HCl 0,12 M. Los valores de absorbancia correspondientes a los blancos son elevados; similares a los valores obtenidos al sustituir el agua Milli-Q[®] de la línea de muestra por un patrón de $0,2 \mu\text{g l}^{-1} \text{As(V)}$.

Llegados a este punto se ha decidido descartar la tiourea como reductor dado a un comportamiento impredecible.

3.2.3.2 L-cisteína

Uno de los reductores más empleado en la bibliografía consultada es la L-cisteína. Tomando como referencia el trabajo publicado por Yan et al.⁹⁴, se ha preparado una disolución de L-cisteína del 1% (m/v) disolviendo 1 g de reactivo en 10 ml de HCl 1 M y completando hasta 100 ml con agua Milli-Q[®]. La adición de HCl es imprescindible para la disolución de L-cisteína; y preferiblemente debe añadirse en el orden indicado, primero disolver con el ácido y luego diluir con el agua Milli-Q[®].

Se ha realizado un primer ensayo con esta disolución reductora comparando la señal del blanco con la señal de un patrón de $0,2 \mu\text{g l}^{-1} \text{As(V)}$ preparado en agua de mar sintética. Los valores obtenidos muestran indicios de que la reducción tiene lugar, por lo que comenzaremos con la optimización.

3.2.4 Optimización de la etapa de reducción

Únicamente se han optimizado los parámetros relacionados con la etapa de reducción, la cantidad de L-cisteína y la potencia del microondas focalizado. Se mantienen las demás condiciones de trabajo del método propuesto anteriormente para la determinación de As(III) en agua de mar.

3.2.4.1 Concentración de L-cisteína

Para el estudio de la concentración de L-cisteína se ha empleado una disolución patrón de $0,2 \mu\text{g l}^{-1}$ As(V) preparada en agua de mar sintética y se activa el microondas al 30% de la potencia. Se han preparado varias disoluciones variando la concentración de L-cisteína entre 0 y 1% (m/v), para lo cual se pesan diferentes cantidades de L-cisteína que se disuelven en 5 ml de HCl 1 M y luego se diluyen hasta alcanzar 50 ml.

Los resultados muestran un aumento progresivo de la señal hasta el 0,25%; manteniéndose prácticamente constante entre 0,25% y 0,5% y una disminución para concentraciones mayores al 0,5% (Figura 32). Los valores obtenidos para concentraciones por debajo del 0,1% indican que la cantidad de L-cisteína añadida no es suficiente para que se produzca la reducción de los $0,2 \mu\text{g l}^{-1}$ As(V).

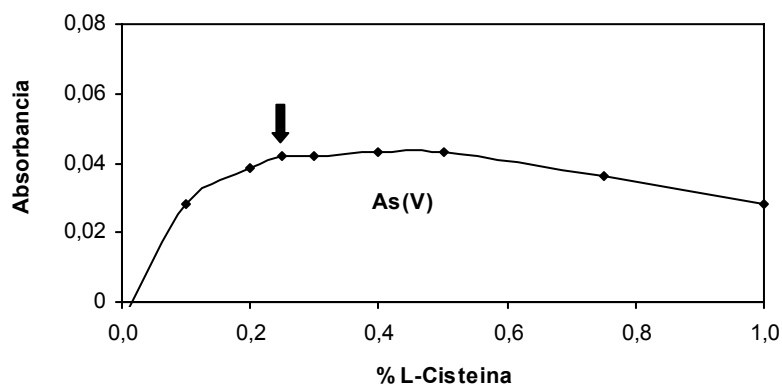


Figura 32. Optimización de la concentración de L-cisteína para la determinación de As total en agua de mar mediante FI-ETAAS.

Dentro del rango óptimo de concentración de L-cisteína, 0,25%-0,5%, se ha seleccionado la disolución de menor concentración como disolución reductora, 0,25% (m/v) L-cisteína/ 0,1 M HCl. Esta elección se ha realizado en base a minimizar el consumo de reactivo.

3.2.4.2 Efecto de la potencia del microondas focalizado

El software utilizado permite controlar el tiempo de calentamiento y la potencia del microondas entre 20-40% en incrementos de 5%. La potencia máxima del microondas Prolabo MX-350 es de 300 W; por lo tanto las posibles potencias varían entre el 60 y 120 W.

El estudio de la influencia de la potencia del microondas sobre la eficacia de la reducción se ha realizado empleando una disolución patrón de $0,2 \mu\text{g l}^{-1}$ As(V) preparada con agua de mar sintética. No solo se ha variado la potencia del microondas si no también el tiempo de funcionamiento.

Con el fin de estabilizar la temperatura en el interior de microondas se precalienta durante 10 min haciendo circular agua Milli-Q[®] a cada potencia antes de analizar la muestra. Para tener una idea aproximada de la temperatura que alcanza la muestra al ser sometida a la energía de microondas, se ha medido la temperatura a la salida del microondas recogiendo la muestra durante 1 min para cada uno de los casos. Las temperaturas oscilan entre 45 y 60°C.

En la figura 33 se muestran los resultados obtenidos, donde se puede comprobar como la reducción se favorece calentando la muestra durante 2 min. Pero no existe mucha diferencia trabajando al 20% ó al 25% de la potencia, sin embargo se observa una ligera disminución al 30%.

En sesiones posteriores se ha comparado el calentamiento durante 2 min a 20% y 25% de potencia para asegurarnos que la elección de la potencia es la correcta.

Los resultados muestran que la eficacia de la reducción es ligeramente mayor cuando se trabaja al 25% de potencia del microondas. Por lo tanto, se ha seleccionado esta como potencia de calentamiento para la reducción de As(V) en muestras de agua de mar en un microondas focalizado usando como reductor la disolución 0,25% (m/v) L-cisteína /0,1 M HCl.

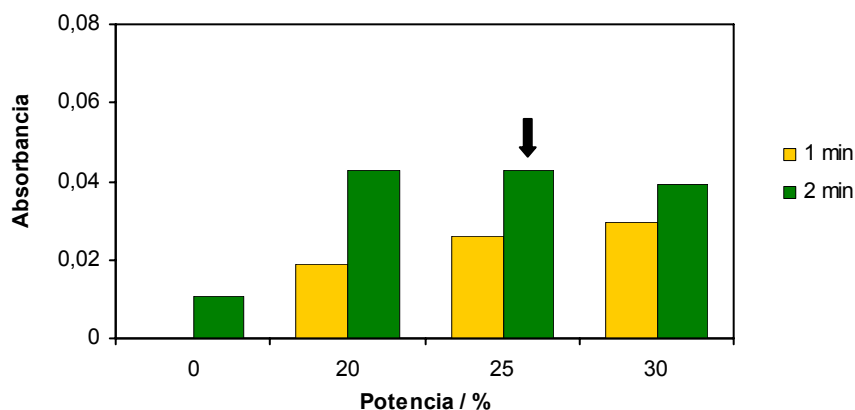


Figura 33. Influencia de la potencia del microondas y tiempo de calentamiento sobre la reducción de As con L-cisteína en agua de mar sintética.

Se ha observado un fenómeno que no aparece cuando se están analizando disoluciones acuosas. A partir del 25 % de la potencia se forman burbujas después del primer minuto de calentamiento. Las burbujas provocan variabilidad en los resultados puesto que influye sobre la velocidad del fluido y por lo tanto, la cantidad del analito que pasa a través del reactor anudado. Además provocan un retroceso durante los primeros segundos de bombeo de la siguiente réplica. Para resolver este inconveniente se apaga el microondas al finalizar la etapa de preconcentración y se continúa con la bomba peristáltica en movimiento durante 10 s más, logrando así, que no queden burbujas en el reactor de mezcla situado en el interior del microondas focalizado.

Para intentar averiguar el origen de las burbujas se han realizado varios ensayos analizando por separado:

- una disolución de $32 \text{ g l}^{-1} \text{ NaCl}$;
- otra disolución de $14 \text{ g l}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y
- otra disolución $0,15 \text{ g l}^{-1} \text{ NaHCO}_3$

es decir, cada uno de las sales empleadas en la preparación del agua de mar sintética manteniendo su concentración.

Se han realizado varias réplicas consecutivas de cada una de estas disoluciones calentando durante 2 min al 25% de potencia. Se observa la aparición de burbujas cuando se analiza la disolución de NaCl. Sin embargo, al sustituir la L-cisteína por agua Milli-Q[®] no se forman las burbujas. Esto significa que la reacción entre el reductor y la sal mayoritaria de las muestras, NaCl, es la causante de la formación de las burbujas.

3.2.5 Características analíticas

Una vez finalizada la optimización de la reducción de As(V) para la determinación del As total, se han estudiado las rectas de calibración, la sensibilidad, la precisión y la exactitud de método propuesto. Además se ha calculado el factor de preconcentración y la eficacia de la adsorción.

3.2.5.1 Recta de calibrado y adición estándar

Los diferentes modos de calibración han sido comparados varias veces en diferentes sesiones de trabajo con el fin de seleccionar el más adecuado siguiendo siempre la misma secuencia:

1. Recta de calibrado acuoso
2. Recta de calibrado de As(V) con agua de mar sintética.

3. Recta de adición estándar para la cual se preparan varios patrones de As(V) a los cuales se le añade un volumen fijo de una muestra de agua de mar.

Los niveles de concentración de los patrones fueron en todos los casos: 0; 0,1; 0,2; 0,3 y 0,4 $\mu\text{g l}^{-1}$ As(V).

En la figura 34 se representan los valores de una de las sesiones de trabajo, representativos de los resultados obtenidos en todas ellas. Claramente se puede ver como la recta de calibrado acuosa difiere de las otras dos, por lo que se deduce la existencia de efecto matriz. Aunque aparentemente las rectas de calibrado con agua de mar sintética y la recta de adición estándar son paralelas, aplicando un test estadístico, *t-Student*, para la comparación de pendientes, se comprueban que no lo son. Los valores de *t-Student* calculados comparando 2 a 2 las rectas indican que existen diferencias significativas entre las 3 rectas de calibración. Esto implica que se debe emplear la adición estándar para cuantificar el contenido de As total en agua de mar mediante el método propuesto.

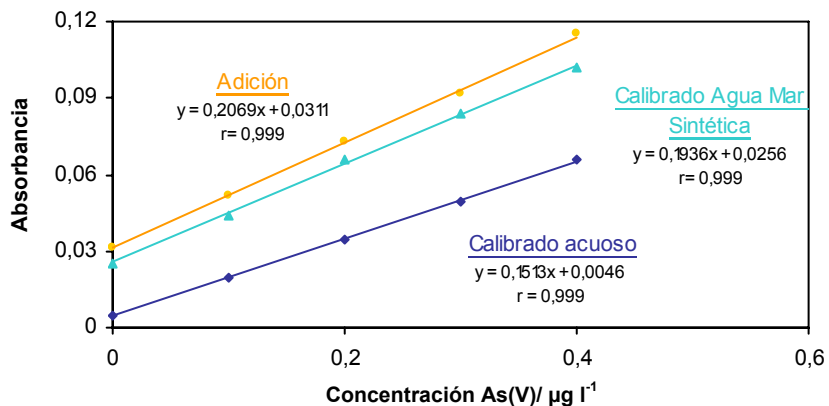


Figura 34. Rectas de calibración para la determinación de As total en agua de mar.

El valor de absorbancia correspondiente al nivel 0 de la recta de calibrado con agua de mar sintética es anormalmente elevado. Una vez descartada una posible

contaminación tanto en el circuito FI-ETAAS como en la preparación de esta disolución procedemos al análisis de cada uno de los componentes del agua de mar sintética por separado. Se ha comprobado que el $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ es el causante del valor del blanco tan alto. La composición de este reactivo especificada en la etiqueta indica que contiene un máximo de impureza del 0,00005% de As, lo que equivale a $7 \mu\text{g l}^{-1}$ en el agua de mar sintética para cuya preparación se emplean 14 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ por litro. Aún, en el caso de que el reactivo no alcance el máximo de impureza muy probablemente contenga una cantidad de As detectable con el método desarrollado dada la elevada sensibilidad de este.

3.2.5.2 Sensibilidad

Se han realizado 11 medidas consecutivas de un blanco y una recta de adicción para el cálculo de los límites de detección y cuantificación, obteniendo 16 ng l^{-1} y 53 ng l^{-1} para el LOD y LOQ, respectivamente. Aunque en comparación con los valores obtenidos para la determinación selectiva de As(III) empleando el mismo método, estos valores son ligeramente mayores; la sensibilidad para la determinación de As total es más que aceptable.

Tabla 14. Cálculo de la masa característica para la determinación de As total en agua de mar.

Concentración / $\mu\text{g l}^{-1}$	Absorbancia	Masa característica / pg
0	0,0430	----
2	0,0633	8,7
4	0,0838	8,6
6	0,1064	8,3
8	0,1263	8,4
	Media	8,5
	σ	0,2

Además se ha calculado la masa característica para varios niveles de concentración de As(V) como se resume en la tabla 14. La masa característica media del método es de $8,5 \pm 0,2$ pg.

3.2.5.3 Precisión

La precisión del método la expresamos únicamente mediante la repetibilidad dada por el coeficiente de variación de 11 réplicas consecutivas de una muestra. La reducción y la preconcentración del As se realizan de manera automatizada y por tanto la repetibilidad ya engloba la variabilidad asociada a estos procesos. Como la muestra no requiere pretratamiento entonces el estudio de la reproducibilidad resulta innecesario.

En la tabla 15 se resumen los valores de absorbancia obtenidos para una muestra de agua de mar dopada con $0,3 \mu\text{g l}^{-1}$ As(V).

Tabla 15. Repetibilidad para la determinación de As total en agua de mar mediante FI-ETAAS.

Absorbancia					
0,0682	0,0768	0,0751	0,0728	Media	0,0727
0,0724	0,0687	0,0737	0,0760	σ	0,003
0,0746	0,0729	0,0680		% CV	4,3

El coeficiente de variación es aceptable a pesar de tratarse de un sistema de inyección en flujo sobre el que influyen bastantes parámetros. Por lo tanto, el método propuesto para la determinación de As total en agua de mar mediante FI-ETAAS es preciso.

3.2.5.4 Exactitud

El estudio de la exactitud se ha realizado con ayuda de un material de referencia certificado de agua de mar, NASS-4, con un valor certificado de $1,26 \pm 0,09 \mu\text{g l}^{-1}$ para la concentración de As total.

Si el método propuesto es exacto al analizar el material de referencia deberíamos obtener una concentración que esté dentro del rango de concentración certificado. Para realizar esta comprobación, se tomaron 3 alícuotas de 5 ml de NASS-4 y se diluyeron hasta un volumen final de 50 ml. Esta dilución es necesaria porque el valor certificado de As supera la concentración del patrón más elevado empleado en la calibración. Además se prepararon varias disoluciones añadiendo el mismo volumen del material de referencia en cada una de ellas y la cantidad correspondiente en cada nivel de una disolución patrón de $100 \mu\text{g l}^{-1}$ As(V) para el cálculo de la recta de adición estándar.

La concentración media del material de referencia certificado, NASS-4, obtenida con este método entra dentro del rango de concentración certificada (Tabla 16); por tanto, el método desarrollado es exacto.

Tabla 16. Cálculo de la exactitud con NASS-4 para la determinación de As total en agua de mar.

Alicuota	Absorbancia	Concentración / $\mu\text{g l}^{-1}$
1	0,0391	1,31
2	0,0362	1,17
3	0,0397	1,34
	Media	1,27
	σ	0,09

Además se ha calculado la recuperación analítica, para lo cual se prepararon varias muestras dopadas a diferentes niveles de concentración de As(V). Y por

otra parte se prepararon las disoluciones necesarias para la obtención de la recta de adición estándar.

Tabla 17. Cálculo de la recuperación analítica para la determinación de As total en agua de mar mediante FI-ETAAS.

Concentración / $\mu\text{g l}^{-1}$	Absorbancia	Concentración calculada/ $\mu\text{g l}^{-1}$	Recuperación / %
0	0,0430	----	----
0,1	0,0633	0,098	98,0
0,2	0,0838	0,197	98,5
0,3	0,1064	0,306	102,0
0,4	0,1263	0,403	100,8
		Media	99,8
		σ	1,9
Recta de adición $y = 0,2096 x + 0,0427$			

El promedio del porcentaje de recuperación obtenido es 99,8% (Tabla 17). Esto ratifica los resultados del estudio de la exactitud realizado con el material de referencia certificado, por lo que se puede afirmar que el método propuesto es exacto.

3.2.5.5 Factor de preconcentración y eficacia de adsorción

El cálculo del factor de preconcentración se ha realizado mediante la comparación de las pendientes de las rectas de calibrado sin y con preconcentración. Para ello, se analizaron varias disoluciones de etanol dopadas a diferentes niveles de concentración entre 0 y 20 $\mu\text{g l}^{-1}$ As(V) inyectándolas directamente en la cámara de grafito. A continuación, se prepararon varias disoluciones patrón de diferentes niveles de concentración entre 0 y 2 $\mu\text{g l}^{-1}$ As(V) a las que se le añade un volumen

fijo de una muestra de agua de mar analizándolas con el método propuesto. Las ecuaciones de las rectas de calibración fueron:

Directo.....	$y = 0,0034 x + 0,0024$	$r = 0,999$
Con preconcentración.....	$y = 0,0613 x + 0,0302$	$r = 0,999$

El factor de preconcentración es 18, resultante del cociente de la pendiente con preconcentración y la pendiente del calibrado directo.

Otro parámetro que caracteriza un método de preconcentración basado en la retención en las paredes de un reactor anudado, es la eficacia de la adsorción, la cual se calcula comparando el factor de preconcentración obtenido con el teórico. La muestra se bombea durante 2 min a un caudal de 5 ml min^{-1} , lo que implica un consumo de 10 ml de muestra por réplica. El arsénico adherido en el interior del reactor anudado se eluye con 40 μl de etanol. Entonces, considerando la relación de volúmenes, el factor de preconcentración teórico debería ser 250. Sin embargo, el factor de preconcentración calculado es 18; por lo tanto, la eficacia de adsorción resultante es 7,2%.

A diferencia del método propuesto para la determinación de As(III) usando la misma técnica para la cual la eficacia de la adsorción es 44%, la eficacia de la adsorción es muy baja. Esto probablemente sea debido a que se está teniendo en cuenta la etapa de reducción previa a la preconcentración en el reactor anudado. Realmente este parámetro debería llamarse eficacia de la adsorción y de la prerreducción.

3.2.6 Método propuesto

El programa del equipo FIAS-400 empleado para la determinación selectiva de As total en agua de mar mediante un sistema FI-ETAAS usando reactores anudados se resume en la tabla 18.

Al igual que para el método de determinación de As(III) el tiempo total de análisis por réplica equivale a la duración del pretratamiento de la muestra, 3 min y 18 s, porque el programa de temperatura de la cámara de grafito termina antes de que finalice el programa del FIAS-400. El programa de temperaturas de la cámara de grafito (Tabla 3) es el mismo que para la determinación de As(III).

Tabla 18. Programa del FIAS-400 para la determinación selectiva de As(III) mediante un sistema FI-ETAAS en agua de mar.

Etapa	Tiempo / s	Bomba 1 / rpm	Bomba 2 / rpm	Válvula Inyección		Válvula selección
				Carga	Inyección	
1. Carga Etanol	3	0	35	<input checked="" type="checkbox"/>		1
2. Elución	45	0	20		<input checked="" type="checkbox"/>	1
3. Reducción y Preconcentración	120	60	0		<input checked="" type="checkbox"/>	2
4. Limpieza	10	0	60		<input checked="" type="checkbox"/>	3
5. Vaciado con aire	20	0	60		<input checked="" type="checkbox"/>	1

Dada la ampliación del montaje FI, con la inclusión del microondas focalizado se debe descartar la primera réplica porque durante el 1º minuto de la etapa 3 circulará por el reactor anudado parte de la muestra anterior que ha quedado en el interior del microondas.

Las concentraciones optimizadas de cada uno de los reactivos utilizados, así como el consumo de cada reactivo se resumen en la tabla 19. En la etapa de prerreducción se enciende el microondas focalizado durante 2 min al 25% de la potencia, aproximadamente 75 W.

Tabla 19. Concentraciones optimizadas, caudales y consumo de los reactivos usados en la determinación selectiva de As(III) mediante un sistema FI-ETAAS en agua de mar.

Reactivo	Concentración	Caudal / ml min ⁻¹	Consumo / ml
Muestra	----	5	10
L-cisteína	0,25% (m/v)/ 0,1M HCl	3	6
HCl	0,01 M	5	10
APDC	0,05 % (m/v)	1,5	3
Disol. Lavado	APDC 0,01% (m/v) HNO ₃ 0,02% (v/v)	3	0,5
Aire	----	1 Elución 3 Vaciado	----
Etanol	Absoluto	----	40 µl

3.3 APLICACIÓN

El método adaptado para la determinación de As total en agua de mar mediante FI-ETAAS, se ha utilizado para realizar un estudio de la distribución de As en la Ría da Arousa. Posteriormente se dedica un capítulo a la especiación de As y Cr en esta ría, donde se expondrán los resultados obtenidos.

4 Bibliografía

- [1]. Ruzicka, J.; Hansen, E. H., *Flow Injection Analysis*. 2ª ed.; Wiley: New York, **1988**; Vol. 62.
- [2]. Fang, Z. L., *Flow injection atomic absorption spectrometry*. Wiley: Chichester, **1995**.
- [3]. Valcarcel, M.; Luque de Castro, M. D., *Automatic Methods of Analysis*. Elsevier: Amsterdam, **1988**; Vol. 9.
- [4]. IUPAC, Classification and Definition of Analytical Methods Based on Flowing Media. *Pure and Appl. Chem.* **1994**, 66, (12), 2493-2500.
- [5]. Fang, Z. L., *Flow Injection Separation and Preconcentration*. VCH: Weinheim, **1993**.
- [6]. Sanz-Medel, A., *Flow Analysis with Atomic Spectrometric Detectors*. Elsevier: Amsterdam, **1999**; Vol. 9.
- [7]. Trojanowicz, M., *Flow Injection Analysis. Instrumentation and Applications*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.: Singapore, **2000**.
- [8]. Wolf, W. R.; Stewart, K. K., Automated multiple flow injection analysis for flame atomic absorption spectrometry. *Anal. Chem.* **1979**, 51, (8), 1201-1205.
- [9]. Yoza, N.; Aoyagi, Y.; Ohashi, S.; A., T., Flow injection system for atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **1979**, 111, 163-167.
- [10]. Zagatto, E. A. G.; Krug, F. J.; Bergamin, F. H.; Jorgesen, S. S.; Reis, B. F., Merging zones in flow injection analysis. Part 2. Determination of calcium, magnesium, and potassium in plant material by continuous flow injection atomic absorption and flame emission spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **1979**, 104, (2), 279-284.
- [11]. Astrom, O., Flow injection analysis for the determination of bismuth by atomic absorption spectrometry with hydride generation. *Anal. Chem.* **1982**, 54, (2), 190-193.
- [12]. Danielsson, L. G.; Nord, L., Sample workup for atomic absorption spectrometry using flow injection extraction. *Anal. Proc.* **1983**, 20, (6), 298.
- [13]. Burguera, J. L.; Burguera, M.; La Cruz, L.; Naranjo, R., Determination of lead in the urine of exposed and unexposed adults by extraction and flow-injection/atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **1986**, 186, 273-277.
- [14]. Burguera, J. L., *Flow-injection Atomic Spectroscopy*. Marcel Dekker: New York, **1989**.
- [15]. Burguera, J. L.; Burguera, M., Flow Injection for Automation in Atomic Spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **1997**, 12, 643-651.
- [16]. Alonso, E. V.; de Torres, A. G.; Pavon, J. M. C., Flow injection on-line electrothermal atomic absorption spectrometry. *Talanta* **2001**, 55, (2), 219-232.
- [17]. Fang, Z. L. S., M.; Welz, B., Flow-injection on-line sorbent extraction preconcentration for graphite furnace atomic absorption spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **1990**, 5, (7), 639-646.
- [18]. Burguera, J. L.; Burguera, M., Flow injection-electrothermal atomic absorption spectrometry configurations: recent developments and trends. *Spectrochim. Acta Part B* **2001**, 56, 1801-1829.
- [19]. Yan, X. P.; Jiang, Y., Flow injection on-line preconcentration and separation coupled with atomic (mass) spectrometry for trace element (speciation) analysis based on sorption of organo-metallic complexes in a knotted reactor. *Trac* **2001**, 20, (10), 552-562.

- [20]. Chalk, S. J., Flow Injection Analysis Database. In <http://www.fia.unf.edu>. (16/01/2007)
- [21]. Fang, Z., *Flow Injection Separation and Preconcentration*. VCH: Weinheim, **1993**.
- [22]. Morales, A. D. I. G., M., Applications in the Environmental Analysis. In *Flow Analysis with Atomic Spectrometric Detectors*, Sanz-Medel, A., Ed. Elsevier: Amsterdam, **1999**; Vol. 9, p 335.
- [23]. Welz, B.; Sperling, M., *Atomic Absorption Spectrometry*. 3^a ed.; Wiley-VCH: Weinheim, **1999**.
- [24]. Peterson, B. A. F., Z. L.; Ruzicka, J.; Hansen, E. H., Conversion techniques in flow injection analysis: Determination of Sulphide by Precipitation with Cadmium Ions and Detection by Atomic Absorption Spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **1986**, 184, 165-172.
- [25]. Olsen, P. P., L.C.; Ruzicka J.; Hansen E. H., Combination of flow injection analysis with atomic absorption spectrometry. Determination of trace amounts of heavy metals in polluted sea water. *Analyst* **1983**, 108, (1289), 905-917.
- [26]. Xu, S. S., M.; Welz, B., Flame atomic absorption spectrometric determination of cadmium and copper in biological reference materials using on-line sorbent extraction preconcentration. *Fresenius' J. Anal. Chem.* **1992**, 344, (12), 535-540.
- [27]. Burguera, J. L.; Burguera, M., On-line sample pre-treatment systems interfaced to electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analyst* **1998**, 123, 561-569.
- [28]. Engelhardt, H.; Neue, U. D., Reaction detector with three dimensional coiled open tubes in HPLC. *Cromatographia* **1982**, 15, (7), 403-408.
- [29]. Fang, Z. S., M. and Welz, B., Flame atomic absorption spectrometric determination of lead in biological samples using a flow injection system with on-line preconcentration by coprecipitation without filtration. *J. Anal. At. Spectrom.* **1991**, 6, (4), 301-306.
- [30]. Fang, Z. L.; Xu, S. K.; Dong, L. P.; Li, W. Q., Determination of Cadmium in Biological-Materials by Flame Atomic-Absorption Spectrometry with Flow-Injection Online Sorption Preconcentration. *Talanta* **1994**, 41, (12), 2165-2172.
- [31]. Garrido-Troche, I.; Soto-Ferreiro, R. M.; Carlosena-Zubieta, A.; Lopez-Mahia, P.; Muniategui-Lorenzo, S.; Prada-Rodriguez, D., Study of cadmium-DDC complex adsorption in knotted reactor using different eluents. *At. Spectrosc.* **2001**, 22, (6), 438-441.
- [32]. Liawruangrath, S.; Som-Aum, W.; Townshend, A., A comparison of enrichment factor of knotted and serpentine reactors using flow injection sorption and preconcentration for the off-line determination of some trace elements by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta* **2002**, 58, (6), 1177-1184.
- [33]. Nielsen, S.; Hansen, E. H., Selective flow-injection quantification of ultra-trace amounts of Cr(VI) via on-line complexation and preconcentration with APDC followed by determination by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **1998**, 366, (1-3), 163-176.
- [34]. Nielsen, S. C.; Hansen, E. H., Interfacing flow injection analysis (sequential injection analysis) and electro-thermal atomic absorption spectrometry determination of trace-levels of Cr(VI) via on-line pre-concentration by adsorption in a knotted reactor and by liquid-liquid extraction. *Anal. Chim. Acta* **2000**, 422, (1), 47-62.
- [35]. Nielsen, S.; Stürup, S.; Spliid, H.; Hansen, E. H., Selective Flow Injection Analysis of Ultratrace Amounts of Cr(VI), Preconcentration of it by Solvent Extration and Determination by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry (ETAAS). *Talanta* **1999**, 49, 1027-1044.

- [36]. Som-Aum, W.; Liawruangrath, S.; Hansen, E. H., Flow injection on-line preconcentration of low levels of Cr(VI) with detection by ETAAS - Comparison of using an open tubular PTFE knotted reactor and a column reactor packed with PTFE beads. *Anal. Chim. Acta* **2002**, 463, (1), 99-109.
- [37]. Benkhedda, I.; Ivanova, E.; Adams, F., Flow injection on-line sorption preconcentration of trace amounts of copper and manganese in a knotted reactor precoated with 1-phenyl-3-methyl-4-benzoylpyrazol-5-one coupled with electrothermal atomic absorption spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **1999**, 14, (6), 957-961.
- [38]. Ivanova, E.; Benkhedda, K.; Adams, F., Determination of copper, manganese and nickel in biological samples and sea-water by flow injection on-line sorption preconcentration in a knotted reactor coupled with electrothermal atomic absorption spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **1998**, 13, (6), 527-531.
- [39]. Benkhedda, K.; Infante, H. G.; Ivanova, E.; Adams, F., Ultratrace determination of cobalt in natural waters by electrothermal atomic absorption spectrometry using flow-injection on-line sorption preconcentration in a knotted reactor precoated with 1-phenyl-3-methyl-benzoylpyrazol-5-one. *J. Anal. At. Spectrom.* **2000**, 15, (4), 429-434.
- [40]. Benkhedda, K.; Infante, H. G.; Ivanova, E.; Adams, F. C., Trace metal analysis of natural waters and biological samples by axial inductively coupled plasma time of flight mass spectrometry (ICP-TOFMS) with flow injection on-line adsorption preconcentration using a knotted reactor. *J. Anal. At. Spectrom.* **2000**, 15, (10), 1349-1356.
- [41]. Chen, S. Y.; Zhang, Z. F.; Yu, H. M., Dithione as chelator in the flow injection separation and preconcentration system of trace metals in biological samples. *Anal. Chim. Acta* **2002**, 451, (2), 305-311.
- [42]. Tsakovski, S.; Benkhedda, K.; Ivanova, E.; Adams, F. C., Comparative study of 8-hydroxyquinoline derivatives as chelating reagents for flow-injection preconcentration of cobalt in a knotted reactor. *Anal. Chim. Acta* **2002**, 453, (1), 143-154.
- [43]. Anthemidis, A. N.; Zachariadis, G. A.; Stratis, J. A., On-line solid phase extraction system using PTFE packed column for the flame atomic absorption spectrometric determination of copper in water samples. *Talanta* **2001**, 54, (5), 935-942.
- [44]. Chen, H. W.; Xu, S. K.; Fang, Z. L., Determination of Copper in Water and Rice Samples by Flame Atomic-Absorption Spectrometry with Flow-Injection Online Adsorption Preconcentration Using a Knotted Reactor. *Anal. Chim. Acta* **1994**, 298, (2), 167-173.
- [45]. Yan, X.-P.; Kerrich, R.; Hendry, M. J., Determination of (Ultra)trace Amounts of Arsenic(III) and Arsenic(V) in Water by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Coupled with Flow Injection Online Sorption Preconcentration and Separation in a Knotted Reactor. *Anal. Chem.* **1998**, 70, (22), 4736-4742.
- [46]. Yan, X.-P.; Yin, X.-B.; He, X.-W.; Jiang, Y., Flow Injection On-Line Sorption Preconcentration Coupled with Hydride Generation Atomic Fluorescence Spectrometry for Determination of (Ultra)trace Amounts of Arsenic(III) and Arsenic(V) in Natural Water Samples. *Anal. Chem.* **2002**, 74, (9), 2162-2166.
- [47]. Lu, C. Y.; Yan, X. P.; Zhang, Z. P.; Wang, Z. P.; Liu, L. W., Flow injection on-line sorption preconcentration coupled with hydride generation atomic fluorescence spectrometry using a

- polytetrafluoroethylene fiber-packed microcolumn for determination of Se(IV) in natural water. *J. Anal. At. Spectrom.* **2004**, 19, (2), 277-281.
- [48]. Benkhedda, K.; Dimitrova, B.; Infante, H. G.; Ivanova, E.; Adams, F. C., Simultaneous on-line preconcentration and determination of Pt, Rh and Pd in urine, serum and road dust by flow injection combined with inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **2003**, 18, (9), 1019-1025.
- [49]. Garrido, I.; Soto, R. M.; Carlosena, A.; Lopez-Mahia, P.; Muniategui, S.; Prada, D., Flame atomic absorption spectrometry with flow-injection on-line adsorption preconcentration using a knotted reactor for cadmium determination in aqueous samples. *Anal. Letters* **2001**, 34, (10), 1763-1779.
- [50]. Menendez Garcia, A.; Perez Rodriguez, M. C.; Sanchez Uria, J. E.; Sanz-Medel, A., Sb(III) and Sb(V) separation and analytical speciation by a continuous tandem online separation device in connection with inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Fresenius' J. Anal. Chem.* **1995**, 353, (2), 128-32.
- [51]. Yan, X. P.; VanMol, W.; Adams, F., Determination of (ultra)trace amounts of antimony(III) in water by flow injection on-line sorption preconcentration in a knotted reactor coupled with electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analyst* **1996**, 121, (8), 1061-1067.
- [52]. Ivanova, E.; Adams, F., Flow injection on-line sorption preconcentration of platinum in a knotted reactor coupled with electrothermal atomic absorption spectrometry. *Fresenius' J. Anal. Chem.* **1998**, 361, (5), 445-450.
- [53]. Li, Y.; Jiang, Y.; Yan, X. P.; Ni, Z. M., Determination of trace mercury in environmental and foods samples by online coupling of flow injection displacement sorption preconcentration to electrothermal atomic absorption spectrometry. *Environm. Sci. Technol.* **2002**, 36, (22), 4886-4891.
- [54]. Yu, L. P.; Yan, X. P., Flow injection on-line sorption preconcentration coupled with cold vapor atomic fluorescence spectrometry and on-line oxidative elution for the determination of trace mercury in water samples. *At. Spectrosc.* **2004**, 25, (3), 145-153.
- [55]. Ivanova, E.; Yan, X. P.; vanMol, W.; Adams, F., Determination of thallium in river sediment by flow injection on-line sorption preconcentration in a knotted reactor coupled with electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analyst* **1997**, 122, (7), 667-671.
- [56]. Li, Y.; Jiang, Y.; Yan, X. P.; Peng, W. J.; Wu, Y. Y., A flow injection on-line multiplexed sorption preconcentration procedure coupled with flame atomic absorption spectrometry for determination of trace lead in water, tea, and herb medicines. *Analytical Chemistry* **2002**, 74, (5), 1075-1080.
- [57]. Sperling, M.; Yan, X. P.; Welz, B., Investigation of on-line coupling electrothermal atomic absorption spectrometry with flow injection sorption preconcentration using a knotted reactor for totally automatic determination of lead in water samples. *Spectrochim. Acta Part B* **1996**, 51, (14), 1891-1908.
- [58]. Yan, X. P.; Adams, F., Flow injection on-line sorption separation and preconcentration with a knotted reactor for electrothermal atomic absorption spectrometric determination of lead in biological and environmental samples. *J. Anal. At. Spectrom.* **1997**, 12, (4), 459-464.

- [59]. Ye, Q. Y.; Li, Y.; Jiang, Y.; Yan, X. P., Determination of trace lead in water samples by flow injection on-line filterless precipitation-dissolution preconcentration coupled with flame AAS. *At. Spectrosc.* **2002**, 23, (5), 154-159.
- [60]. Wang, J. H.; Hansen, E. H., On-line sample-pre-treatment schemes for trace-level determinations of metals by coupling flow injection or sequential injection with ICP-MS. *Trac.* **2003**, 22, (11), 836-846.
- [61]. Jan, T. K.; Young, D. R., Determination of Microgram Amounts of Some Transition Metals in Seawater by Methyl Isobutyl Ketone-Nitric Acid Successive Extraction and Flameless Atomic Absorption Spectrometry. *Anal. Chem.* **1978**, 50, (9), 1250-1253.
- [62]. Subramanian, K. S., Determination of Chromium(III) and Chromium(VI) by Ammonium Pyrrolidine Carbodithioate-Methyl Isobutyl Ketone Furnace Atomic Absorption Spectrometry. *Anal. Chem.* **1988**, 60, 11-15.
- [63]. Sturgeon, R. E.; Willie, S. N.; Bernan, S. S., Preconcentration of Selenium and Antimony from Seawater for Determination by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. *Anal. Chem.* **1985**, 57, 6-9.
- [64]. Costa, R. C. C.; Almeida, A. A.; Araujo, A. N.; Silva, V. L., Sequential preconcentration for the ETAAS determination of Pd in human urine. *At. Spectrosc.* **2002**, 23, (1), 17-23.
- [65]. Yan, X. P.; Sperling, M.; Welz, B., On-line coupling of flow injection microcolumn separation and preconcentration to electrothermal atomic absorption spectrometry for determination of (ultra)trace selenite and selenate in water. *Anal. Chem.* **1999**, 71, (19), 4353-4360.
- [66]. Soyak, M.; Elci, L.; Dogan, M., Determinations of Some Trace Metals in Dialysis Solutions by Atomic Absorption Spectrometry after Preconcentration. *Anal. Letters* **1993**, 26, (9), 1997-2007.
- [67]. Francesconi, K. A.; Edmonds, J. S., Arsenic species in marine samples. *Croatica Chemica Acta* **1998**, 71, (2), 343-359.
- [68]. Lemmo, N. V.; Faust, S. D.; Belton, T.; Turcker, R., Assessment of the chemical and biological significance of arsenical compounds in a heavily contaminated watershed. Part 1. The fate and speciation of arsenical compounds in aquatic environments — a literature review. *J. Environm. Sci. Health* **1983**, A 18, 335.
- [69]. Johnson, D. L.; Burke, R. M., Biological mediation of chemical speciation II. Arsenate reduction during marine phytoplankton blooms. *Chemosphere* **1978**, 7, (8), 645-648.
- [70]. Burton, J. D.; Stratham, P. J., Trace metals in seawater. In *Heavy Metals in the Marine Environment*, Furness, R. W.; Rainbow, P. S., Eds. CRC Press: Boca Raton, Florida, **1990**; pp 5-26.
- [71]. Larsen, E. H.; Berg, T., Trace Element Speciation International Food Legislation-A Codex Alimentarius Position Paper on Arsenic as a Contaminant. In *Trace Element Speciation for Environmental, Food and Health*, Ebdon, L. P., L.; Cornelis, R.; Crews, H.; Donard, O. F.; Quevauviller, P., Ed. Royal Society of Chemistry: Cambridge, **2001**; pp 251-260.
- [72]. Sperling, M.; Yin, X. F.; Welz, B., Differential Determination of Arsenic(III) and Total Arsenic Using Flow-Injection Online Separation and Preconcentration for Graphite-Furnace Atomic-Absorption Spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B* **1991**, 46, (14), 1789-1801.

- [73]. Fang, Z. L., Trends and potentials in flow injection on-line separation and preconcentration techniques for electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B* **1998**, 53, (10), 1371-1379.
- [74]. Iwamoto, E.; Shimazu, H.; Yokota, K.; Kumura, T., Determination of Tin by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry with a Tungsten-coated Tube. *J. Anal. At. Spectrom.* **1992**, 7, 421-424.
- [75]. Rademeyer, C. J.; Radziuk, B., Permanent Iridium Modifier for Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **1995**, 10, 739-745.
- [76]. Tsalev, D. L.; D'Ulivo, A.; Lampugnani, L.; Di Marco, M.; Zamboni, R., Thermally Stabilized Iridium on an Integrated, Carbide-coated Platform as a Permanent Modifier for Hydride-forming Elements in Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. Part 1. Optimization Studies. *J. Anal. At. Spectrom.* **1995**, 10, 1003-1009.
- [77]. Barciela-García, J. Selenio en medios biológicos. Especiación y biodisponibilidad de selenio en leche. Tesis Doctoral. Santiago de Compostela, 1999.
- [78]. Bermejo-Barrera, P.; Moreda-Piñeiro, J.; Moreda-Piñeiro, A.; Bermejo-Barrera, A., Use of Flow Injection Cold Vapour Generation and Preconcentration on Coated Graphite Tubes for the Determination of Cadmium in Sea-water by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **1996**, 11, 1081-1086.
- [79]. Turekian, K. K., *Oceans*. Prentice-Hall: N. Y., **1968**.
- [80]. Herbelo-Hermelo, P.; Barciela-Alonso, M. C.; Bermejo-Barrera, A.; Bermejo-Barrera, P., Flow on-line sorption preconcentration in a knotted reactor coupled with electrothermal atomic absorption spectrometry for the selective As(III) determination in sea-water samples. *J. Anal. At. Spectrom.* **2005**, 20, 662-665.
- [81]. Menegario, A. A.; Gine, M. F., Rapid sequential determination of arsenic and selenium in waters and plant digests by hydride generation inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B* **2000**, 55, (4), 355-362.
- [82]. Bowman, J.; Fairman, B.; Catterick, T., Development of a multi-element hydride generation inductively coupled plasma mass spectrometry procedure for the simultaneous determination of arsenic, antimony and selenium in waters. *J. Anal. At. Spectrom.* **1997**, 12, (3), 313-316.
- [83]. Dabeka, R. W.; Lacroix, G. M. A., Total Arsenic in Foods after Sequential Wet Digestion, Dry Ashing, Coprecipitation with Ammonium Pyrrolidone Dithiocarbamate, and Graphite-Furnace Atomic-Absorption Spectrometry. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **1987**, 70, (5), 866-870.
- [84]. Nielsen, S.; Hansen, E. H., Determination of As(III) and As(V) by flow injection-hydride generation-atomic absorption spectrometry via on-line reduction of As(V) by KI. *Anal. Chim. Acta* **1997**, 343, (1-2), 5-17.
- [85]. Welz, B. H., Y. and Sperling M., Flow Injection On-line Acid Digestion and Pre-reduction of Arsenic for Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry-A Feasibility Study. *Talanta* **1993**, 40, (12), 1917-1926.
- [86]. Gonzalez, J. C.; Lavilla, I.; Bendicho, C., Evaluation of non-chromatographic approaches for speciation of extractable As(III) and As(V) in environmental solid samples by FI-HGAAS. *Talanta* **2003**, 59, (3), 525-534.

- [87]. Pozebon, D.; Dressler, V. L.; Gomes Neto, J. A.; Curtius, A. J., Determination of arsenic(III) and arsenic(V) by electrothermal atomic absorption spectrometry after complexation and sorption on a C-18 bonded silica column. *Talanta* **1998**, 45, (6), 1167-1175.
- [88]. Coelho, N. M. M.; da Silva, A. C.; da Silva, C. M., Determination of As(III) and total inorganic arsenic by flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2002**, 460, (2), 227.
- [89]. Schaumloffel, D.; Neidhart, B., A FIA-system for As(III)/As(V)-determination with electrochemical hydride generation and AAS-detection. *Fresenius' J. Anal. Chem.* **1996**, 354, (7-8), 866-869.
- [90]. Celkova, A.; Kubova, J.; Stresko, V., Determination of arsenic in geological samples by HG AAS. *Fresenius' J. Anal. Chem.* **1996**, 355, (2), 150-153.
- [91]. Carrero, P.; Malave, A.; Burguera, J. L.; Burguera, M.; Rondon, C., Determination of various arsenic species by flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry: investigation of the effects of the acid concentration of different reaction media on the generation of arsines. *Anal. Chim. Acta* **2001**, 438, (1-2), 195.
- [92]. Tsalev, D. L.; Sperling, M.; Welz, B., Flow-injection hydride generation atomic absorption spectrometric study of the automated on-line pre-reduction of arsenate, methylarsonate and dimethylarsinate and high- performance liquid chromatographic separation of their L- cysteine complexes. *Talanta* **2000**, 51, (6), 1059-1068.
- [93]. Beauchemin, D., Hydride generation interface for the determination of inorganic arsenic and organoarsenic by inductively coupled plasma mass spectrometry using open-focused microwave digestion to enhance the pre-reduction process. *J. Anal. At. Spectrom.* **1998**, 13, (1), 1-5.
- [94]. Yan, X.-P.; Yin, X.-B.; He, X.-W.; Jiang, Y., Flow Injection On-Line Sorption Preconcentration Coupled with Hydride Generation Atomic Fluorescence Spectrometry for Determination of (Ultra)trace Amounts of Arsenic(III) and Arsenic(V) in Natural Water Samples. *Anal. Chem.* **2002**, 74, (9), 2162-2166.
- [95]. Shi, J. B.; Tang, Z. Y.; Jin, Z. X.; Chi, Q.; He, B.; Jiang, G. B., Determination of As(III) and As(V) in soils using sequential extraction combined with flow injection hydride generation atomic fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta* **2003**, 477, (1), 139-147.
- [96]. Lamble, K. J. a. H., S. J., Arsenic speciation in biological samples by on-line high performance liquid chromatography-microwave digestion-hydride generation-atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **1996**, 334, 261-270.
- [97]. Tsalev, D. L. D. U., A. y Lampugnani, L., Thermally Stabilized Iridium on an Integrated, Carbide-coated Platform as a Permanent Modifier for Hydride-forming Elements in Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. Part 3. Effect of L-Cysteine. *J. Anal. At. Spectrom.* **1996**, 11, (10), 989-995.
- [98]. Subramanian, K. S.; Meranger, J. C., Determination of arsenic(III), arsenic(V), antimony(III), antimony(V), selenium(IV) and selenium(VI) by extraction with ammonium pyrrolidinedithiocarbamate-methyl isobutyl ketone and electrothermal atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **1981**, 124, (1), 131-42.
- [99]. Burguera, M.; Burguera, J. L.; Rodon, C.; Rivas, C.; Carrero, P.; Gallignani, M.; Bruneto, M. R., In Vivo Sample Uptake and On-line Measurements of Co in Whole Blood by Microwave-assisted

Mineralization and Flow Injection Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **1995**, 10, 343-347.

CAPÍTULO 4

CAPÍTULO 4

Uso de reactores anudados para la preconcentración de Cr mediante FI-ETAAS en muestras de agua de mar

1 DETERMINACIÓN SELECTIVA DE CR (VI) EN AGUA DE MAR.....	191
1.1 INTRODUCCIÓN	191
1.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL	191
1.2.1 Equipamiento.....	191
1.2.1.1 Aparatos	191
1.2.1.2 Reactivos	192
1.2.1.3 Limpieza del material	194
1.2.2 Optimización de la programa de temperatura de la cámara de grafito	194
1.2.3 Preconcentración. Optimización.....	196
1.2.3.1 Efecto de la concentración HCl	197
1.2.3.2 Efecto de la cantidad de APDC	199
1.2.3.3 Efecto de la proporción de mezcla muestra/APDC	200
1.2.3.4 Efecto del tiempo de preconcentración	201
1.2.3.5 Elección de la disolución de lavado.....	202
1.2.3.6 Efecto de la longitud del reactor anudado y volumen de elución	204
1.2.4 Características analíticas.....	206
1.2.4.1 Rectas de calibrado y adición estándar	206
1.2.4.2 Sensibilidad	210
1.2.4.3 Precisión	211
1.2.4.4 Exactitud.....	212
1.2.4.5 Factor de preconcentración y eficacia de adsorción	213
1.2.4.6 Interferencias	214
1.2.5 Método propuesto	216
1.3 APLICACIÓN	217
2 DETERMINACIÓN DE CR TOTAL EN MUESTRAS DE AGUA DE MAR MEDIANTE FI-ETAAS	218
2.1 INTRODUCCIÓN	218

2.1.1 Preoxidación.....	218
2.1.1.1 Ce(IV).....	218
2.1.1.2 Peroxodisulfato, $S_2O_8^{2-}$	219
2.1.1.3 $KMnO_4$	220
2.1.1.4 $H_2O_2/NaOH$	220
2.1.1.5 KIO_4	220
2.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL	221
2.2.1 Equipamiento.....	221
2.2.1.1 Aparatos.....	221
2.2.1.2 Reactivos.....	222
2.2.1.3 Limpieza de material.....	222
2.2.2 Modificación del montaje FI.....	223
2.2.3 Elección del oxidante. Ensayos preliminares.....	224
2.2.3.1 Ce(IV).....	224
2.2.3.2 $K_2S_2O_8/AgNO_3$	225
2.2.3.3 $K_2S_2O_8$ en medio ácido.....	227
2.2.4 Efecto de la potencia del microondas. Ensayos preliminares.....	228
2.2.5 Optimización de la etapa de oxidación.....	229
2.2.5.1 Efecto de la concentración $K_2S_2O_8/HCl$	230
2.2.5.2 Efecto de la potencia de microondas focalizado.....	232
2.2.6 Características analíticas.....	235
2.2.6.1 Rectas de calibrado y adición estándar.....	235
2.2.6.2 Sensibilidad.....	237
2.2.6.3 Precisión.....	238
2.2.6.4 Exactitud.....	239
2.2.6.5 Factor de preconcentración y eficacia de adsorción.....	240
2.2.7 Método propuesto.....	241
2.3 APLICACIÓN	242
3 BIBLIOGRAFÍA.....	243

1 Determinación selectiva de Cr (VI) en agua de mar

1.1 INTRODUCCIÓN

Las muestras de la Ría de Arousa analizadas con el primer método propuesto mediante la formación del quelato volátil $\text{Cr}(\text{TFA})_3$ presentan unas concentraciones Cr(VI) muy bajas, por lo surge la necesidad de desarrollar otro método más sensible. En vista del éxito del uso de reactores anudados para la preconcentración de As en muestras de agua de mar se ha decidido desarrollar un método similar para la especiación de Cr basado en la preconcentración y separación en reactores anudados mediante un sistema de inyección en flujo acoplado a un equipo de ETAAS.

1.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL

Las condiciones de partida empleadas para realizar la optimización del método de determinación selectiva de Cr(VI) han sido tomadas del método anteriormente propuesto para la determinación de As(III) en agua de mar mediante un sistema de preconcentración usando un reactor anudado y la formación del quelato con APDC.

1.2.1 Equipamiento

1.2.1.1 Aparatos

Las medidas se han realizado usando un espectrómetro Perkin-Elmer Model 4100ZL equipado con una cámara de grafito de calentamiento transversal (THGA) y el automuestreador AS 71. Se han utilizado tubos de grafito pirolítico con plataforma L'vov. Este equipo además dispone de un corrector de fondo Zeeman.

Se ha usado una lámpara de cátodo hueco trabajando a 12 mA, la cual proporciona una longitud de onda de 357,9 nm con un ancho de banda espectral de 0,7 nm. Para evaluación de los resultados se ha empleado la absorbancia integrada durante 5 segundos.

El espectrómetro se ha acoplado al sistema de inyección en flujo PerkinElmer FIAS-400 equipado con 2 bombas peristálticas controladas individualmente y una válvula de inyección estándar de 5 vías. Ambos equipos se controlan desde un único ordenador con el software AAWinLab 4.01, funcionando en modo "FIAS-Furnace". Además se ha empleado dos válvulas Rheodyne, una de selección con 6 entradas y 1 salida y otra de conmutación de 6 posiciones. Para impulsar la muestra, los reactivos, el eluyente y el aire se han usado tubos Tygon® (Perkin-Elmer). El bucle de carga se ha construido con un capilar de PTFE de 0,5 mm de diámetro interno variando la longitud (10, 15, 20, 25, o 30 cm) para obtener diferentes volúmenes de eluyente 20, 30, 40, 50, 60 µl etanol. Todas las conexiones están construidas con capilar de PTFE de 0,35 mm de diámetro interno. Varios reactores anudados de diferentes longitudes se han hecho con un capilar de PTFE de 0,5 mm de diámetro interno.

1.2.1.2 Reactivos

- Disolución patrón de Cr(III) de 1000 mg l⁻¹ Cr(NO₃)₃ (Merck, Alemania).
- Disolución patrón de Cr(VI) de 1000 mg l⁻¹ Cr. Preparada disolviendo K₂Cr₂O₇ (99%) (Aldrich Chemical, USA) y conservada a 4°C.
- Amonio pirrolinditiocarbamato (APDC) (Sigma, Alemania). A partir de esta sal se prepara un disolución stock del 1% (m/v) APDC y se conserva a 4°C.
- HCl 35% Hiperpur (Panreac, España).
- HNO₃ 69% Hiperpur (Panreac, España).

- Etanol absoluto para análisis (Panreac, España) destilado.
- NaCl para análisis, (Merck, Alemania)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, PA-ACS (Panreac, España)
- NaHCO_3 para análisis (Merck, España)
- Molibdato amónico para análisis (Merck, Alemania)
- Disolución patrón de 1000 mg l^{-1} Ni SpectroSol (BDH, Reino Unido)
- Disolución patrón de 1000 mg l^{-1} Zn (Merck, Alemania)
- Disolución patrón de 1000 mg l^{-1} Fe Atomic Spectroscopy Standard (PerkimElmer, USA)
- Disolución patrón de 1000 mg l^{-1} de As SpectroSol (BDH, Reino Unido)
- Disolución patrón de 1000 mg l^{-1} V Certipur (Merck, Alemania)
- Disolución patrón de 1000 mg l^{-1} Al (Merck, Alemania)
- Disolución patrón de 1000 mg l^{-1} Se (Merck, Alemania)
- Disolución patrón de 1000 mg l^{-1} Cu Atomic Spectroscopy Standard (PerkimElmer, USA)
- Disolución patrón de 1000 mg l^{-1} Sn SpectroSol (BDH, Reino Unido)
- Disolución patrón de 1000 mg l^{-1} Mn (Panreac, España)
- Disolución patrón de 1000 mg l^{-1} Co (BDH, Reino Unido)
- Disolución patrón de 1000 mg l^{-1} Sb (Baker, USA)
- Disolución patrón de 1000 mg l^{-1} Ag (BDH, Reino Unido)
- Disolución patrón de 1000 mg l^{-1} Hg Atomic Spectroscopy Standard (PerkimElmer, USA)
- Disolución patrón de 1000 mg l^{-1} Cd (Merck, Alemania)
- Disolución patrón de 1000 mg l^{-1} Pb (Merck, Alemania)

- Disolución patrón de 1000 mg l⁻¹ Ga SpectroSol (BDH, Reino Unido)
- Bi(NO₃)₃ para análisis (Merck, Alemania).
- Agua ultrapura. Resistividad 18 MΩ cm usando el sistema de purificación de agua Milli-Q® (Millipore).
- Argón N50 pureza: 99,999%, empleado como gas de purga y refrigeración en el atomizador.

1.2.1.3 Limpieza del material

Todo el material necesario, antes de ser utilizado, fue lavado cuidadosamente con agua y jabón, se enjuagan con agua Milli-Q® y se mantienen durante 48 horas en una disolución de HNO₃ al 10%. Posteriormente se vuelve a enjuagar con agua Milli-Q® y se almacena seco y listo para su uso en un lugar libre de polvo.

1.2.2 Optimización de la programa de temperatura de la cámara de grafito

Igual que en el método desarrollado para el As se utiliza un volumen de 40 µl etanol absoluto, para la elución del As retenido en el reactor anudado y se introduce en la cámara de grafito impulsado por aire. Dado que las propiedades del volumen inyectado difieren de los utilizados habitualmente se han revisado las condiciones del programa de temperatura de la cámara de grafito recomendado por el fabricante del equipo, Perkin-Elmer, para la determinación de Cr (Tabla 1).

Este estudio se ha realizado trabajando únicamente con el equipo ETAAS para comprobar la influencia de la temperatura en cada una de las etapas sobre la absorbancia correspondiente a una disolución de etanol dopada con 3 µg l⁻¹ Cr(VI).

Tabla 1. Programa de temperaturas de la cámara de grafito recomendando por Perkin-Elmer para la determinación de Cr.

Etapa	Temperatura / °C	Rampa / s	Permanencia / s	Flujo Ar / ml min ⁻¹
Secado I	110	1	30	250
Secado II	130	15	30	250
Mineralización	1500	10	20	250
Atomización	2300	0	5	0
Limpieza	2450	1	3	250

En primer lugar, se ha revisado la temperatura de la etapa de secado, ya que la elevada volatilidad del etanol nos debería permitir la disminución de esta. Se repiten los análisis a diferentes temperaturas entorno a las de partida 110°C y 130°C, prestando especial atención a la evolución del volumen inyectado en el interior del tubo con la ayuda de un pequeño espejo. Se comprueba que a 90°C y 120°C el secado es eficiente, por lo tanto se ha disminuido las temperaturas de las subetapas de secado a estos valores.

En segundo lugar, se ha optimizado la temperatura de la etapa de mineralización variando la temperatura entre 200°C y 1800°C. La curva de mineralización presenta un comportamiento casi ideal, la señal de absorbancia se mantiene prácticamente constante hasta 1300°C, a partir de la cual desciende bruscamente (Figura 1). Por tanto, seleccionamos 1300°C como temperatura óptima para la etapa de mineralización.

Y para finalizar, se ha estudiado el efecto de la temperatura de atomización modificándola desde 1500°C hasta 2500°C (Figura 1). Los mejores resultados tanto en absorbancia como en cuanto a la forma del pico se han obtenido a 2200°C. Se ha seleccionado, entonces, 2200°C como temperatura óptima de atomización.

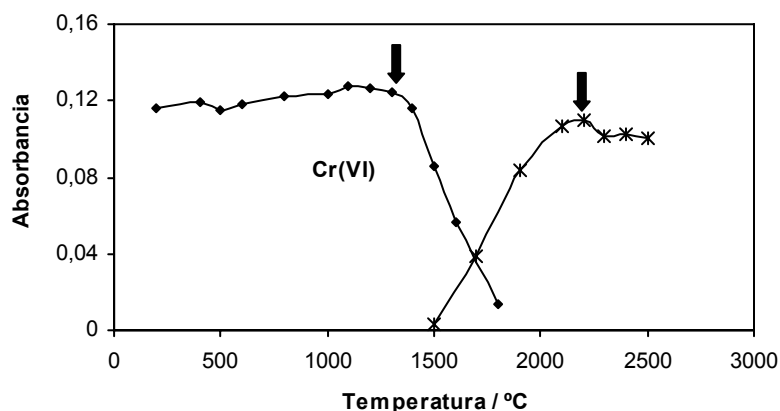


Figura 1. Curvas de mineralización y atomización para la determinación de Cr(VI) en etanol.

En la tabla 2 se resume el programa de temperaturas de la cámara de grafito optimizado para la determinación de Cr(VI) en etanol.

Tabla 2. Programa de temperaturas de la cámara de grafito para la determinación selectiva de Cr(VI) mediante FI-ETAAS en agua de mar.

Etapa	Temperatura / °C	Rampa / s	Permanencia / s	Flujo Ar / ml min ⁻¹
Secado I	90	1	30	250
Secado II	120	15	30	250
Mineralización	1300	10	20	250
Atomización	2200	0	5	0
Limpieza	2450	1	3	250

1.2.3 Preconcentración. Optimización

A continuación se revisaron los parámetros que influyen tanto en la formación del complejo Cr(VI)-APDC, la eficacia de la retención y de la elución.

Pero antes de comenzar con la optimización debemos solucionar un inconveniente que nos hemos encontrado al chequear el funcionamiento del sistema introduciendo uno a uno los reactivos utilizados. En el primer ensayo se obtuvo una señal demasiado elevada que en principio desconocemos su procedencia por que simplemente se ha bombeado agua Milli-Q[®] por todas la líneas y se ha eluido con etanol. Una vez descartada la posible contaminación del circuito o del agua Milli-Q[®] utilizada; nos planteamos la posibilidad de un contenido de trazas de Cr en el etanol empleado. Para comprobarlo se ha realizado una prueba analizando una alícuota de etanol, 40 µl, directamente en el equipo ETAAS. El resultado de esta prueba ha confirmado nuestra sospecha, el etanol contiene trazas de Cr. Además se ha probado con etanol de diferentes calidades disponibles en el laboratorio en ese momento, pero las señales seguían siendo elevadas para tratarse del blanco.

Una manera de resolver este problema es la purificación del etanol por destilación. Para ello, se ha montado un sistema de destilación tradicional manteniendo la temperatura de destilación a 80°C. Analizando varias alícuotas tomadas de diferentes fracciones durante la destilación se observa como la señal se reduce a medida que se recogen fracciones. Una vez que se ha verificado la purificación del etanol por destilación midiéndolo directamente en la cámara de grafito se ha probado con el sistema de preconcentración. Problema resuelto, con el etanol destilado desaparecen las señales anormalmente elevadas.

Al añadir los demás reactivos, APDC, HCl y disolución de lavado, se obtienen señales prácticamente nulas, valores aceptables como blanco.

1.2.3.1 Efecto de la concentración HCl

Anteriormente, ya se ha demostrado que la formación del complejo As-APDC se produce en medio ácido, por lo que a continuación estudiaremos el efecto del pH sobre la reacción de complejación en el caso del Cr(VI).

Para ello se han preparado 2 disoluciones de agua de mar sintética dopadas con $0,2 \mu\text{g l}^{-1}$ de Cr(VI) o Cr(III) por separado que usaremos como muestras, las cuales se mezclan con diferentes disoluciones de HCl variando la concentración entre 0 y 1 M.

Aunque los resultados obtenidos para la muestra dopada con Cr(VI) presentan un comportamiento similar a los obtenidos para As(III), la concentración óptima no coincide siendo en el caso de Cr 0,05 M HCl.

La formación del complejo requiere la adición de una disolución de al menos 0,005 M de HCl que se reflejan con la aparición de un pico apreciable. Una vez alcanzado el máximo, 0,05M, la absorbancia disminuye a concentraciones mayores de HCl (Figura 2). Las razones por las cuales se produce esta disminución pueden ser varias: degradación del APDC, cambio de estado de oxidación o efecto adverso sobre la reacción.

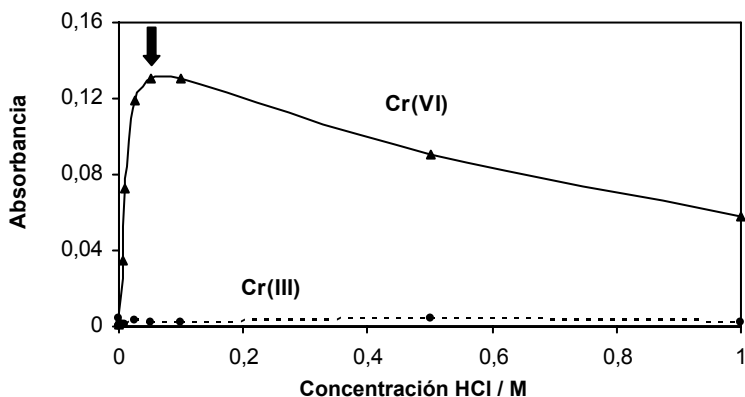


Figura 2. Influencia de la concentración de HCl sobre la formación del complejo Cr-APDC.

Las señales producidas por la disolución dopada con Cr(III) independientemente de la acidez del medio resultan despreciables por ser prácticamente iguales al blanco. De esto se deduce que la formación del complejo con el APDC tiene lugar selectivamente con el Cr(VI), y además el Cr(III) en forma iónica no presenta

capacidad de adsorción en las paredes del reactor anudado, lo cual permite una separación eficaz de ambas especies.

1.2.3.2 Efecto de la cantidad de APDC

El estudio de la influencia de la cantidad de agente complejante sobre la reacción de formación del complejo Cr(VI)-APDC y como consecuencia, la eficacia de la retención en el reactor anudado se ha realizado con una disolución de agua de mar sintética dopada con $0,2 \mu\text{g l}^{-1}$ Cr(VI), variando la cantidad de APDC entre 0 y 1%. Se han descartado las disoluciones de 0,5% y 1% m/v APDC porque provocaban la obstrucción de las conexiones de 0,5 mm de diámetro interno.

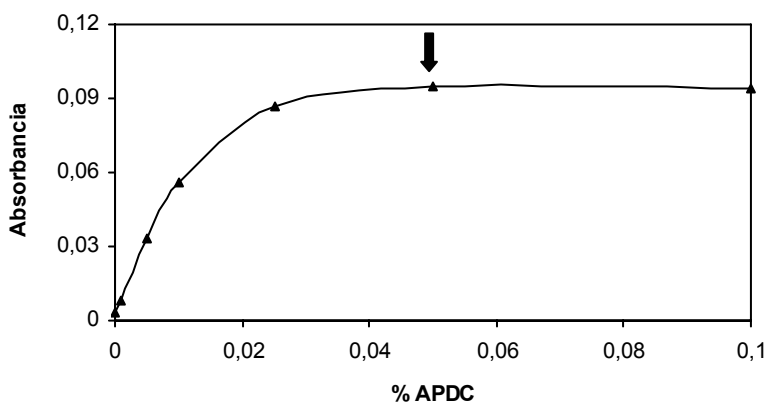


Figura 3. Optimización de la cantidad de APDC para la determinación selectiva de Cr(VI) en agua de mar.

Los valores de absorbanza obtenidos para las restantes disoluciones se representan en la figura 3. Por debajo del 0,005 % (m/v) APDC no se detecta Cr(VI), pero a medida que aumentamos la concentración hasta el 0,05% (m/v) APDC incrementa la señal. A partir de este punto, la eficacia de la preconcentración se mantiene a pesar de duplicar la cantidad de APDC. Por tanto, se ha elegido la disolución de 0,05% (m/v) APDC como la óptima para la determinación selectiva de Cr(VI) en agua de mar.

1.2.3.3 Efecto de la proporción de mezcla muestra/APDC

A continuación se ha estudiado la proporción de mezcla muestra/APDC, manteniendo constante el caudal de APDC a $1,5 \text{ ml min}^{-1}$ mientras se modifica el caudal de muestra. Los diferentes caudales de muestra se consiguen utilizando tubos de Tygon[®] de distinto diámetro interno. Como se ha comprobado anteriormente el pH influye considerablemente sobre la eficacia de la formación del complejo Cr-APDC; por ello se han realizado 2 series de experimentos. En la primera serie se fija el caudal de HCl a 5 ml min^{-1} , variando únicamente el caudal de la muestra. Mientras que en la segunda serie se modifica el caudal de HCl de manera que sea igual al caudal de la muestra en cada caso, con el fin de asegurar la acidez necesaria para la reacción de formación del quelato. En la figura 4 se puede comprobar como para caudales mayores o igual a 3 ml min^{-1} se alcanzan valores de absorbancia más elevados manteniendo constante el caudal de HCl $0,05 \text{ M}$ que con el caudal variable. Por lo tanto se ha decidido mantener el caudal de HCl fijo a 5 ml min^{-1} .

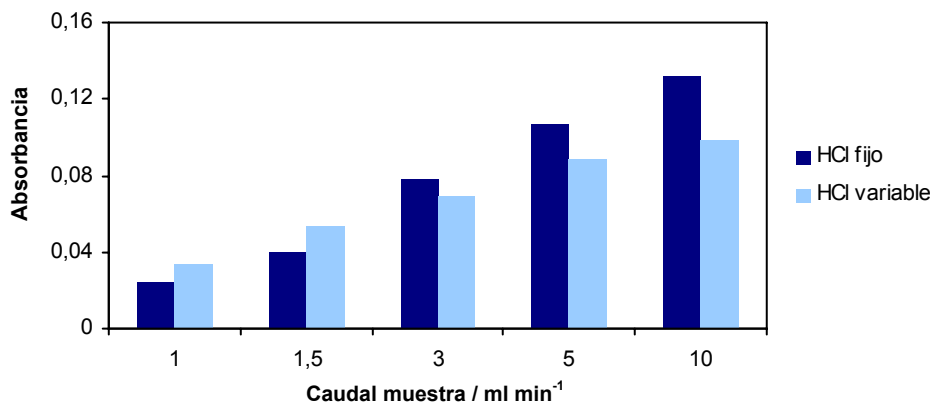


Figura 4. Optimización de la proporción de mezcla muestra/APDC para la determinación selectiva de Cr(VI) en agua de mar.

En vista de los resultados obtenidos (Figura 4) se deduce que la capacidad de retención del reactor anudado ni la cantidad de APDC son factores limitantes de la

eficacia del método de preconcentración. A pesar de un incremento en la cantidad de analito debido a un aumento del caudal de muestra, las señales de absorbancia crecen paulatinamente. Este incremento se produce porque la cantidad de APDC empleada es suficiente incluso para el caudal mayor de 10 ml min^{-1} y la capacidad de adsorción del reactor anudado todavía no ha alcanzado el máximo. En caso de que se alcanzara la capacidad límite de retención independientemente de un aumento en el caudal de la muestra la absorbancia se mantendría.

Aunque los mejores resultados se obtengan con el caudal mayor se ha seleccionado el caudal para la muestra de 5 ml min^{-1} , en base a una reducción considerable de volumen de muestra consumido. El volumen de muestra necesario prevalece sobre la mejoría en la sensibilidad que se obtendría con un caudal de 10 ml min^{-1} .

1.2.3.4 Efecto del tiempo de preconcentración

La influencia de la duración de la etapa de preconcentración sobre la señal de absorbancia se ha estudiado empleando el caudal de 5 ml min^{-1} para la muestra y el HCl, variando el tiempo de preconcentración entre 10 y 120 s.

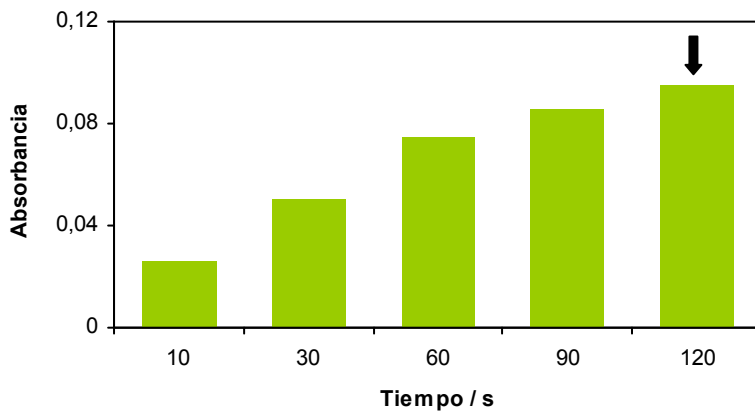


Figura 5. Optimización del tiempo de preconcentración para la determinación selectiva de Cr(VI) en agua de mar

Los mejores resultados se han obtenido preconcentrando durante 120 s (Figura 5). Aunque puede parecer que 2 minutos es demasiado tiempo; no suponen un aumento en el tiempo total de análisis porque la preconcentración y la detección en la cámara de grafito de la réplica anterior ocurren simultáneamente. Esto justifica que la secuencia del proceso no siga el orden lógico. Nos permite trabajar con tiempos de preconcentración mayores sin ralentizar el análisis, mientras se espera a que finalice el programa de temperaturas de la cámara de grafito. Además el volumen de muestra consumido es razonable, 10 ml por réplica. Por lo tanto, se ha establecido 120 s para la etapa de preconcentración.

1.2.3.5 Elección de la disolución de lavado

Cada vez que finaliza la etapa de preconcentración en la cual la muestra fluye a través del reactor anudado comienza la etapa de lavado con el fin de eliminar las posibles interferencias debidas a la complejidad de la matriz salina. Se ha comparado el efecto de distintas disoluciones de lavado: agua Milli-Q®, 0,02% HNO₃ y una mezcla de 0,01% (m/v) APDC/ 0,02% (v/v) HNO₃, sobre la señal producida por una muestra de agua de mar real dopada con 0,2 µg l⁻¹ Cr(VI).

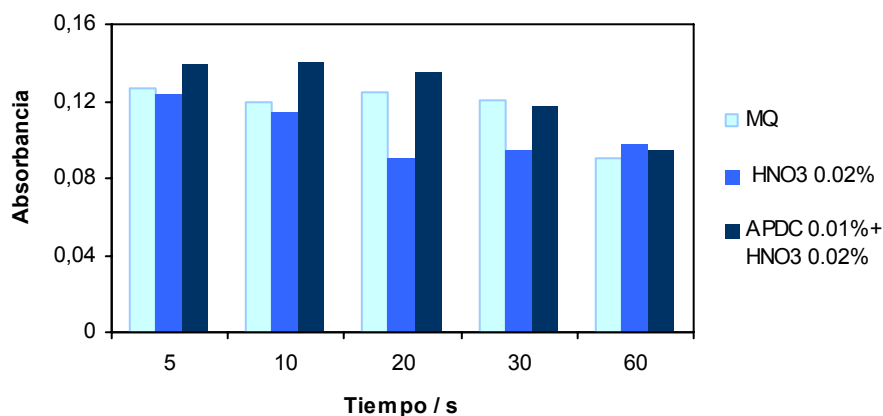


Figura 6. Estudio de la disolución de lavado para la determinación selectiva de Cr(VI) en agua de mar mediante FI-ETAAS.

Como se puede ver en la figura 6, el HNO_3 arrastra parte del Cr(VI) retenido en las paredes, acentuándose este fenómeno al aumentar el tiempo de lavado. Un comportamiento similar se ha observado con el agua Milli-Q[®], aunque en menor media. Por el contrario, la mezcla APDC/ HNO_3 no solo evita la liberación del Cr(VI) adherido sino que mejora la sensibilidad para tiempos inferiores a 30 s.

Se ha seleccionado la mezcla APDC/ HNO_3 con disolución de lavado, asignando a esta etapa una duración de 10 s, por ser el tiempo mínimo necesario para que la disolución de lavado recorra todo el reactor anudado.

Las pruebas anteriores demuestran la eficacia de la adición de APDC a la disolución de lavado. A continuación se ha optimizado la cantidad de APDC, variando la concentración entre 0 y 0,1% m/v APDC utilizando una muestra de agua de mar dopada con $0,1 \mu\text{g l}^{-1}$ Cr(VI).

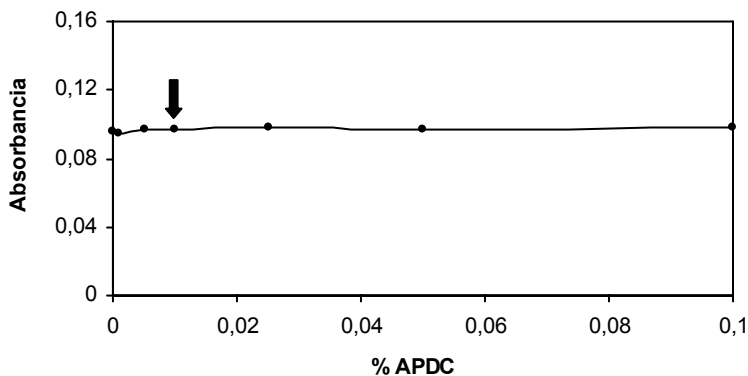


Figura 7. Optimización de la concentración de APDC en la disolución de lavado para la determinación de Cr(VI) en agua de mar mediante FI-ETAAS.

La señal de absorbancia se mantiene prácticamente constante independientemente de la cantidad de APDC añadida en la disolución de lavado (Figura 7). Ya que la concentración de APDC no es un parámetro crítico, se ha decidido mantener la disolución de lavado como la empleada hasta el momento 0,01% (m/v) APDC/ 0,02% (v/v) HNO_3 . Se ha considerado que esta concentración

de APDC es suficiente para evitar la liberación de complejo débilmente adherido a las paredes del reactor anudado.

1.2.3.6 Efecto de la longitud del reactor anudado y volumen de elución

El volumen de etanol necesario para la elución depende fundamentalmente de la longitud del reactor. Precisamente la propiedad de los reactores anudados que favorecen la preconcentración, dificulta la elución. La configuración del reactor anudado, concretamente, las sinuosidades provocadas en el capilar de PTFE al anudarlo sobre si mismo, acentúan la resistencia que ofrecen las paredes del capilar de PTFE al obligar al eluyente a realizar cambios de dirección constantemente. Se producen volúmenes muertos por fragmentación del segmento de etanol, por ello cuanto más largo sea el reactor anudado se requiere mayor volumen de eluyente.

Por ello se ha estudiado conjuntamente la longitud del reactor anudado y el volumen de elución, utilizando distintos reactores anudados de 50, 75, 100, 125, 150 y 200 cm de longitud, todos ellos con un diámetro interno de 0,5 mm. Con cada uno de estos reactores se realizaron los ensayos cambiando el bucle de carga de etanol, el cual define el volumen de elución. Se ha probado con volúmenes entre 20 y 60 μl .

Aunque en la figura 8 parece que el mayor factor de preconcentración se obtendría con el reactor de 200 cm, se ha decidido descartar el uso de este reactor por varias razones. La primera de ellas es que deberíamos aumentar la duración de la etapa de elución de 40 a 60 s y de la etapa de vaciado de 20 a 60 s, en total supondría 1 minuto más por réplica. Además se produce una elevada variabilidad entre las replicas; quizás este asociada a la forma de los picos bastante ruidosos (Figura 9).

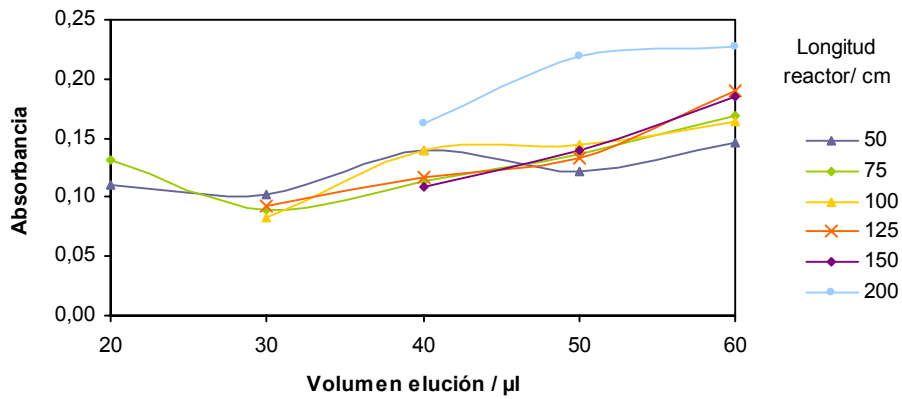


Figura 8. Relación entre la longitud del reactor anudado y volumen de elución para la determinación selectiva de Cr(VI) en agua de mar mediante FI-ETAAS.

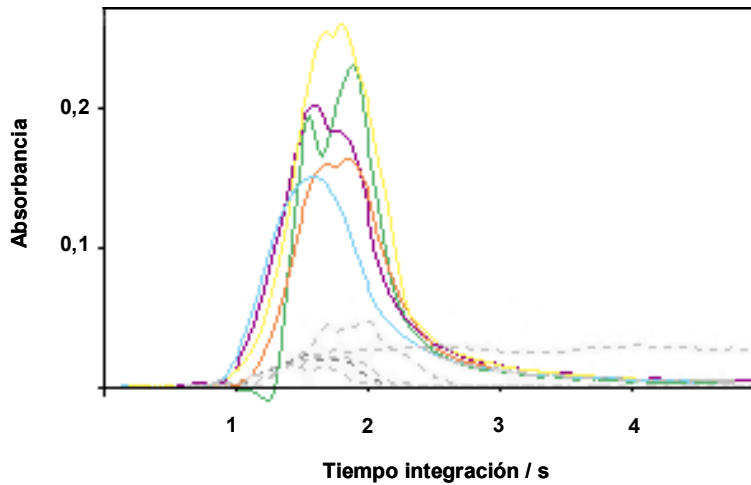


Figura 9. Perfiles de absorbancia de Cr(VI) empleando el reactor de 200 cm.

A pesar de que los valores de absorbancia indiquen mayor eficiencia en la elución con 60 µl para todos los reactores (Figura 8) se ha descartado también debido a la elevada variabilidad de los resultados. El flujo de aire que impulsa el segmento de

etanol parece no ser suficiente para llevar este volumen de etanol sin fragmentación hasta el extremo del inyector. Entonces, el volumen inyectado no es reproducible y, de ahí, la fluctuación en los valores de absorbancia.

Las mejores condiciones se dan con los reactores de 100 y 125 cm y los volúmenes de etanol de 40 ó 50 μl . Se han repetido los ensayos combinando estos valores para asegurarnos de una elección correcta del volumen de elución y de la longitud del reactor anudado. De este segundo estudio se puede concluir que las mejores condiciones se dan con el reactor anudado de 100 cm y un volumen de elución de 40 μl .

1.2.4 Características analíticas

En primer lugar se han comparado los distintos modos de calibración. Una vez seleccionado el modo de calibración más adecuado se han estudiado los siguientes parámetros: sensibilidad, precisión, exactitud, factor de preconcentración, eficacia de la absorción. Y finalmente se ha realizado un estudio de interferencias.

1.2.4.1 Rectas de calibrado y adición estándar

Para obtener la recta de calibrado acuoso se prepararon varias disoluciones patrón con diferentes concentraciones entre 0 y 0,2 $\mu\text{g l}^{-1}$ Cr(VI). Dado que el agua de mar presenta un matriz compleja se analizaron otros patrones con las mismas concentraciones de Cr(VI) pero preparados en agua de mar sintética, con el fin de realizar la calibración en condiciones similares a las de la muestra. Otra forma de calibración en condiciones próximas a la muestra es empleando el método de adición estándar. Para ello se añade un volumen fijo de una muestra a cada uno de los patrones con la misma concentración de Cr(VI) que para las rectas anteriores.

Las rectas obtenidas para el calibrado acuoso y el calibrado con agua de mar sintética y adición estándar se representan en la figura 10. Claramente, se puede comprobar que las rectas de calibrado acuoso y de calibrado con agua de mar sintética no son paralelas, lo cual significa que existe efecto matriz. Comparando las 3 pendientes empleado un test estadístico, *t-Student*, se ha encontrado que existen diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% entre las rectas de calibrado acuoso, de calibrado con agua de mar sintética y la de adición estándar. Por lo tanto, se debe emplear esta última recta, la adición estándar para el análisis de las muestras de agua de mar.

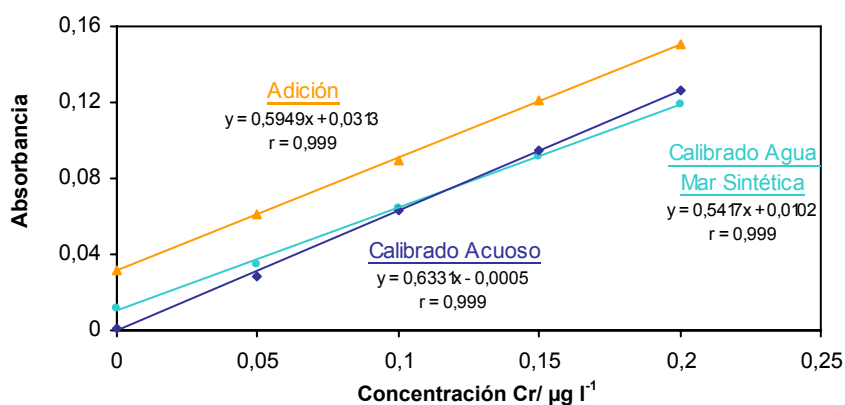


Figura 10. Rectas de calibración para la determinación selectiva de Cr(VI) en agua de mar mediante FI-ETAAS. Tiempo de preconcentración 2 min.

Este modo de calibración resulta bastante laborioso, habría que diluir las muestras igual que la dilución utilizada para la preparación de las patrones con las que se calcula la recta de adición estándar. En este caso, 50 ml de muestra fueron llevados hasta 100 ml de volumen final. A parte del tiempo que requeriría este modo de calibración tiene otros inconvenientes como: el riesgo de contaminación y los posibles errores asociados a la manipulación de la muestra. Y todavía lo que es más importante, la contradicción que se supone diluir la muestra para analizarla con un método de preconcentración. Una forma de solucionar esta incongruencia podría ser reducir el tiempo de preconcentración de 2 min a 1 min; así,

probablemente disminuiría la sensibilidad y el efecto matriz. Entonces minimizando el efecto matriz se podría evitar la adición estándar como modo de calibración.

Para comprobar esta hipótesis se ha repetido el estudio de la comparación de las rectas de calibración pero trabajando con 1 min de preconcentración. Se prepararon de nuevo las disoluciones patrón correspondientes al calibrado acuoso, al calibrado con agua de mar sintética y a la adición estándar. Además se prepararon otras disoluciones para la adición estándar dopándolas con $1 \mu\text{g l}^{-1}$ Cr(III), con el fin de verificar la selectividad del método. En la preparación de las disoluciones para las rectas de adición se han tomado 45 ml de una muestra real de agua de mar y se ha llevado hasta un volumen final de 50 ml.

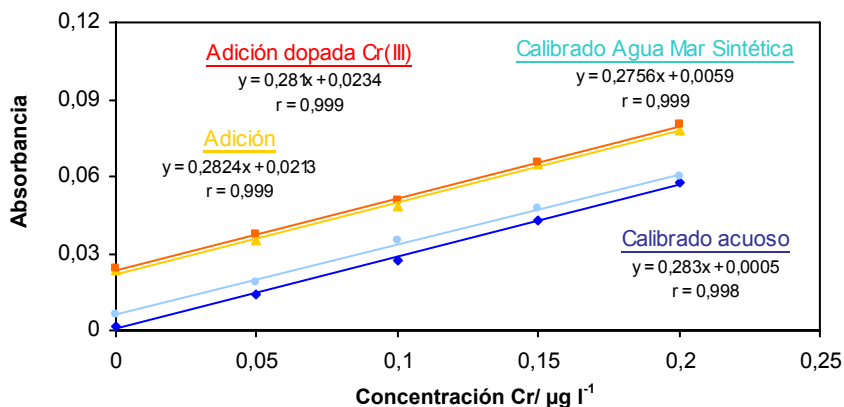


Figura 11. Rectas de calibración para la determinación selectiva de Cr(VI) en agua de mar mediante FI-ETAAS. Tiempo de preconcentración 1 min.

En la figura 11 se representan las rectas obtenidas para cada modo de calibración. Los valores de las pendientes son muy similares por lo que parece que se confirma la hipótesis de la minimización del efecto matriz al disminuir el tiempo de preconcentración. Para cerciorarnos se han comparado las pendientes de las rectas mediante un test estadístico, *t-Student*. Los resultados de este test indican con un nivel de confianza de 95% que no existen diferencias significativas entre las pendientes. Esto implica que cualquiera de las rectas de calibración es válida

para la cuantificación de Cr(VI) en agua de mar usando reactores anudados para su preconcentración. Se ha elegido la recta de calibrado con agua de mar sintética ya que resulta igual de práctica que la calibración con patrones acuosos pero permite trabajar en las condiciones más similares a la muestra.

De momento, se ha modificado la duración de la etapa de preconcentración a 1 min; aunque esto implique una disminución del factor de preconcentración. El método parece lo suficientemente sensible dada la concentración de las disoluciones empleadas para la calibración. Si en el estudio de la sensibilidad que se realizará a continuación se concluye que no es cierto, deberíamos replantearnos la reducción del tiempo de preconcentración.

Tabla 3. Comprobación de la selectividad en la determinación selectiva de Cr(VI) en agua de mar mediante FI-ETAAS

Concentración / $\mu\text{g l}^{-1}$	Absorbancia	Concentración calculada / $\mu\text{g l}^{-1}$	Recuperación / %
0	0,0240	---	---
0,05	0,0372	0,048	96,0
0,10	0,0510	0,098	98,0
0,15	0,0651	0,149	99,3
0,20	0,0803	0,204	102,0
		Media	98,8
		σ	2,5
Recta calibrado Agua Mar Sintética		$y = 0,2756x + 0,0059$	

Una manera de comprobar la selectividad del método consiste en calcular el porcentaje de recuperación analítica para una muestra dopada con Cr(III), especie que se desea eliminar antes de la determinación de Cr(VI). Se han analizado varias disoluciones dopadas con $1 \mu\text{g l}^{-1}$ Cr(III) y variando la concentración entre 0 y $0,2 \mu\text{g l}^{-1}$ Cr(VI); es decir, las disoluciones empleadas para la recta de adición dopada. A partir de los valores obtenidos (Tabla 3) y mediante la recta de

calibración con agua de mar sintética se ha calculado la recuperación analítica a diferentes niveles de concentración de Cr(VI). La recuperación analítica media, $98,8 \pm 2,5 \%$, indica que el método es selectivo, es decir, la presencia de Cr(III) no interfiere en la medida de Cr(VI).

1.2.4.2 Sensibilidad

La sensibilidad de un método se expresa mediante los límites de detección y cuantificación, LOD y LOQ, respectivamente. Para el cálculo de estos parámetros realizamos 11 medidas consecutivas del blanco. El promedio de la absorbancia para el blanco es de 0,0026, con una desviación estándar de 0,0006. Aplicando las ecuaciones detalladas en el apartado 1.2.6.2 del capítulo 2, se ha obtenido 7 ng l^{-1} de Cr(VI) y 23 ng l^{-1} de Cr(VI) para el LOD y LOQ, respectivamente.

Se logra la disminución del LOD a menos de la mitad, en comparación con uno de las primeras aplicaciones de un sistema de preconcentración “on-line” en una columna empaquetada acoplado a un equipo ETAAS¹ cuyo el LOD es 16 ng l^{-1} de Cr(VI). Como cabría de esperar, el límite de detección obtenido es semejante al de otros métodos similares encontrados en la bibliografía basados en la preconcentración en reactores anudados del complejo Cr-APDC: $8,8 \text{ ng l}^{-1}$ de Cr(VI)², $4,2 \text{ ng l}^{-1}$ de Cr(VI)³, y $3,3 \text{ ng l}^{-1}$ de Cr(VI)⁴.

Cabe resaltar la mejora en la sensibilidad obtenida con este método en comparación al método desarrollado inicialmente de determinación selectiva de Cr(VI) mediante la formación del quelato volátil Cr(TFA)₃ en agua de mar cuyos LOD y LOQ son $0,55 \mu\text{g l}^{-1}$ y $1,85 \mu\text{g l}^{-1}$ respectivamente.

También se ha calculado la masa característica analizando una serie de disoluciones de agua de mar sintética dopada a diferentes niveles de Cr(VI). Los valores de absorbancia obtenidos así como la masa característica para cada una de estas disoluciones se resumen en la tabla 4. La masa característica media, 0,7

$\pm 0,1$ pg, resultante para este método es aproximadamente 10 veces menor a la resultante para el primer método propuesto $7,3 \pm 0,5$ pg. Esto confirma la importante mejora en la sensibilidad, con lo cual se cumple el objetivo de desarrollar un método más sensible para la determinación de Cr en las muestras recogidas en la Ría de Arousa.

Tabla 4. Cálculo de la masa característica para la determinación selectiva de Cr(VI) en agua de mar mediante FI-ETAAS.

Concentración / $\mu\text{g l}^{-1}$	Absorbancia	Masa característica / pg
0	0,0059	
0,05	0,0186	0,7
0,10	0,0348	0,6
0,15	0,0477	0,6
0,20	0,0603	0,7
	Media	0,7
	σ	0,1

Se confirma que el método es muy sensible a pesar de trabajar por debajo del tiempo de preconcentración óptimo. Por tanto, se ha decidido trabajar con 1 min de preconcentración que además de evitar el método de calibración con adición estándar y se reduce el consumo de muestra y reactivos.

1.2.4.3 Precisión

Únicamente se ha calculado la repetibilidad del método (porque la muestra no ha sido pretratada) como el coeficiente de variación de 11 medidas consecutivas de una muestra dopada con $0,2 \mu\text{g l}^{-1}$ Cr(VI).

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 5. Al igual que en el caso del As, el coeficiente de variación, aunque aceptable, es ligeramente elevado, 4,4%.

Como se ha explicado anteriormente esto es debido a la complejidad de proceso y por tratarse de una técnica de inyección en flujo. No obstante, el método se puede considerar preciso.

Tabla 5. Repetibilidad para la determinación selectiva de Cr(VI) en agua de mar mediante FI-ETAAS.

Absorbancia					
0,0756	0,0714	0,0681	0,0708	Media	0,0734
0,0775	0,0756	0,0744	0,0688	σ	0,003
0,076	0,0763	0,0724		% CV	4,4

1.2.4.4 Exactitud

El estudio de la exactitud se ha realizado solamente mediante el cálculo de la recuperación analítica, por que no se dispone de un material de referencia de agua de mar que certifique la concentración de Cr(VI).

Tabla 6. Cálculo de la recuperación analítica para la determinación selectiva de Cr(VI) en agua de mar mediante FI-ETAAS.

Concentración / $\mu\text{g l}^{-1}$	Absorbancia	Concentración calculada / $\mu\text{g l}^{-1}$	Recuperación / %
0	0,0492	----	----
0,05	0,0699	0,050	100,0
0,10	0,0894	0,097	97,0
0,15	0,1106	0,149	99,3
0,20	0,1326	0,202	101,0
		Media	99,3
		σ	1,70
Recta calibrado Agua Mar Sintética $y = 0,413x + 0,0066$			

Se toman varias alícuotas de 45 ml de una muestra, a las cuales se le añade la cantidad necesaria de un patrón de $100 \mu\text{g l}^{-1}$ Cr(VI) para que las concentraciones resultantes sean 0,05, 0,1, 0,15 y 0,2 $\mu\text{g l}^{-1}$ Cr(VI), teniendo en cuenta que el volumen final será de 50 ml. La relación entre la concentración calculada y la concentración dopada nos da el porcentaje de recuperación analítica para cada uno de los niveles de concentración (Tabla 6). El valor obtenido para la recuperación media, $99,4 \pm 1,6 \%$, es aceptable.

1.2.4.5 Factor de preconcentración y eficacia de adsorción

La estimación del factor de preconcentración del método desarrollado se obtiene de la comparación de la pendientes de las rectas de calibrado sin y con preconcentración. En primer lugar, se ha realizado la calibración directamente en la cámara de grafito inyectando el mismo volumen de una disolución de etanol dopado a distintos niveles entre 0 y $10 \mu\text{g l}^{-1}$ Cr(VI); obteniendo de este modo la recta de calibrado sin preconcentración. En segundo lugar, se ha puesto en marcha el sistema FI-ETAAS para el análisis de las disoluciones que nos darán la recta de calibrado con preconcentración.

Las ecuaciones de las rectas de calibrado obtenidas son las siguientes:

Directo.....	$y = 0,0157 x + 0,0036$	$r = 0,998$
Con preconcentración.....	$y = 0,4850 x + 0,0045$	$r = 0,999$

El cociente entre la pendiente del calibrado con preconcentración y la pendiente del calibrado sin preconcentración nos da el factor de preconcentración, siendo este caso es 31.

Comparando este valor con el factor de preconcentración teórico se obtiene una estimación de la eficacia de adsorción del reactor anudado. Dado que el caudal de muestra es 5 ml min^{-1} , y se bombea durante 1 min, el volumen de muestra consumido es de 5 ml. El complejo Cr-APDC retenido en las paredes del reactor

anudado se eluye con 40 μl de etanol absoluto. Considerando esta relación de volúmenes el factor de preconcentración teórico debería ser 125 y en este caso el factor de preconcentración calculado es de 31, por lo tanto la eficacia de la adsorción es 24,8%.

1.2.4.6 Interferencias

Un ion se considera interferente cuando provoca una diferencia de $\pm 10\%$ en la concentración del elemento a determinar respecto a la concentración en ausencia de este ion. Se han tomado como posibles interferencias aquellos iones que tienen cierta afinidad por el APDC y que pudieran competir con en Cr(VI) en la formación del quelato Cr-APDC. Basándonos en una tabla de composición de agua de mar⁵ se han estudiado los siguientes elementos: Mo, Ni, Zn, Fe, As, V, Al, Se, Cu, Sn, Mn, Co, Sb, Ag, Hg, Cd, Pb, Ga y Bi para realizar el estudio de interferencias. Se ha incluido el Cr(III) en el estudio de interferencias con el fin de comprobar la eficacia de la separación y descartar un posible cambio en la especiación.

Se han preparado distintas disoluciones de agua de mar sintética dopadas con 0,1 $\mu\text{g l}^{-1}$ Cr(VI) y con cada uno de estos elementos por separado; partiendo de la concentración habitual en agua de mar especificada en dicha tabla e incrementando la concentración. Los porcentajes de recuperación analítica obtenidos para cada uno de los casos se resumen en la tabla 7. Los elementos que producen interferencias en son: Mo(VI) a 1000 $\mu\text{g l}^{-1}$; Ni, Zn y Al a 100 $\mu\text{g l}^{-1}$; Co a 1 y 10 $\mu\text{g l}^{-1}$; Sb a 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ y Bi a 0,1 y 1 $\mu\text{g l}^{-1}$. En todos los casos, la interferencia aparece a concentraciones por encima de la habitual en agua de mar: Mo y Al 100 veces; Sb 30 veces; Zn 20 veces y Ni 15 veces. Cabe destacar los casos del Co y el Bi que producen una variación sustancial de la concentración del analito para concentraciones 2,5 y 5 veces a su concentración habitual en agua de mar.

Tabla 7. Efecto de los iones potencialmente interferentes en la determinación selectiva de $0,1 \mu\text{g l}^{-1}$ Cr(VI) mediante FI-ETAAS.

Ion	SW*/ $\mu\text{g l}^{-1}$	Conc./ $\mu\text{g l}^{-1}$	Recup./ %	Ion	SW*/ $\mu\text{g l}^{-1}$	Conc./ $\mu\text{g l}^{-1}$	Recup./ %
Mo(VI)	10	10	100,1	Mn(II)	0,40	0,4	100,6
		100	106,0			1	93,5
		1000	123,4			10	96,9
Ni(II)	6,60	7	97,2	Co(II)	0,39	0,4	97,6
		10	102,8			1	78,6
		100	120,9			10	81,6
Zn(II)	5,00	5	98,92	Sb(III)	0,33	0,4	99,6
		10	99,07			1	97,7
		100	93,77			10	72,7
Fe(II)	3,40	4	96,1	Ag(I)	0,28	0,3	105,0
		10	96,5			1	106,6
		100	101,0			10	105,1
As(III)	2,6	3	103,9	Cr(III)	0,20	0,2	94,1
		10	107,6			1	105,5
		100	103,3			10	117,2
V(V)	1,90	2	102,1	Hg(II)	0,15	0,2	100,6
		10	100,6			1	99,0
		100	98,3			10	95,5
Al(III)	1,00	1	94,1	Cd(II)	0,11	0,2	104,2
		10	93,5			1	105,5
		100	69,0			10	100,5
Se(IV)	0,90	1	96,7	Pb(II)	0,03	0,03	100,8
		10	100,5			0,1	99,6
		100	105,6			1	107,7
Cu(II)	0,90	1	98,6	Ga(III)	0,03	0,03	98,5
		10	100,7			0,1	93,9
		100	93,8			1	92,8
Sn(II)	0,80	0,8	105,2	Bi(III)	0,02	0,02	95,2
		2	94,3			0,1	81,1
		10	91,7			1	88,1

*SW Concentración total del elemento habitual en agua de mar tomadas de Turekian⁵

Además se ha confirmado la eficacia de la separación ya que el Cr(III) produce interferencias a $10 \mu\text{g l}^{-1}$, es decir, 50 veces mayor a la concentración habitual de Cr total en agua de mar. Dado que en agua de mar la especie predominante es Cr(VI), existen pocas probabilidades de que esto suceda.

1.2.5 Método propuesto

En la tabla 8 se detalla el programa del sistema FI empleado para la determinación selectiva de Cr(VI) en agua de mar mediante un sistema FI-ETAAS usando reactores anudados y la formación del quelato con APDC para la preconcentración.

El tiempo que tarda el tratamiento de la muestra mediante el sistema de inyección en flujo es de 2 min y 18 segundos. Al finalizar la etapa de elución se pone en funcionamiento el programa de la cámara de grafito para la detección del analito.

Tabla 8. Programa del FIAS-400 para la determinación selectiva de As(III) mediante un sistema FI-ETAAS en agua de mar.

Etapa	Tiempo / s	Bomba 1 / rpm	Bomba 2 / rpm	Válvula Inyección		Válvula selección
				Carga	Inyección	
1. Carga Etanol	3	0	35	<input checked="" type="checkbox"/>		1
2. Elución	45	0	20		<input checked="" type="checkbox"/>	1
3. Preconcentración	60	60	0		<input checked="" type="checkbox"/>	2
4. Lavado	10	60	0		<input checked="" type="checkbox"/>	3
5. Vaciado con aire	20	0	60		<input checked="" type="checkbox"/>	1

El programa de temperatura de la cámara de grafito optimizado para la determinación de Cr(VI) eluido con 40 μ l de etanol se resume en la tabla 2. Dado que el tiempo necesario para la detección, 1 min y 55 s, es menor que la suma de las etapas 3, 4 y 5 del programa del FIAS-400, el tiempo total de análisis por réplica equivale a la duración del pretratamiento de la muestra, 2 min y 18 s.

Las concentraciones optimizadas de cada uno de los reactivos utilizados, así como el consumo de cada uno de ellos se resumen en la tabla 9.

Tabla 9. Concentraciones optimizadas, caudales y consumo de los reactivos usados en la determinación selectiva de As(III) mediante un sistema FI-ETAAS en agua de mar.

Reactivo	Concentración	Caudal / ml min ⁻¹	Consumo / ml
Muestra	-----	5	5
HCl	0,05 M	5	5
APDC	0,05 % (m/v)	1,5	1,5
Disol. Lavado	APDC 0,01% (m/v) HNO ₃ 0,02% (v/v)	3	0,25
Aire	-----	1 Elución 3 Vaciado	----
Etanol	Absoluto	----	40 µl

1.3 APLICACIÓN

Este método propuesto para la determinación selectiva de Cr(VI) en agua de mar mediante FI-ETAAS, se ha utilizado para realizar un estudio de la distribución de Cr en la Ría da Arousa. Posteriormente se dedica un capítulo al estudio del contenido de As y Cr en la Ría de Arousa donde se expondrán los resultados obtenidos.

2 Determinación de Cr total en muestras de agua de mar mediante FI-ETAAS

2.1 INTRODUCCIÓN

Una vez optimizado un método lo suficientemente sensible para la determinación de Cr(VI) en muestras de agua de mar mediante un sistema de inyección en flujo, procederemos a su adaptación para la determinación de Cr total, para la cual es necesaria la oxidación del Cr(III).

2.1.1 Preoxidación

El APDC reacciona selectivamente con Cr(VI), entonces para la cuantificación del Cr total debe oxidarse todo el Cr(III) presente en la muestra antes de introducir el APDC. Varios reactivos se han empleado en trabajos anteriores para la oxidación de Cr(III) a Cr(VI) entre los que destacan: Ce(IV), $S_2O_8^{2-}$, $KMnO_4$, H_2O_2 y KIO_4 .

2.1.1.1 Ce(IV)

El Ce(IV) ha sido propuesto por Andrade et al.⁶ para la detección espectrofotométrica del complejo que forma selectivamente el Cr(VI) con la 1,5-difenilcarbazida (DPC) mediante un sistema "on-line". El reductor $Ce(SO_4)_2$ disuelto en 0,07M se mezcla con la muestra en un reactor sumergido en un baño de agua a 45°C para favorecer la reacción de oxidación. Se ha comprobado una pérdida de sensibilidad para concentraciones elevadas de H_2SO_4 , por tanto se emplea la mínima cantidad de ácido necesaria para la disolución del $Ce(SO_4)_2$ y prevenir la hidrólisis del Ce(IV).

En este mismo trabajo se ha estudiado otros posibles oxidantes como KMnO_4 y $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8/\text{Ag}^+$. El permanganato se ha descartado porque absorbe radiación a una longitud de onda próxima a la del complejo. No se recomienda el uso del otro oxidante, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ catalizado por Ag^+ , por falta de reproducibilidad debida a la formación de gran cantidad de burbujas a temperaturas bajas. Estas burbujas probablemente sean originadas por la descomposición de $\text{S}_2\text{O}_8^{-2}$.

Luo et al.⁷ emplea otro compuesto de cerio, $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{SO}_4)_3$, para el pretratamiento de la muestra. La oxidación de Cr(III) se realiza calentando la mezcla de la muestra con Ce(IV) durante 5 min a 45°C , luego se deja enfriar antes de su determinación mediante el método espectrofotométrico propuesto en dicho trabajo.

2.1.1.2 Peroxodisulfato, $\text{S}_2\text{O}_8^{-2}$

Sperling et al.¹ propone el $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ catalizado por Ag^+ en un método de especiación de Cr mediante la separación y preconcentración “on-line” de Cr(VI) por complejación con dietilditiocarbamato sódico (NaDDC) en una columna C_{18} y su detección por ETAAS. Basándose en trabajos anteriores descarta la utilización de Ce(IV) por problemas de blancos y KMnO_4 por no ser suficiente eficaz para concentraciones bajas de Cr. A pesar de que la determinación de Cr(VI) se realiza mediante un sistema FI, la oxidación de la muestra se lleva a cabo con anterioridad calentando la muestra junto a la disolución de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8/\text{AgNO}_3$ durante 25 min a 105°C , para garantizar la eficacia de la oxidación y la descomposición del exceso de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$.

En otro trabajo publicado por Xue et al.⁸ también se realiza la oxidación de la muestra con la mezcla $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8/\text{AgNO}_3$ antes de la separación de Cr(VI) con la amina polisacarida, (1,4)-2-amino-2-desoxi- β -D-glucosamina y la determinación en ETAAS.

La sal amónica del peroxodisulfato, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, se ha empleado también como oxidante para la especiación de Cr en agua de mar mediante ETAAS^{9, 10}. La oxidación de Cr(III) se logra calentando la muestra acidificada a ebullición durante 15-20 min junto el $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$.

2.1.1.3 KMnO_4

A pesar que en otros trabajos se ha descartado el permanganato potásico como oxidante, Gilbert et al.¹¹ y Wai et al.¹² han obtenido resultados satisfactorios para la especiación de Cr en agua de mar mediante AAS por complejación con APDC y NaDDC, respectivamente.

2.1.1.4 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{NaOH}$

Andersen¹³ ha propuesto un sistema de inyección en flujo para la determinación espectrofotométrica de Cr similar al De Andrade et al.^{6, 14}, descrito anteriormente. Sin embargo, en este nuevo trabajo se emplea H_2O_2 en medio básico como oxidante en lugar del Ce(IV) con la ventaja de que no es necesario calentar para acelerar la oxidación. Con el fin de evitar la formación de burbujas debido a la lenta descomposición del H_2O_2 , se le añade 0,1M NaOH.

2.1.1.5 KIO_4

En un método publicado¹⁵ sobre la especiación de Cr acoplado un sistema a un detector de fluorescencia se ha comparado H_2O_2 y KIO_4 como oxidantes. Los resultados obtenidos son significativamente mejores con $1 \cdot 10^{-4}$ M KIO_4 y 0,01M NaOH durante 40 s a 25°C.

2.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.2.1 Equipamiento

2.2.1.1 Aparatos

Las medidas se han realizado usando un espectrómetro Perkin-Elmer Model 4100ZL equipado con una cámara de grafito de calentamiento transversal (THGA) y el automuestreador AS 71. Se han utilizado tubos de grafito pirolítico con plataforma L'vov. Este equipo además dispone de un corrector de fondo Zeeman. Se ha usado una lámpara de cátodo hueco trabajando a 12 mA, la cual proporciona una longitud de onda de 357,9 nm con un ancho de banda espectral de 0,7 nm. Para la evaluación de los resultados se ha empleado la absorbancia integrada durante 5 segundos.

El espectrometro se ha acoplado al sistema de inyección en flujo PerkinElmer FIAS-400 equipado con 2 bombas peristálticas controladas individualmente y una válvula de inyección estándar de 5 vías. Ambos equipos se controlan desde un único ordenador con el software AAWinLab 4.01, funcionando en modo "FIAS-Furnace". Además se ha empleado dos válvulas Rheodyne, una de selección con 6 entradas y 1 salida y otra de conmutación de 6 posiciones. Para impulsar la muestra, los reactivos, el eluyente y el aire se han usado tubos Tygon® (Perkin-Elmer). El bucle de carga se ha construido con un capilar de PTFE de 0,5 mm de diámetro interno variando la longitud (10, 15, 20, 25, o 30 cm) para obtener diferentes volúmenes de eluyente 20, 30, 40, 50, 60 µl etanol. Todas las conexiones están construidas con capilar de PTFE de 0,35 mm de diámetro interno. Varios reactores anudados de diferentes longitudes se han hecho con un capilar de PTFE de 0,5 mm de diámetro interno.

La oxidación Cr(III)/Cr(VI) se acelera con la ayuda de un microondas focalizado Prolabo MX-350, acoplado al sistema FIAS-400.

2.2.1.2 Reactivos

- Disolución patrón de Cr(III) de 1000 mg l⁻¹ Cr(NO₃)₃, (Merck, Alemania).
- Disolución patrón de Cr(VI) de 1000 mg l⁻¹ Cr preparada disolviendo K₂Cr₂O₇ (99%) (Aldrich Chemical, USA) y conservada a 4°C.
- Amonio pirrolinditiocarbamato (APDC) (Sigma, Alemania). A partir de esta sal se prepara un disolución stock del 1% (m/v) APDC y se conserva a 4°C.
- HCl 35% Hiperpur (Panreac, España).
- HNO₃ 69% Hiperpur (Panreac, España).
- Etanol absoluto para análisis (Panreac, España) destilado
- NaCl para análisis, (Merck, Alemania)
- MgSO₄·7H₂O, PA-ACS (Panreac, España)
- NaHCO₃ para análisis (Merck, España)
- Nitrato cérico amonico, Ce(NO₃)₆(NH₄)₂, para análisis (Probus, España)
- Persulfato potásico, K₂S₂O₈, para análisis (Merck, España)
- Nitrato de plata (Merck, España)
- Agua ultrapura. Resistividad 18 MΩ cm usando el sistema de purificación de agua Milli-Q® (Millipore).
- Argón N50 pureza: 99,999%, empleado como gas de purga y refrigeración en el atomizador.

2.2.1.3 Limpieza de material

Todo el material necesario, antes de ser utilizado, fue lavado cuidadosamente con agua y jabón, se enjuagan con agua Milli-Q® y se mantienen durante 48 horas en

una disolución de HNO_3 al 10%. Posteriormente se vuelve a enjuagar con agua Milli-Q® y se almacena seco y listo para su uso en un lugar libre de polvo.

2.2.2 Modificación del montaje FI

Para la determinación de Cr siguiendo el mismo procedimiento que en el método anteriormente optimizado para el Cr(VI) se ha modificado el sistema FI.

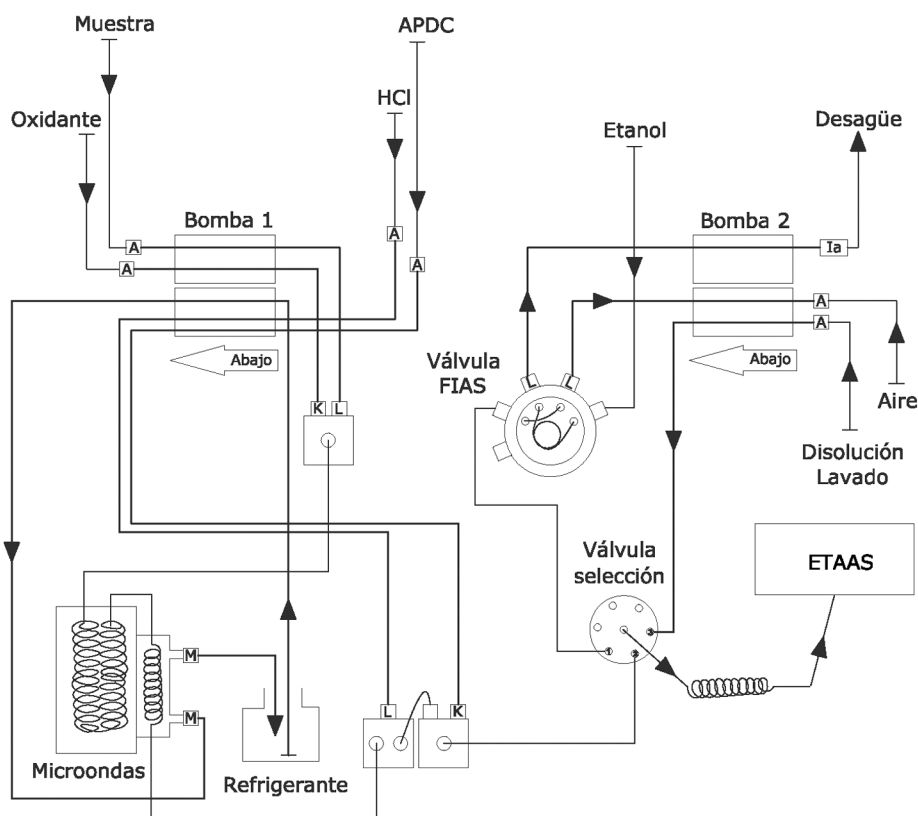


Figura 12. Esquema de montaje del sistema FI-ETAAS para la determinación de Cr total en agua de mar usando reactores anudados.

Se ha incluido una línea para bombear el oxidante, que confluirá junto a la muestra en una intersección situada a la entrada de un microondas focalizado Prolabo MX-350. De este modo se acelera la oxidación permitiendo el trabajo en modo continuo, automatizando el pretratamiento de la muestra. Una vez recorrido el reactor de mezcla situado en el interior del microondas focalizado la muestra pasa a través de un refrigerador donde se enfría antes de acidificarla y mezclarla con el APDC para continuar con los mismos pasos que en el método de determinación selectiva de Cr(VI) desarrollado anteriormente. En el siguiente esquema se representa el diseño del nuevo montaje (Figura 12).

2.2.3 Elección del oxidante. Ensayos preliminares

2.2.3.1 Ce(IV)

En un trabajo publicado por Andrade et al.⁶ en 1984, se propone una disolución de $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ preparado en H_2SO_4 para la oxidación en línea de Cr(III) en un método espectrofotométrico con difenilcarbazida para la determinación de Cr.

El APDC podría degradarse en un medio demasiado ácido por lo que en este caso se ha realizado un primer ensayo con $\text{Ce}(\text{NO}_3)_6(\text{NH}_4)_2$ ya que no necesita ácido para disolverse.

En primer lugar se ha analizado en modo continuo una disolución de agua de mar sintética dopada con $0,2 \mu\text{g l}^{-1}$ Cr(VI), obteniendo un valor de absorbancia de 0,1072, para tener una referencia de la sensibilidad.

A continuación se han preparado varias disoluciones de Ce(IV) variando la concentración entre 0 y $1 \mu\text{M}$. Se han medido los blancos para cada disolución de Ce(IV) y seguidamente se han repetido los análisis tomando como muestra una disolución de agua de mar sintética dopada con $0,2 \mu\text{g l}^{-1}$ Cr(III).

Restando los blancos a las señales producidas por la muestra, la eficacia de la oxidación es mínima; nula para concentraciones mayores a 0,5 μM (Figura 13).

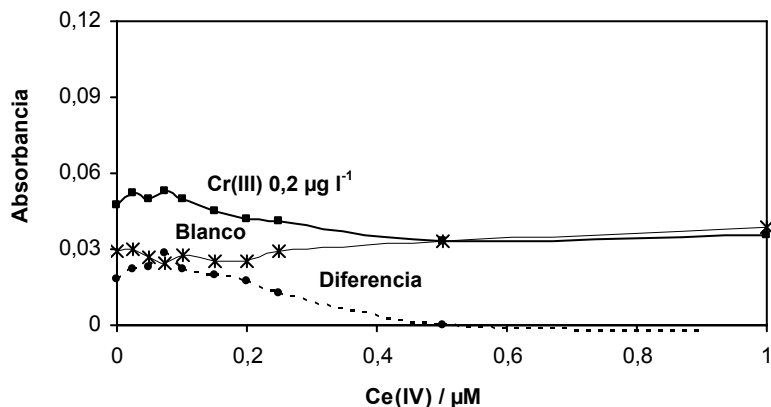


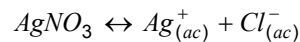
Figura 13. Ensayos preliminares con $\text{Ce}(\text{NO}_3)(\text{NH}_4)_2$ como oxidante en la determinación de Cr total en agua de mar mediante FI-ETAAS.

Con el fin de comprobar si el medio ácido favorece la reacción de oxidación se han preparado la disolución de 0,075 μM Ce(IV), con la cual obtienen los mejores resultados, en 0,1 M H_2SO_4 . Sin embargo, el blanco resultante es todavía mayor, elevadísimo. Por lo que se ha descartado el Ce(IV) como oxidante para el método que se está optimizado.

2.2.3.2 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8/\text{Ag NO}_3$

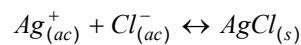
Otra posible disolución oxidante utilizada también en el mismo trabajo publicado por Andrade⁶ es 2,5% (m/v) $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ preparado en 2,5 $\cdot 10^{-3}$ % (m/v) AgNO_3 . El nitrato de plata se emplea como catalizador porque el persulfato sufre descomposición en medio ácido. El uso de este oxidante trabajando con muestras de agua de mar presenta un inconveniente, la posible formación del precipitado de AgCl por la reacción entre NaCl , compuesto mayoritario del agua de mar, y el AgNO_3 ¹⁶. Teóricamente, considerando el producto de solubilidad del AgCl y la

concentración de AgNO_3 empleada, la formación del complejo es favorable. El nitrato de plata añadido como catalizador nos da una concentración de Ag^+ de:



$$[\text{AgNO}_3] = [\text{Ag}^+] = 2,5 \cdot 10^{-3} \% \text{ (m/v)} = 1,47 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$$

Considerando el producto de solubilidad y la cantidad de Ag^+ añadida, el precipitado comenzará a formarse con una concentración de Cl^- de:



$$K_{ps} = [\text{Ag}^+] \cdot [\text{Cl}^-] = 1,72 \cdot 10^{-10}$$

$$[\text{Cl}^-] = K_{ps} / [\text{Ag}^+] \quad [\text{Cl}^-] = 1,17 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$$

En la preparación de agua de mar sintética se emplean 32 g de NaCl por litro. Teniendo en cuenta el peso molecular del cloruro sódico, entonces

$$[\text{Cl}^-] = 0,54 \text{ mol l}^{-1}$$

La cantidad de Cl^- en el agua de mar sintética es significativamente superior a la necesaria para formar precipitado.

No obstante, se ha realizado una prueba antes de poner en marcha el sistema FI-ETAAS mezclando una muestra de agua de mar con la disolución oxidante, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8/\text{AgNO}_3$. Después de un tiempo no se ha observado la formación de precipitado, simplemente una leve turbidez en el momento de la mezcla.

Entonces se ha decidido probar trabajando con el sistema de inyección en flujo con la misma disolución pero resulta una señal de blanco demasiado elevada. Para ello se ha diluido la disolución oxidante en un factor de 1:100; obteniendo, en este caso, el valor del blanco aceptable. Para confirmar que esta disminución no sea consecuencia de una disminución de la sensibilidad se ha analizado un patrón de $0,2 \mu\text{g l}^{-1} \text{ Cr(VI)}$. Como se sospechaba existe una pérdida de sensibilidad que no se debe a un deterioro del tubo de grafito. Chequeado el sistema en busca de la causa de la disminución de la absorbancia, se encontró que el problema está en

el reactor de mezcla situado en el interior de microondas focalizado. Parece que se ha pasivado probablemente debido al uso de AgNO_3 .

Se ha intentado regenerar el capilar de PTFE anudado que forma el reactor de mezcla, con HF concentrado durante 5 min en cada sentido a una velocidad de bombeo de 1 ml min^{-1} . Seguidamente se ha lavado durante varias horas con agua Milli-Q®, hasta que el pH a la salida del reactor de mezcla se mantiene a pH 7. Finalmente, se ha chequeado el sistema analizando un patrón acuoso de $0,2\ \mu\text{g l}^{-1}$ Cr(VI). El tratamiento con HF ha resultado efectivo, la señal de absorbancia correspondiente al patrón es similar a las obtenidas antes de utilizar el AgNO_3 .

Dado el problema de pasivado del reactor de mezcla provocado por la precipitación del AgCl , se ha descartado el uso de la mezcla oxidante $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8/\text{AgNO}_3$.

2.2.3.3 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ en medio ácido

El potencial redox de un compuesto depende del pH del medio. La acidificación aumenta el poder oxidante debido a la liberación de protones. Por lo que se ha decidido probar el efecto de la adición de $0,01\ \text{M H}_2\text{SO}_4$ ó $0,01\ \text{M HCl}$ a la disolución de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, sustituyendo al AgNO_3 como catalizador de la oxidación.

Se ha encontrado que con ambos ácidos se produce oxidación cuando empleando $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ al $0,2\%$ (m/v). Los valores de absorbancia obtenidos son muy similares: $0,0851$ para $0,01\ \text{M HCl}$ y $0,0849$ para $0,01\ \text{M H}_2\text{SO}_4$ para una disolución de agua de mar sintética dopada con $0,3\ \mu\text{g l}^{-1}$ Cr(III). Se ha elegido la mezcla $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8/\text{HCl}$ para continuar con la optimización del método por que ya conocemos la influencia del HCl sobre la formación del complejo Cr-APDC.

2.2.4 Efecto de la potencia del microondas. Ensayos preliminares

Una vez elegido el oxidante más adecuado y antes de optimizar las concentraciones de la disolución oxidante $K_2S_2O_8/HCl$ se han realizado unos ensayos previos para establecer la potencia máxima de trabajo. En el caso de la determinación del As total mediante FI-ETAAS se han encontrado problemas de reproducibilidad por formación de burbujas calentando al 30% de la potencia del microondas focalizado.

Este estudio se ha realizado con una disolución patrón de $0,3 \mu g l^{-1} Cr(VI)$ preparada con agua Milli-Q® y otra disolución patrón preparada en agua de mar sintética con la misma concentración de Cr(VI), con el fin de evitar la influencia de la eficacia de la oxidación sobre los resultados.

La potencia máxima de microondas focalizado Prolabo MX 350, es de 300 W, pero el software solo permite fijar la potencia entre un 20 y 40%, en incrementos de 5%. En primer lugar se han analizado ambos patrones sin encender el microondas para tener un valor de referencia.

Para garantizar que la temperatura en el interior del microondas correspondiese a la potencia seleccionada, se ha bombeado agua Milli-Q® por todas las líneas durante 10 min con el microondas encendido a la potencia fijada antes de realizar la medida. Después de estabilizar la temperatura en el interior del microondas se han analizado el patrón acuoso y seguidamente el patrón preparado en agua de mar sintética, repitiendo esta secuencia para el 20%, 25%, 30% y 40% de la potencia.

En el caso del patrón acuoso de Cr(VI) las señales se mantienen prácticamente constantes independientemente de la potencia. Por la contra para el patrón preparado en agua de mar sintética la señal sufre una disminución importante por encima del 25% de la potencia (Figura 14). Esto probablemente sea debido a la formación de burbujas que provocan un retroceso de la corriente durante los

primeros 15 ó 20 s de bombeo de la siguiente réplica. Entonces el volumen de muestra que fluye a través del reactor anudado durante la etapa de preconcentración (1min) es menor, lo cual justificaría la disminución de la señal para el patrón preparado en agua de mar sintética.

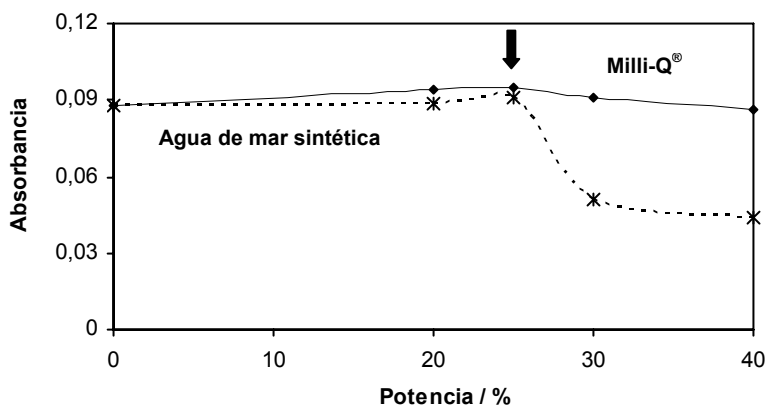


Figura 14. Ensayos preliminares de la potencia del microondas focalizado para la determinación de Cr total mediante FI-ETAAS.

Dados los resultados obtenidos en este ensayo preliminar, se ha seleccionado el 25% de la potencia como máximo. En algunos casos se han formado algunas burbujas en los últimos segundos del calentamiento por lo que se ha decidido ampliar la etapa de preconcentración 10 s con el microondas apagado para eliminar las burbujas formadas en el tramo final del reactor de mezcla colocado en el interior del microondas.

2.2.5 Optimización de la etapa de oxidación

Finalizados los ensayos preliminares continuaremos con la optimización de las concentraciones de la disolución oxidante de $K_2S_2O_8/HCl$ y el estudio de la influencia de la potencia del microondas sobre la eficiencia de la oxidación.

2.2.5.1 Efecto de la concentración $K_2S_2O_8/HCl$

En primer lugar, se ha analizado la señal de blanco producida a diferentes concentraciones de $K_2S_2O_8$, sin añadir HCl, con el fin de delimitar el rango de optimización. Y se ha repetido este ensayo con una disolución de agua de mar sintética sin dopar.

Tabla 10. Blancos producido por el $K_2S_2O_8$ en agua desionizada y en agua de mar sintética.

% $K_2S_2O_4$	Absorbancia	
	Milli-Q®	Agua Mar Sintética
0	0,0044	0,0080
0,1	0,0092	0,0273
0,2	0,0176	0,0365
0,3	0,0237	0,0546

Se observa un incremento de la absorbancia a medida que se aumenta la concentración de $K_2S_2O_8$ (Tabla 10). Este incremento se produce en mayor medida para el agua de mar sintética, posiblemente porque alguno de los reactivos empleados para la preparación de agua de mar sintética contiene trazas de Cr.

Por tanto, se ha decidido establecer como máximo 0,2% $K_2S_2O_8$ en la optimización de la concentración del oxidante; para lo cual se han preparado distintas disoluciones variando la concentración de $K_2S_2O_8$ entre 0 y 0,2% mientras se mantiene constante la concentración de ácido a 0; 0,005 y 0,01 M HCl.

Los resultados obtenidos para una disolución de agua de mar sintética dopada con $0,3 \mu g l^{-1}$ Cr(III) con cada una de las disoluciones oxidantes se representan en la figura. Al contrario de lo que cabría esperar, el HCl añadido no mejora la eficacia de la oxidación, ya que se obtienen valores de absorbancia más elevados en

ausencia de HCl. Existe la posibilidad de que se produjera una disminución en la sensibilidad del tubo de grafito, dado que la serie de experimentos sin añadir HCl se han analizado en primer lugar. Sin embargo, se ha repetido esta serie al finalizar los demás ensayos obteniendo valores de absorbancia similares. Por ello, se ha seleccionado la disolución de 0,15% (m/v) $K_2S_2O_8$ sin acidificar como la disolución oxidante idónea en este caso.

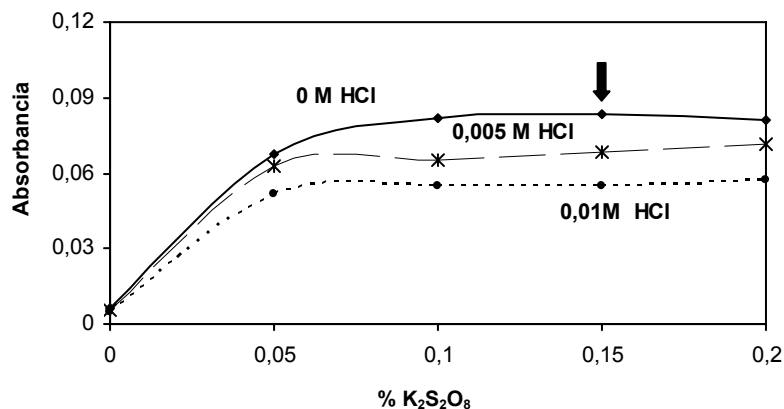


Figura 15. Optimización de la concentración de oxidante para la determinación de Cr total mediante FI-ETAAS.

La duración de la etapa de preconcentración se podría aumentar hasta 2 min sin que ello suponga un aumento del tiempo total de análisis, ya que la etapa de preconcentración ocurre simultáneamente a la etapa de detección en el equipo de ETAAS. Se ha comprobado si un incremento en el tiempo de la etapa de oxidación-preconcentración mejoraría la eficacia de la oxidación.

Para ello se han comparado los resultados obtenidos con una disolución de agua de mar sintética con $0,3 \mu\text{g l}^{-1}$ Cr(III) preconcentrando 1 min; y con una disolución de agua de mar sintética con $0,15 \mu\text{g l}^{-1}$ Cr(III) preconcentrando 2 min. La cantidad de analito que fluye a través del reactor anudado es la misma en ambos casos, entonces si la oxidación fuera más efectiva debería observarse un aumento en la señal de absorbancia preconcentrando 2 min.

Tabla 11. Influencia del tiempo de preconcentración sobre la eficacia de la oxidación de Cr(III) en la determinación de Cr total mediante FI-ETAAS.

Tiempo / s	60	120	
Cr(III) / $\mu\text{g l}^{-1}$	0,3	0,15	0,3
Absorbancia	0,0812	0,0469	0,0577
	0,0752	0,0493	0,0648
	0,0782	0,0532	0,0622
Media	0,0782	0,0489	0,0616
% CV	3,8	6,4	5,8

Sin embargo, los resultados obtenidos reflejan el efecto opuesto. Las señales obtenidas con 2 min de preconcentración son menores que para 1 min, incluso duplicando la cantidad de analito bombeada (Tabla 11). Además, trabajando con 2 min de preconcentración disminuye la reproducibilidad dando coeficientes de variabilidad significativamente mayores.

Ya que no se produce mejoría en la eficacia de la oxidación y aumenta la variabilidad al duplicar la duración de esta etapa, se ha decidido mantener el tiempo de la etapa de preconcentración en 1 min.

2.2.5.2 Efecto de la potencia de microondas focalizado

La reacción de oxidación se acelera calentando la mezcla de la muestra y la disolución oxidante de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$. En trabajos publicados anteriormente^{1, 6, 8} se emplea un baño de agua caliente, en el cual se sumergen la muestra que fluye a través de un reactor de mezcla. En este caso se ha sustituido el baño de agua por un microondas focalizado.

Como se ha visto en los ensayos preliminares la potencia del microondas no debe superar al 25% si se mantiene encendido durante 1 min. Después de haber optimizado la concentración de oxidante, se ha realizado un estudio más detallado del efecto de la potencia del microondas sobre la reacción de oxidación mediante el seguimiento de la absorbancia producida por una disolución patrón de $0,3 \mu\text{g l}^{-1}$ Cr(III) variando la potencia aplicada y el tiempo de calentamiento. En primer lugar, se ha analizado el patrón con el microondas apagado y a continuación siguiendo los siguientes pasos:

- ✓ Encendido 30 s al 20% y apagado los 40 s restantes.
- ✓ Encendido 60 s al 20% y apagado los 10 s restantes.

Se ha repetido la misma secuencia trabajando al 25% de la potencia. Y además para verificar los ensayos preliminares se ha calentado durante 60 s al 30% de la potencia.

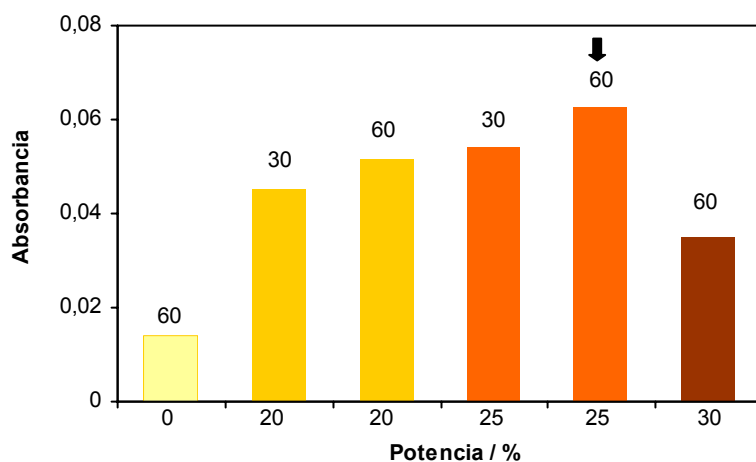


Figura 16. Optimización de la potencia del microondas y tiempo de calentamiento para la determinación de Cr total mediante FI-ETAAS.

Los resultados obtenidos (Figura 16) confirman que el calentamiento con microondas focalizado acelera la reacción de oxidación de Cr(III) en presencia de 0,15% (m/v) $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, ya que existe una mejora en la señales obtenidas cuando se

enciende el microondas respecto al ensayo realizado con el microondas apagado. Además se verifican los resultados obtenidos en los ensayos preliminares, por encima del 25% de potencia la absorbancia disminuye debido a la formación de burbujas.

Se ha elegido como condiciones óptimas de calentamiento, 60 s al 25% de la potencia, para las cuales se alcanza el máximo en absorbancia, como se puede ver en la figura 16.

Ya que la formación de burbujas nos impide aumentar la potencia del microondas, se ha planteado la posibilidad de aumentar el tiempo de permanencia de la muestra junto al oxidante en el interior de microondas focalizado. Para ello, se ha incluido una nueva etapa al final de la secuencia del sistema de inyección en flujo, en la cual las bombas y el microondas permanecen apagados. Y como existe un pequeño margen de tiempo hasta que se complete el programa temperaturas de la cámara de grafito, esto no supondría un incremento del tiempo total de análisis.

Se ha variado la duración de esta etapa de espera para ver como influye el tiempo transcurrido entre la mezcla de la muestra y la disolución oxidante y la posterior adición del APDC, sobre la eficacia de la oxidación (Figura 17), empleando una disolución de agua de mar sintética dopada con $0,3 \mu\text{g l}^{-1}$ Cr(III).

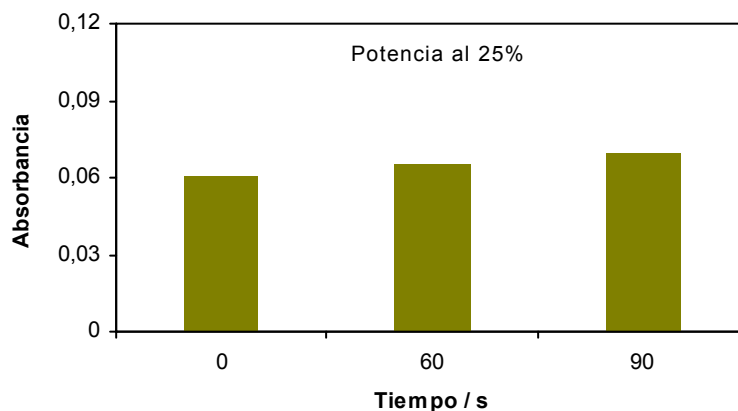


Figura 17. Efecto de la duración de la etapa de espera sobre la eficacia de la oxidación.

Claramente, se puede comprobar que la inclusión de esta etapa de espera no mejora la eficacia de oxidación, por tanto, se ha descartado la etapa de espera.

2.2.6 Características analíticas

Finalizada la optimización de los parámetros críticos de la oxidación “on línea” del Cr(III) a Cr(VI), procedemos a la caracterización del método propuesto. Para ello, se ha estudiado las rectas de calibrado y adición estándar, la sensibilidad, la precisión y la exactitud. Además se ha calculado el factor de preconcentración y la eficacia de la adsorción.

2.2.6.1 Rectas de calibrado y adición estándar

Con el fin de elegir el modo de calibración más adecuado para la determinación de Cr total en muestras de agua de mar, se han comparado las rectas de calibrado con patrones acuosos y patrones preparados en agua de mar sintética, así como las rectas de adición estándar y de adición estándar dopada con Cr(VI).

Se ha comenzado por el cálculo de la recta de calibrado con patrones acuosos, para lo cual se prepararon varias disoluciones variando la concentración entre 0 y $0,4 \mu\text{g l}^{-1}$ Cr(III). Las señales de absorbancia para todos los niveles de concentración dieron entorno a 0; repitiéndose los resultados después de descartar un problema de funcionamiento del sistema FI o de sensibilidad del equipo ETAAS, analizando una disolución de concentración conocida de Cr(VI). Probablemente, esto sea debido a que las condiciones de oxidación han sido optimizadas con agua de mar sintética y no son válidas para agua Milli-Q®. Se prepararon, entonces, las disoluciones patrón con agua de mar sintética variando la concentración entre 0 y $0,4 \mu\text{g l}^{-1}$ Cr(III), para el cálculo de la recta de calibración correspondiente. En este caso, los valores de absorbancia crecen a medida que se aumenta la concentración de Cr(III), es decir, la oxidación tiene lugar.

Continuando con el cálculo de la recta de adición estándar, se prepararon varias disoluciones tomando un volumen fijo de una muestra de agua de mar, 45 ml, a la cual se le añaden diferentes volúmenes de un patrón de $100 \mu\text{g l}^{-1}$ Cr(III), y se completan con agua de mar sintética hasta los 50 ml. Y finalmente, con el objetivo de comprobar la selectividad del método, se ha repetido la preparación de las disoluciones pero, en este caso, dopándolas con Cr(VI). Se ha probado con diferentes concentraciones de Cr(VI) en busca de un valor adecuado para el nivel 0 de adición. De esta pruebas se concluye que $0,05 \mu\text{g l}^{-1}$ Cr(VI) es la concentración con la que se pueden dopar las muestras sin que los valores del nivel 0 sean demasiado elevados evitando salirse del rango de linealidad.

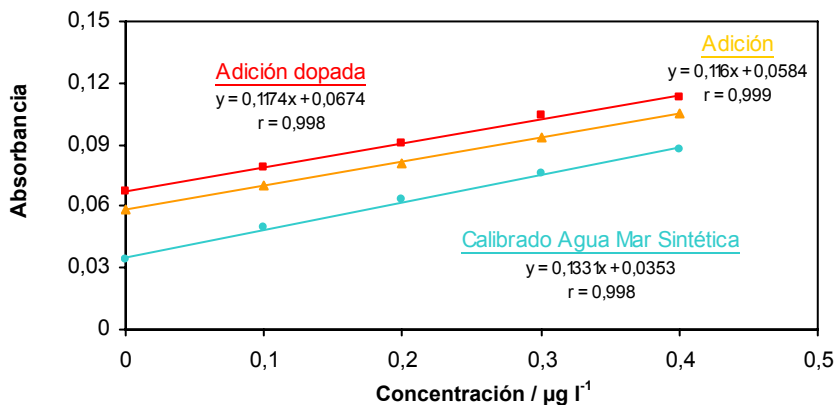


Figura 18. Rectas de calibración para la determinación de Cr total mediante FI-ETAAS.

En la figura 18 se representan las rectas de calibración obtenidas tal como se ha descrito anteriormente. A los resultados obtenidos se le ha aplicado un test estadístico para la comparación de las pendientes, *t-Student*. Estos ensayos se han repetido en sesiones de trabajo distintas y siempre se ha encontrado que existe diferencia significativa entre la recta de calibrado con patrones preparados en agua de mar sintética y la recta de adición estándar con un nivel de confianza de 95%. Por ello, para cuantificar la concentración de Cr total en las muestras de agua de mar se debe emplear la recta de adición estándar.

Para definir el rango de linealidad se ha ampliado el rango de concentraciones de las disoluciones patrón preparadas en agua de mar sintética hasta $0,8 \mu\text{g l}^{-1}$ Cr(III), concentración a la cual se obtiene un valor de absorbancia bastante elevado, ligeramente superior al máximo recomendado por el fabricante del equipo ETAAS (Figura 19).

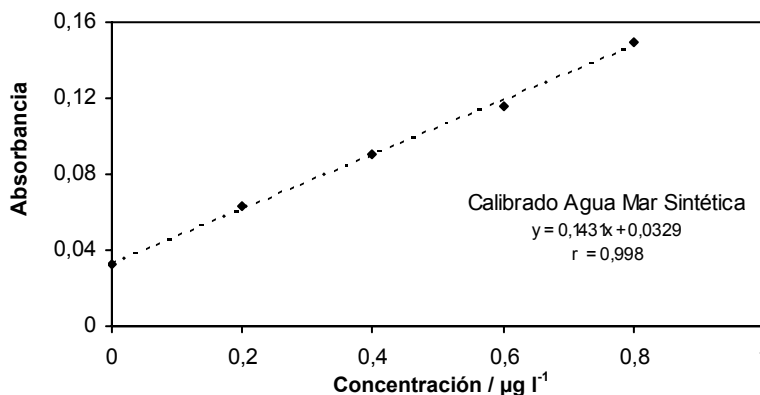


Figura 19. Rango de linealidad para la determinación de Cr total mediante FI-ETAAS.

La curva de calibración obtenida se ajusta perfectamente a una recta con un coeficiente de regresión más que aceptable, lo cual implica que el método presenta un comportamiento lineal entre 0 y $0,8 \mu\text{g l}^{-1}$.

2.2.6.2 Sensibilidad

La sensibilidad del método propuesto se ha calculado con la desviación estándar relativa de 11 medidas consecutivas del blanco, es decir, la señal correspondiente al agua de mar sintética y los demás reactivos empleados. Los valores obtenidos han sido: $0,04 \mu\text{g l}^{-1}$ y $0,14 \mu\text{g l}^{-1}$ para el LOD y el LOQ respectivamente.

Además se ha calculado la masa característica analizando una muestra dopada con diferentes niveles de concentración de Cr(III). La masa característica obtenida para este método fue $1,5 \pm 0,1 \text{ pg}$. En la tabla 12 se resumen los valores de

absorbancia obtenidos y la masa característica para cada uno de los niveles de concentración.

Tabla 12. Cálculo de la masa característica para la determinación de total mediante FI-ETAAS.

Concentración/ $\mu\text{g l}^{-1}$	Absorbancia	Masa característica/ pg
0	0,0670	
0,1	0,0791	1,5
0,2	0,0910	1,5
0,3	0,1043	1,4
0,4	0,1131	1,5
	Media	1,5
	σ	0,1

2.2.6.3 Precisión

Se ha estudiado la precisión del método mediante la repetibilidad realizando 11 inyecciones consecutivas de una muestra de agua dopada con $0,2 \mu\text{g l}^{-1}$ Cr(III) (Tabla 13). El coeficiente de variación obtenido fue 3,3 %. Este valor es aceptable, aunque ligeramente elevado debido a la variabilidad intrínseca a las técnicas de inyección en flujo.

Tabla 13. Repetibilidad para la determinación de Cr total mediante FI-ETAAS.

Absorbancia					
0,0487	0,0525	0,0492	0,0497	Media	0,0504
0,0508	0,0486	0,0537	0,0506	σ	0,002
0,0489	0,0516	0,0504		% CV	3,3

A pesar de ello, el método propuesto para la determinación de Cr total mediante FI-ETAAS en agua de mar usando reactores anudados es un método preciso.

2.2.6.4 Exactitud

La valoración de la exactitud del método no se ha podido realizar empleando el material de referencia certificado de agua de mar, NASS-4, porque este material está acidificado para su conservación. Las condiciones de oxidación no son adecuadas para el material de referencia certificado acidificado porque han sido optimizadas para agua de mar sintética, la cual tiene pH 8.

Tabla 14. Cálculo de la recuperación analítica para la determinación de Cr total en agua de mar mediante FI-ETAAS.

Concentración / $\mu\text{g l}^{-1}$	Absorbancia	Concentración calculada / $\mu\text{g l}^{-1}$	Recuperación / %
0	0,0669	---	---
0,1	0,0755	0,10	99,7
0,2	0,0843	0,20	100,8
0,3	0,0933	0,31	101,9
0,4	0,1022	0,41	102,3
		Media	101,2
		σ	1,2
Recta adición estándar $y = 0,0863x + 0,0399$			

Dada la imposibilidad de emplear el NASS-4, se ha evaluado la exactitud del método mediante la recuperación analítica. Para ello se prepararon varias disoluciones de una muestra dopada a diferentes niveles de concentración de Cr(III) y con $0,05 \mu\text{g l}^{-1}$ de Cr(VI). En la tabla 14 se resumen los valores obtenidos, dando un % recuperación analítica media de $101,2 \pm 1,2\%$.

2.2.6.5 Factor de preconcentración y eficacia de adsorción

El cálculo del factor de preconcentración según recomienda Fang¹⁷ se ha realizado mediante la comparación de las pendientes de las rectas de calibrado sin y con preconcentración. Para ello se han preparado varias disoluciones de etanol dopadas con diferentes concentraciones entre 0 y 10 µg l⁻¹ Cr(III) y se han analizado inyectándolas directamente en la cámara de grafito. A continuación se han preparado varias disoluciones de una muestra dopándolas a diferentes niveles de concentración entre 0y 0,8 µg l⁻¹ Cr(III) y se han medido con el método propuesto. Las ecuaciones de las rectas de calibración fueron:

Directo.....	y = 0,0070x +0,0045	r = 0,999
Con preconcentración.....	y = 0,0807 x +0,0420	r = 0,999

La relación entre pendiente nos da el factor de preconcentración, que en este caso es 12.

La eficacia de la adsorción se ha calculado comparando el factor de preconcentración obtenido con el teórico. En el método propuesto se consumen 5 ml de muestra que posteriormente se eluye con 40 µl de etanol. Considerando la relación de volúmenes, el factor de preconcentración teórico debería ser 125. Como el factor de enriquecimiento calculado es 12, se obtiene una eficacia de adsorción del 9,6%. Este valor es más bajo que al correspondiente al método que se ha tomado como referencia para la determinación selectiva de Cr(VI), 24,8%.

Al igual que ha sucedido con el método para la determinación de As total en agua de mar empleando la misma técnica, al realizar el cálculo de la eficacia de adsorción no se está teniendo en cuenta la etapa de oxidación previa a la preconcentración en el reactor anudado. Realmente este parámetro debería llamarse eficacia de adsorción y de preoxidación.

2.2.7 Método propuesto

El programa del equipo FIAS-400 empleado para la determinación selectiva de Cr total en agua de mar mediante un sistema FI-ETAAS usando reactores anudados se resume en la tabla 15.

Tabla 15. Programa del FIAS-400 para la determinación Cr total mediante un sistema FI-ETAAS en agua de mar.

Etapa	Tiempo / s	Bomba 1 / rpm	Bomba 2 / rpm	Válvula Inyección		Válvula selección
				Carga	Inyección	
1. Carga Etanol	3	0	35	<input checked="" type="checkbox"/>		1
2. Elución	45	0	20		<input checked="" type="checkbox"/>	1
3. Oxidación y Preconcentración	60	60	0		<input checked="" type="checkbox"/>	2
4. Apagar microondas	10	60	0		<input checked="" type="checkbox"/>	2
5. Lavado	10	60	0		<input checked="" type="checkbox"/>	3
6. Vaciado con aire	20	0	60		<input checked="" type="checkbox"/>	1

Al igual que para el método de determinación de Cr(VI) el tiempo total de análisis por réplica equivale a la duración del pretratamiento de la muestra, 2 min y 18 s, porque el programa de temperatura de la cámara de grafito termina antes de que finalice el programa del FIAS-400. El programa de temperaturas de la cámara de grafito es el mismo que para la determinación de Cr(VI) (Tabla 2). Dada la ampliación del montaje FI, con la inclusión del microondas focalizado se debe tenerse en cuenta que la primera medida de una muestra corresponde a la muestra anterior que ha quedado en el interior del microondas.

Las concentraciones optimizadas de cada uno de los reactivos utilizados, así como el consumo de cada uno de ellos se resumen en la tabla 16. En la etapa de

preoxidación se enciende el microondas focalizado durante 1 min al 25% de la potencia, aproximadamente 75 W.

Tabla 16. Concentraciones optimizadas, caudales y consumo de los reactivos usados en la determinación Cr total mediante un sistema FI-ETAAS en agua de mar.

Reactivo	Concentración	Caudal / ml min ⁻¹	Consumo / ml
Muestra	----	5	5
K ₂ S ₂ O ₈	0,15% (m/v)	3	3
HCl	0,05 M	5	5
APDC	0,05 % (m/v)	1,5	1,5
Disol. Lavado	APDC 0,01% (m/v) HNO ₃ 0,02% (v/v)	3	0,25
Aire	----	1 Elución 3 Vaciado	----
Etanol	Absoluto	---	40 µl

2.3 APLICACIÓN

El método adaptado para la determinación de Cr total en agua de mar mediante FI-ETAAS, se ha utilizado para realizar un estudio de la distribución de Cr en la Ría da Arousa. Posteriormente se dedica un capítulo a la especiación de As y Cr en esta ría, donde se expondrán los resultados obtenidos.

3 Bibliografía

- [1]. Sperling, M.; Yin, X.; Welz, B., Differential Determination of Chromium(VI) and Total Chromium in Natural Waters using Flow Injection On-line Separation and Preconcentration Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. *Analyst* **1992**, 117, 629-635.
- [2]. Som-Aum, W.; Liawruangrath, S.; Hansen, E. H., Flow injection on-line preconcentration of low levels of Cr(VI) with detection by ETAAS - Comparison of using an open tubular PTFE knotted reactor and a column reactor packed with PTFE beads. *Anal. Chim. Acta* **2002**, 463, (1), 99-109.
- [3]. Nielsen, S.; Hansen, E. H., Selective flow-injection quantification of ultra-trace amounts of Cr(VI) via on-line complexation and preconcentration with APDC followed by determination by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **1998**, 366, (1-3), 163-176.
- [4]. Nielsen, S.; Stürup, S.; Spliid, H.; Hansen, E. H., Selective Flow Injection Analysis of Ultratrace Amounts of Cr(VI), Preconcentration of it by Solvent Extration and Determination by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry (ETAAS). *Talanta* **1999**, 49, 1027-1044.
- [5]. Turekian, K. K., *Oceans*. Prentice-Hall: N. Y., **1968**.
- [6]. De Andrade, J. C.; Rocha, J. C.; Baccan, N., Online oxidation of chromium(III) to chromium(VI) for use with the flow injection analysis technique. *Analyst* **1984**, 109, (5), 645-647.
- [7]. Luo, Y.; Nakano, S.; Holman, D. A.; Ruzicka, J.; Christian, G. D., Sequential injection wetting film extraction applied to the spectrophotometric determination of chromium(VI) and chromium(III) in water. *Talanta* **1997**, 44, 1563-1571.
- [8]. Xue, A.; Qian, S.; Huang, G.; Chen, L., Separation and preconcentration of chromium speciation on chitosan and determination by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **2000**, 15, 1513-1515.
- [9]. Jong, G. J.; Brinkman, U. A., Determination of Chromium(III) and Chromium(VI) in Sea Water by Atomic Absorption Spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **1978**, 98, 243-250.
- [10]. Nakayama, E.; Kuwamoto, T.; Tokoro, H.; Fujinaga, T., Chemical Speciation of Chromium in Seawater. Part 3. The Determination of Chromium Species. *Anal. Chim. Acta* **1981**, 131, 247-254.
- [11]. Gilbert, T. R.; Clay, A. M., Determination of Chromium in Sea Water by Atomic Absorption Spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **1973**, 67, 289-295.
- [12]. Wai, C. M.; Tsay, L. M.; Yu, J. C., A Two-Step Extraction Method for Differentiating Chromium Species in Water. *Mikrochim. Acta* **1987**, II, 73-78.
- [13]. Andersen, J. E. T., Introduction of Hydrogen Peroxide as an Oxidant in Flow Injection Analysis: Speciation of Cr(III) and Cr(VI). *Anal. Chim. Acta* **1998**, 361, 125-131.
- [14]. De Andrade, J. C.; Rocha, J. C.; Baccan, N., Sequential Spectrophotometric Determination of Chromium(III) and Chromium(VI) Using Flow Injection Analysis. *Analyst* **1985**, 110, 197-199.
- [15]. Paleologos, E. K.; Lafis, S. I.; Tzouwara-Karayanni, S. M.; Karayannis, M. I., Speciation analysis of Cr(III)-Cr(VI) using flow injection analysis with fluorimetric detection. *Analyst* **1998**, 123, 1005-1009.

- [16]. Matsuoka, S.; Tennichi, Y.; Takehara, K.; Yoshimura, K., Flow Analysis of Micro Amounts of Chromium(III) and (VI) in Natural Water by Solid Phase Spectrophotometry Using Diphenylcarbazide. *Analyst* **1999**, 124, 787-791.
- [17]. Fang, Z., *Flow Injection Separation and Preconcentration*. VCH: Weinheim, **1993**.

CAPÍTULO 5

CAPÍTULO 5

Estudio de la distribución de As y Cr en la Ría de Arousa

1 INTRODUCCIÓN	248
1.1 Conceptos básicos de oceanografía.....	248
1.1.1 Composición del agua de mar	249
1.1.2 Parámetros fundamentales	253
1.1.2.1 Temperatura.....	254
1.1.2.2 Salinidad	255
1.1.2.3 Densidad	256
1.1.2.4 Luz.....	258
1.1.2.5 Gases disueltos	259
1.1.2.6 Tiempo de residencia.....	260
1.1.3 Circulación oceánica	261
1.1.4 Estuarios.....	262
1.2 Origen y características de las rías gallegas	263
1.2.1 Origen.....	264
1.2.2 Dinámica costera	266
1.2.2.1 Mareas	266
1.2.2.2 Vientos	266
1.2.2.3 Circulación residual.....	267
1.2.2.4 Afloramiento	268
1.2.3 Riqueza biológica.....	270
1.2.4 Impacto ambiental	270
1.3 Ría de Arousa.....	271
1.4 Estudios previos sobre la concentración de metales en las rías gallegas	274
2 APLICACIÓN DE LOS MÉTODOS DESARROLLADOS	276
2.1 Muestreo	276
2.2 Tratamiento de datos	279
2.2.1 Distribución de As total	280
2.2.2 Distribución de As(III).....	281
2.2.3 Distribución de Cr total.....	284

2.2.4 Distribución de Cr(VI).....	288
2.2.5 Estudio quimiométrico.....	291
2.2.5.1 Pretratamiento de datos.....	291
2.2.5.2 Análisis factorial.....	292
2.2.5.3 Análisis de cluster.....	294
3 BIBLIOGRAFÍA.....	297

1 Introducción

Los valores de concentración de los elementos traza en agua de mar deben ser valorados en conjunto con otros parámetros hidrográficos y biogeoquímicos como por ejemplo: patrones de circulación de las corrientes dominantes en el área de muestreo, la salinidad, temperatura, gases disueltos, materia orgánica, etc. En otras palabras, las concentraciones obtenidas de los elementos traza deben ser oceanográficamente coherentes¹.

1.1 Conceptos básicos de oceanografía

Los océanos pueden definirse como grandes masas de agua salada situadas entre los continentes en los que tiene lugar continuamente fenómenos físicos químicos y biológicos que los convierten en el ecosistema más importante del planeta. El origen de la vida sucedió en el mar porque posee unas propiedades que facilitaron el desarrollo de los primeros organismos. En primer lugar el agua es uno de los principales constituyentes de los organismos vivos, y la temperatura del mar es prácticamente constante, por tanto la adaptación resulta sencilla, sin sufrir cambios tan drásticos como en el aire. Además, el efecto de la gravedad es menor por lo que los animales no necesitan estructuras complejas para sostenerse y

moverse. A esto se le suma que nadar y flotar requiere menor energía que caminar o volar².

Los océanos representan el 71% de la superficie terrestre, de ahí el interés por su estudio. A pesar de que la relación hombre-mar se remonta a la prehistoria, no fue hasta 1872 cuando comienza el estudio sistemático del mar. En diciembre de este año zarpa del puerto inglés de Portsmouth el barco HMS *Challenger* con el objetivo de realizar la primera expedición científica, que durante 4 años recorrió los océanos Atlántico, Pacífico e Índico.

1.1.1 Composición del agua de mar

Los diversos componentes del agua de mar se presentan como especies disueltas, en forma coloidal, como materia particulada o gases disueltos³:

- *Especies disueltas.*

Por convenio se consideran como tales aquellas que pasan a través de un filtro de 0,45 μm . Se subdividen en especies orgánicas e inorgánicas. A su vez, estas últimas se agrupan en componentes mayoritarios cuando su concentración supera 1 $\mu\text{g l}^{-1}$ y el resto en componentes minoritarios. Las especies inorgánicas disueltas se encuentran fundamentalmente como iones libres aunque también existen especies moleculares o pares iónicos.

- *Forma coloidal.*

Son componentes que pasan a través del filtro de 0,45 μm pero no se disuelven. Un número considerable de cationes se hidrolizan lentamente a causa del pH del agua de mar originando complejos coloidales hidroxilados.

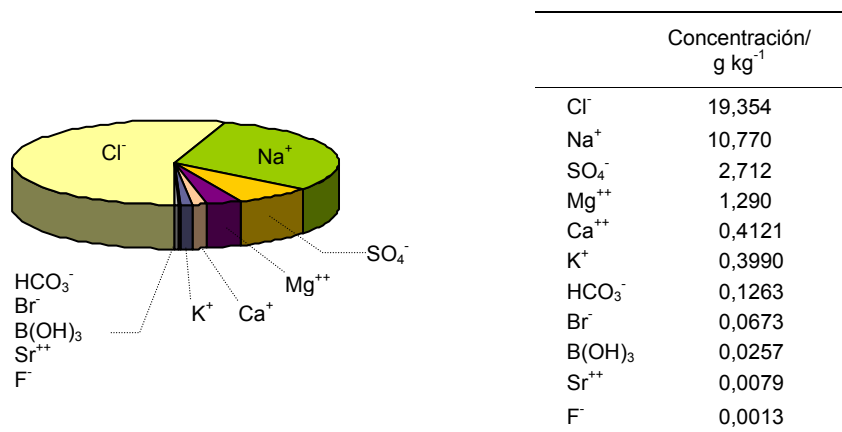
- *Materia particulada.*

Dentro de este grupo se distinguen entre orgánica e inorgánica. La mayoría de la especies orgánicas particuladas han sido incorporadas a los océanos por

putrefacción de organismos muertos o como productos de excreción de organismos vivos. Mientras que las especies inorgánicas particuladas están constituidas por residuos de la erosión de rocas terrestres y por silicatos y carbonatos procedentes de conchas y esqueletos de organismos muertos. En las partículas orgánicas suele haber un notable contenido de metales, ordinariamente escasos en el agua de mar, acumulados en los organismos vivos.

La clasificación más habitual para las especies disueltas en el agua de mar distingue entre constituyentes mayoritarios y minoritarios. El 99% del contenido total de sales del agua de mar se debe a los componentes mayoritarios, los cuales se mantienen en una proporción constante^{4,5} (Figura 1).

Figura 1. Componentes mayoritarios del agua de mar de salinidad 35⁰/₀₀.



Se consideran componentes minoritarios aquellas especies que se encuentran en concentraciones inferiores a 1 µg l⁻¹. No obstante, la mayoría de ellos juegan un papel fundamental en el medio marino. Algunas sales inorgánicas, genéricamente conocidas como nutrientes, resultan imprescindibles para síntesis de materia orgánica. Entre estas destacan nitratos, fosfatos y silicatos.

Los metales traza constituyen otro grupo de componentes minoritarios, algunos de los cuales también son esenciales para los organismos marinos, como por ejemplo: Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Mo⁶. Junto a la complejidad de los procesos en los que intervienen los metales traza, la dificultad de obtener análisis exactos justifica la falta de conocimiento de su distribución en el agua de mar. El límite de detección puede estar limitado por la sensibilidad de la técnica analítica, aunque frecuentemente el valor del blanco es el factor limitante. Por ello es muy importante evitar cualquier tipo de impurezas en los reactivos y el material de laboratorio, así como minimizar las variaciones instrumentales^{7, 8}.

Además el agua de mar está en constante movimiento y en ella tiene lugar numerosos procesos químicos y biológicos, por lo que resulta difícil establecer la concentración habitual de los elementos traza disueltos en el agua de mar.

En la búsqueda bibliográfica sobre la composición del agua de mar hemos encontrado varias tablas de concentración de los elementos traza. La primera de ellas propuesta por Turekain⁹ en 1968 en la que se expresa la concentración en mg l⁻¹. Una publicación más reciente, el libro titulado *Marine Geochemistry*¹ editada en 2003, incluye una tabla de composición que coincide con la de otro libro *Chemical Oceanography*³ publicado en 1992. No obstante, en el primero de ellos cita como fuente un trabajo de 1983, por lo que los valores son también bastante antiguos.

Para realizar la comparación entre las tablas surge un inconveniente, los valores en la segunda tabla se expresan en nmol kg⁻¹, por lo que se debe tener en cuenta la densidad del agua de mar para la conversión de unidades. La densidad del agua de mar no es una constante, sino que depende de la temperatura y la salinidad, por lo que necesitaríamos conocer el valor empleado en el cálculo de las concentraciones. Al tratarse de concentraciones tan bajas se estaría cometiendo un error si no se usa el valor adecuado.

En vista de ello, hemos optado por considerar los datos facilitados por Turekain⁹ como composición habitual en agua de mar (Tabla 1).

Tabla 1. Composición normal del agua de mar⁹. Concentraciones expresadas en mg l⁻¹.

Na	10800	Ti	1 10 ⁻³	Ru	7 10 ⁻⁷	Tb	1,4 10 ⁻⁷
Cl	19400	V	1,9 10 ⁻³	Rh	---	Dy	9,1 10 ⁻⁷
Mg	1290	Cr	2 10 ⁻⁴	Pd	---	Ho	2,2 10 ⁻⁷
S	904	Mn	4 10 ⁻⁴	Ag	2,8 10 ⁻⁴	Er	8,7 10 ⁻⁷
K	392	Fe	3,4 10 ⁻³	Cd	1,1 10 ⁻⁴	Tm	1,7 10 ⁻⁷
Ca	411	Co	3,9 10 ⁻⁴	In	---	Yb	8,2 10 ⁻⁷
Br	67,3	Ni	6,6 10 ⁻³	Sn	8,1 10 ⁻⁴	Lu	1,5 10 ⁻⁷
He	7,2 10 ⁻⁶	Cu	9 10 ⁻⁴	Sb	3,3 10 ⁻⁴	Hf	<8 10 ⁻⁶
Li	0,170	Zn	5 10 ⁻³	Te	---	Ta	<2,5 10 ⁻⁶
Be	6 10 ⁻⁷	Ga	3 10 ⁻⁵	I	0,064	W	<1 10 ⁻⁶
B	4,450	Ge	6 10 ⁻⁵	Xe	4,7 10 ⁻⁵	Re	8,4 10 ⁻⁶
C	28,0	As	2,6 10 ⁻³	Cs	3 10 ⁻⁴	Ir	---
N	15,5	Se	9 10 ⁻⁴	Ba	0,021	Pt	---
F	13	Kr	2,1 10 ⁻⁴	La	2,9 10 ⁻⁶	Au	1,1 10 ⁻⁵
Ne	1,2 10 ⁻⁴	Rb	0,120	Ce	1,2 10 ⁻⁶	Hg	1,5 10 ⁻³
Al	1 10 ⁻³	Sr	8,1	Pr	6,4 10 ⁻⁷	Tl	---
Si	1,9 10 ⁻³	Y	1,3 10 ⁻⁵	Nd	2,8 10 ⁻⁶	Pb	3 10 ⁻⁵
P	0,088	Zr	2,6 10 ⁻⁵	Sm	4,5 10 ⁻⁷	Bi	2 10 ⁻⁵
Ar	0,450	Nb	1,5 10 ⁻⁵	Eu	1,3 10 ⁻⁶	Th	4 10 ⁻⁷
Sc	<4 10 ⁻⁶	Mo	0,01	Gd	7 10 ⁻⁷	U	3,3 10 ⁻³

Los constituyentes disueltos en el agua de mar también pueden clasificarse según su comportamiento en 2 grupos:

- *Conservativos.*

Aquellos constituyentes no influenciados por procesos biológicos ni químicos en muy largo plazo, sino que principalmente están gobernados por procesos físicos⁷. Por ejemplo los constituyentes mayoritarios presentan un comportamiento conservativo. En cuanto a los elementos traza, se consideran

dentro de este grupo aquellos cuyos perfiles verticales muestran una relación constante con la salinidad, como resultado de su baja reactividad en el agua de mar^{1, 6}. Ejemplos: cationes hidratados de Rb^+ y Cs^+ , y el oxoanion de molibdato MoO_4^{2-} .

- *No conservativos.*

Su concentración es muy variable debido a su participación en procesos biogeoquímicos. La mayor parte de los constituyentes minoritarios suelen presentar un comportamiento no conservativo. Dentro de este grupo destacan los nutrientes cuya concentración varía tanto espacial como estacionalmente condicionando la productividad biológica.

1.1.2 Parámetros fundamentales

Las propiedades fundamentales del agua de mar más interesantes para los químicos marinos son la temperatura y salinidad, las cuales están interrelacionadas. La ecuación de estado del agua de mar adoptada por la UNESCO en 1981 es la expresión matemática de la relación entre la temperatura, salinidad, presión y densidad. Suele emplearse para el cálculo de la densidad a partir de los otros parámetros^{1, 10}.

$$\rho(S, t, p) = \frac{\rho(S, t, 0)}{1 - p/K(S, t, p)}$$

donde $\rho(S, t, p)$ es la densidad expresada en kg m^{-3} como función de la salinidad práctica (S), temperatura (t , °C) y la presión (p , bar). El término $\rho(S, t, 0)$ se conoce como la ecuación internacional de estado del agua de mar a 1 atmósfera de presión; y el otro término $K(S, t, p)$ se calcula mediante unas expresiones complejas en función de la salinidad y la temperatura.

1.1.2.1 Temperatura

La temperatura es una de las propiedades físicas más importantes en el medio marino, que influye sobre fenómenos físicos, químicos, geoquímicos y biológicos.

Principalmente, el calor recibido por el agua de mar procede de la radiación solar, aunque también existen otras fuentes como el calor que asciende por convección desde el fondo de los mares y desde el interior de la tierra o desde la propia atmósfera. Debido al elevado calor específico que presenta el mar, los cambios de temperatura que en él se producen son mucho menores que los terrestres. Gracias a esta característica el mar actúa como termorregulador suavizando el clima en las zonas costeras².

En general, la temperatura del mar oscila entre 2-30°C, pudiendo alcanzar en algún caso el valor extremo de -1,9°C (Tª congelación). Las máximas oscilaciones térmicas diarias son muy pequeñas, 0,3°C en el océano e inferiores a 2°C en zonas costeras o muy planas. Hay otros factores que influyen en las oscilaciones térmicas:

- *Latitud*. De la cual depende el tiempo de insolación y el ángulo de incidencia de los rayos solares.
- *Profundidad*. En superficie existen mayores variaciones que dependen de múltiples factores: estacionales, meteorológicos, etc. Al aumentar la profundidad se estabiliza la temperatura entre 4 y 1°C.
- *Corrientes*. Este factor puede llegar incluso a anular el efecto de la latitud sobre la temperatura.
- *Estación del año*. Las oscilaciones estacionales de temperatura van desde 5°C en los trópicos hasta 10°C en las zonas templadas. Aunque en la costa y mares cerrados estas oscilaciones suelen ser mayores, por ejemplo hasta 12°C en el mar Mediterráneo, 17°C en el Báltico y 18°C en el Mar Negro.

- *Situación meteorológica.* La temperatura de la atmósfera y el grado de nubosidad influyen sobre todo en la temperatura de la capa superficial.

La temperatura junto con la salinidad, influyen en la densidad y solubilidad de los diferentes gases que aparecen en el medio marino y ambos condicionan la distribución de los seres vivos en el mar^{11, 12}.

1.1.2.2 Salinidad

La salinidad se refiere a la cantidad de sales contenidas en una determinada muestra de agua de mar. A primera vista cabría suponer que es posible medir por simple evaporación del agua, no obstante experimentalmente no es tan sencillo, además de que sería un método bastante tedioso. En la primera expedición oceanográfica realizada en el HMS *Challenger* se ha demostrado que aunque la cantidad total de sales puede variar, los constituyentes mayoritarios están siempre presentes en la misma proporción. Partiendo de esta premisa Knudsen propuso la primera definición para el término salinidad como: "el peso de las sales inorgánicas en un kilo de agua de mar si todo el bromuro y el yoduro son reemplazados por una cantidad equivalente de cloruros, y todos los carbonatos son reemplazados por una cantidad equivalente de óxidos"^{1, 4, 7, 13}. Después del análisis de gran cantidad de muestras Knudsen propuso la siguiente ecuación:

$$S^{\circ}/_{oo} = 1,805 Cl^{\circ}/_{oo} + 0,030$$

donde $S^{\circ}/_{oo}$ representa a la salinidad y $Cl^{\circ}/_{oo}$ a la clorinidad. El nuevo término, clorinidad, se refiere al peso de cloro equivalente a todos los halogenuros existentes en un kilo de agua de mar. Este valor se obtiene experimentalmente mediante la valoración con nitrato de plata.

Posteriormente se ha establecido la relación entre la salinidad y la conductividad relativa a un patrón de agua de mar (Standard Sea Water) basándose en las

relaciones empíricas de la IAPSO (“Internacional Association of Physical Sciences of the Ocean”). Para realizar las medidas de salinidad en función de la conductividad relativa fueron diseñados unos aparatos llamados salinómetros. En la actualidad se emplea el CTD, instrumento para la medida “in situ” de la conductividad, temperatura y presión, a partir de la cual se obtiene el valor de salinidad a través de la ecuación que relaciona la conductividad con la salinidad que depende de la temperatura⁴. Estos aparatos proporcionan unos datos muy precisos en torno al 0,001‰. Esta precisión resulta fundamental porque el 75% del agua de mar se encuentra entre 34-35‰.

La salinidad calculada de esta manera se conoce como salinidad práctica que difiere ligeramente del valor obtenido aplicando estrictamente la primera definición. Es decir, si se calcula el peso de las sales de una muestra cuya salinidad práctica es 35‰ se obtendría un valor mayor a 35 gramos de sales por kilo de muestra⁵. Al margen de esta matización, habitualmente cuando nos referimos a la salinidad realmente estamos dando el valor de la salinidad práctica.

El rango usual para la salinidad en los océanos es de 32-37‰. Sin embargo, en ciertas condiciones puede alcanzar valores excepcionalmente altos o bajos. En el caso de mares semi-encerrados y latitudes medias, debido a que el efecto de la evaporación prevalece sobre el de las precipitaciones, la salinidad es mayor; por ejemplo en el Mar Mediterráneo alcanza el 37-39‰ y en el Mar Rojo llega al 40-41‰. Por lo contrario en zonas costeras bajo la influencia de grandes ríos o en la época lluviosa los valores de salinidad disminuyen considerablemente, como en el Mar Báltico, cuya salinidad es del 8‰¹.

1.1.2.3 Densidad

La densidad se define como la masa por unidad de volumen, usualmente expresada en $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Al agua se le ha asignado una densidad de $1\text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$, la cual se emplea como referencia para medir la densidad de otras sustancias.

El rango de densidad está entre 1,0220-1,0300 g cm⁻³ en el océano; significativamente mayor a la densidad del agua pura debido al gran contenido de sales. Como se han expuesto anteriormente, este parámetro se calcula mediante la ecuación de estado del agua de mar como una función de la temperatura, salinidad y presión. En la figura 2 se representa la variación de la densidad con la temperatura y la salinidad. Generalmente, a medida que aumenta la profundidad, y por tanto la presión, nos encontramos con aguas más densas y frías.

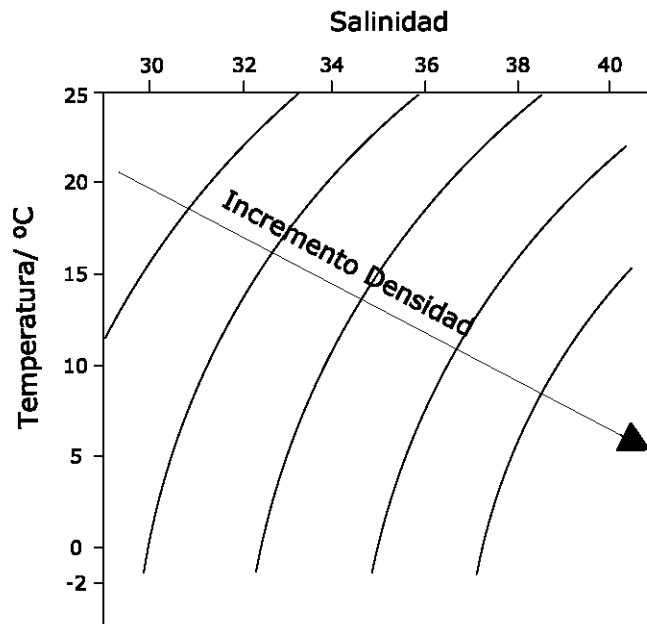


Figura 2. Variación de la densidad del agua de mar con la temperatura y la salinidad.

Se trata de una de las propiedades físicas más importantes del agua de mar porque la diferencia de densidad influye sobre el movimiento de las masas de agua.

1.1.2.4 Luz

La luz, además de calentar el agua de mar superficial, proporciona la energía luminosa a los organismos autótrofos capaces de realizar la fotosíntesis (algas, algas verde-azuladas y cianobacterias), con lo que aportan oxígeno a las aguas y alimento para las especies animales¹⁴. Es un factor esencial para entender la distribución de las especies vegetales en profundidad, que indirectamente condicionan a otras especies, por estar el fitoplancton en la base de la cadena trófica.

La columna de agua de mar se diferencia según la penetración de la luz en²:

- *Capa fótica*. Zona hasta donde penetra la luz que se subdivide en la capa eufótica, donde la luz es suficiente para el crecimiento y reproducción de plantas marinas; y capa disfótica, donde se puede ver pero la luz no es suficiente para realizar la fotosíntesis.
- *Capa afótica*. Zona oscura donde no llega la luz.

Una forma de medir la profundidad hasta donde llega la luz es mediante un disco Secchi. Se introduce en el mar un disco blanco de 30 cm de diámetro atado con un cabo con marcas de profundidad, procurando que baje verticalmente. En el momento que deja de verse el disco se toma como la profundidad de penetración de la luz¹³. Cuanto mayor sea el contenido de materia en suspensión, mayor será la absorción de la luz; lo que implica una menor transmisión y que el disco Secchi desaparezca a menor profundidad. Por ello, la penetración de la luz se ve dificultada en las zonas costeras donde hay más partículas en suspensión procedentes de los ríos, restos orgánicos y mayor presencia de fitoplancton originando gran turbidez en las aguas.

La latitud es otro factor que influye sobre la penetración de la luz porque de ella depende el ángulo de incidencia. En el Ecuador la luz incide perpendicularmente en la superficie del agua por lo cual penetra más que hacia los polos donde los rayos solares llegan con cierta inclinación¹¹.

Además la absorción depende de la longitud de onda del espectro luminoso. La luz roja es rápidamente absorbida mientras que la azul alcanza hasta los 600 metros (Figura 3).

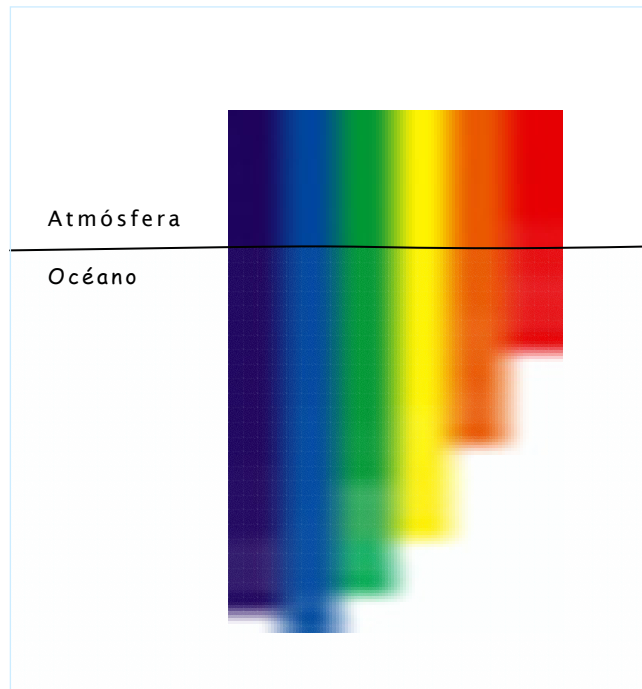


Figura 3. Penetración del espectro luminoso en el mar.

1.1.2.5 Gases disueltos

A través de la interfase aire-mar se produce el intercambio de gases entre la atmósfera y los océanos. Aunque en porcentajes bastante variables todos los gases atmosféricos pueden hallarse disueltos en el mar. Los más importantes N_2 , O_2 y CO_2 se encuentran en una proporción 28:19:1, aunque sus concentraciones dependen de la temperatura y la salinidad. El oxígeno y el dióxido de carbono son los más estudiados porque ambos juegan un papel muy importante en el ciclo biogeoquímico del agua de mar.

El O₂ disuelto se libera durante la fotosíntesis en la capa fótica y se consume durante la oxidación de la materia orgánica en aguas más profundas. Los valores mínimos suelen encontrarse entre 100-1000m de profundidad. La concentración de oxígeno disuelto puede usarse para caracterizar una masa de agua¹.

Por el contrario el CO₂ disuelto se consume durante la fotosíntesis y se libera durante la oxidación de la materia orgánica. Además el CO₂ participa en multitud de procesos fundamentales en el agua de mar dada su elevada reactividad. No se puede olvidar la aparición de CO₂ en forma de otros radicales tales como carbonatos o bicarbonatos, constituyentes básicos de las estructuras esqueléticas de los seres vivos marinos.

1.1.2.6 Tiempo de residencia

El tiempo de residencia de un elemento en el océano es el promedio de tiempo que dicho elemento permanece disuelto o en suspensión antes de pasar a formar parte de los sedimentos^{1, 8}. En un sistema estacionario la entrada de un elemento por unidad de tiempo se compensa con la salida. En el caso de los océanos la entrada tiene lugar principalmente a través de la descarga de los ríos, la deposición atmosférica y las exhalaciones hidrotermales; mientras que la salida debe fundamentalmente a la sedimentación. Habitualmente, el tiempo de residencia, τ , se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\tau = \frac{A}{dA/dt}$$

donde A representa la cantidad de elemento en disolución o suspensión y dA/dt , la cantidad introducida o eliminada por unidad de tiempo.

Se encuentra un amplio rango de valores para los tiempos de residencia, lo cual refleja las diferencias en la reactividad de los elementos en el agua de mar. Los metales alcalinos y alcalinotérreos de menor número atómico, excepto Be,

presentan unos tiempos de residencia del orden de 10^8 años dada su baja reactividad, ya que generalmente se encuentran como simples cationes hidratados. Algunos metales traza como Zn, Mn, Co y Cu se caracterizan por tiempos de residencia intermedios (10^3 - 10^4 años); mientras que para Al, Ti, Cr y Fe los tiempos de residencia son menores, del orden de 10 - 10^3 años. Los metales objeto de estudio en esta tesis, As y Cr suele presentar unos tiempos de residencia de $5 \cdot 10^3$ y $6 \cdot 10^3$ años.

1.1.3 Circulación oceánica

La distribución de las especies disueltas en el mar está controlada por su participación en los ciclos biogeoquímicos y por el transporte dirigido por los patrones de circulación. Por ello resulta tan interesante el estudio de dicha circulación oceánica. El oxígeno, por ejemplo, imprescindible para los seres vivos es transportado por corrientes de agua fría y densa que se hunde en los polos.

Las masas de agua están en constante desplazamiento tanto horizontal como vertical. Las principales fuerzas que dirigen estos movimientos son el viento y la gravedad. Además están condicionadas por la topografía de los fondos, el litoral costero y la rotación de la Tierra.

Los vientos ejercen la mayor influencia sobre la circulación superficial determinando el sentido general de circulación, horario en el hemisferio norte y antihorario en el hemisferio sur. En aguas más profundas los movimientos se deben a la diferencia de densidad entre masas de agua que depende de la temperatura y la salinidad. Por ello se dice que la gravedad es la responsable de las corrientes profundas¹.

En las zonas costeras, además debe tenerse en cuenta la influencia de la fuerza de la marea y las olas sobre el movimiento de las aguas.

1.1.4 Estuarios

Fairbride¹⁵ define estuario como una entrada de mar que alcanza el cauce de un río hasta el nivel de la marea alta. Se caracterizan por gradientes elevados en las propiedades físico-químicas como: salinidad, concentración de los componentes mayoritarios y los elementos traza, pH, turbidez y oxígeno disuelto¹⁶ provocados por la mezcla del agua dulce y agua de mar.

La clasificación dinámica de los estuarios los divide según los patrones de circulación (Figura 4) determinados por el efecto de las mareas frente al caudal del río.

- *Cuña salada*. Por la superficie sale el agua dulce procedente de un río caudaloso llegando hasta la boca, por lo que no existe gradiente horizontal de salinidad en la capa superficial. Mientras que por el fondo entra una masa de agua densa y salina desde el océano.
- *Altamente estratificado*. Se distingue una capa profunda con salinidad uniforme igual a la oceánica y una capa superficial cuya salinidad aumenta hacia la boca. En este caso el caudal del río predomina sobre el efecto de las mareas, no obstante, la velocidad de descarga permite la mezcla entre capas. Esta dinámica suele producirse en estuarios profundos donde la mezcla entre capas es ínfima.
- *Parcialmente estratificado*. En este caso la influencia de las mareas es mayor. La salinidad aumenta de la cabeza a la boca y con la profundidad y tiene lugar una mezcla de las masas de agua por difusión. Las rías gallegas presentan este tipo de dinámica.
- *Mezcla vertical*. La salinidad se mantiene uniforme desde la superficie hasta el fondo porque existe una mezcla homogénea entre el agua del río y con la oceánica. Este tipo de circulación suele darse en estuarios planos y de poco volumen.

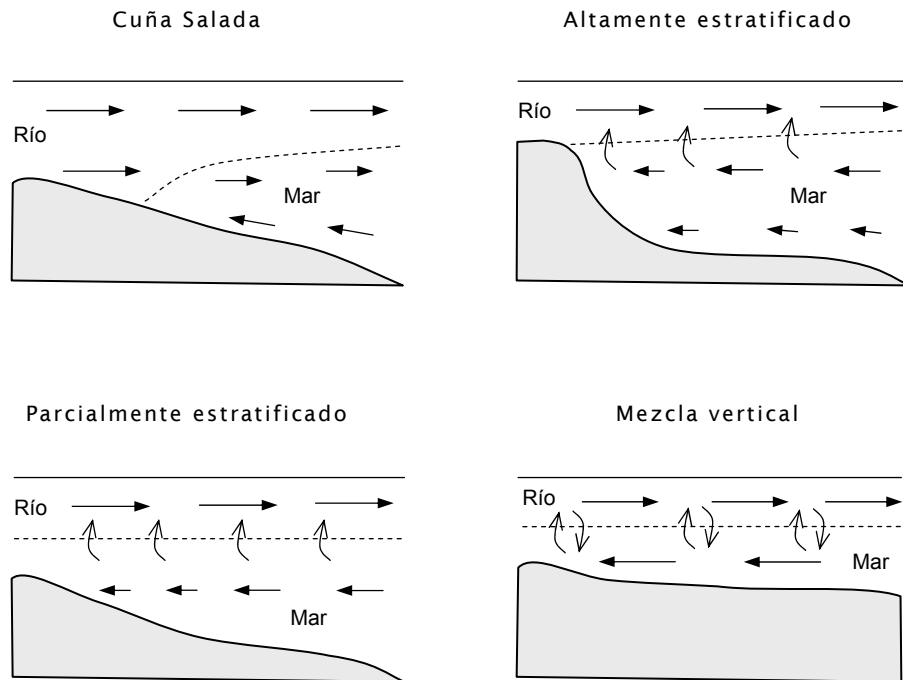


Figura 4. Clasificación dinámica de los estuarios.

1.2 Origen y características de las rías gallegas

El litoral costero de Galicia es muy característico ya que presenta una costa muy irregular formada por las rías¹⁷. Las rías gallegas, fenómenos geológicos poco frecuentes, son valles tectónicos hundidos, de profundidad moderada, que forman costas transversales por la penetración del mar en ellos y están afectados por los movimientos de las mareas, por lo cual se produce en su interior una mezcla del agua dulce del río con el agua del mar.

1.2.1 Origen

La morfología de las rías puede ser de tipo tectónico, fluvial y glaciar. Durante el Mioceno (época dentro de la Era Terciaria que va desde 23-5 millones de años) en Galicia se formaron fracturas en dirección norte-sur y noroeste-sudoeste (Figura 5). Estas zonas de gran debilidad fueron aprovechadas por los cauces de los ríos para establecer su curso y profundizarlo con mucha más facilidad. Además en períodos posteriores a las glaciaciones tiene lugar un ascenso del nivel del mar provocando la invasión de la zona litoral del continente debido al deshielo, fenómeno conocido como trasgresión marina¹⁷.

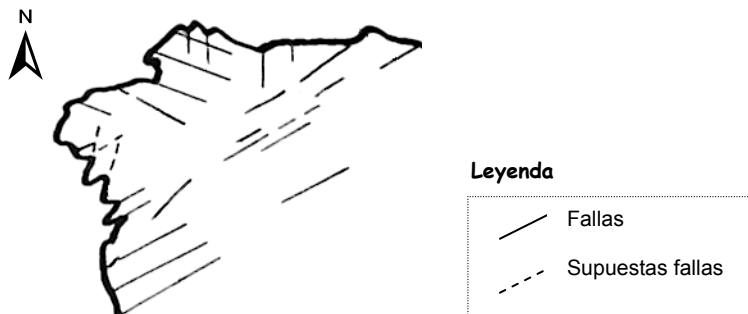


Figura 5. Litoral gallego. Fallas de la época del Mioceno. Adaptado de Martínez Graña¹⁷

Las rías gallegas se pueden agrupar según su dirección estrechamente relacionada con las distintas fracturas. En la cornisa cantábrica las rías tienen dirección norte-sur: Foz, Ribadeo, Ortigueira, Ferrol, Ares y A Coruña. Mientras que en la costa atlántica existen dos tipos de orientación: una noroeste-sureste (Corme, Laxe, Camariñas y Corcubión); y otra suroeste-noreste propia de las Rías Baixas (Figura 6).

Un factor importante en la morfología de la ría, el cual depende directamente de la geología tectónica, es el tipo de rocas que condicionan la topografía y dimensiones de una ría. Las rocas más resistentes que abundan en el litoral

gallego son los granitos, granodioritas y migmatitas. Estos tipos de rocas dan lugar a cabos y puntas que limitan cada ría. También se presentan formando numerosas islas entre las que destacan: Cies, Ons, Arousa y Sálvora. Son zonas muy atacadas por las olas pero con gran resistencia a la erosión. Existen rocas menos resistentes como por ejemplo las rocas metamórficas, las cuales se erosionan originando las ensenadas.



Figura 6. Rías gallegas

A pesar de la irregularidad de la línea de costa, las rías poseen características comunes en cuanto a su forma. Todas ellas presentan una amplia zona externa conocida como boca que se va estrechando a medida que nos adentramos. En la zona más interna, denominada cabecera, se encuentra la desembocadura del río. La profundidad va aumentando progresivamente desde la cabecera hacia la boca. En zonas de escasa profundidad se originan grandes barreras arenosas sumergidas que en algunos casos quedan a descubierto durante la bajamar.

1.2.2 Dinámica costera

Las corrientes en las rías gallegas están influenciadas por las mareas, el viento, el afloramiento y la circulación residual estuárica positiva.

1.2.2.1 Mareas

Las mareas consisten en movimientos periódicos del mar con desplazamiento vertical, de ascenso y descenso, de la masa de agua. La influencia gravitacional de la Luna, y en menor medida la del Sol, sobre las aguas de los océanos es la causa principal de las mareas. También influyen otros factores como la latitud, la profundidad del mar, la forma y el tipo de costa, etc. La costa gallega presenta un rango mareal entre 2-4 m.

Los ciclos de marea son semidiurnos, exactamente duran 12 horas y 25 minutos dado que el día lunar tiene 24 horas y 50 minutos. A lo largo de todo el año los ciclos de mareas presentan rasgos diversos correspondiendo sus extremos a las mareas vivas, en los cuales Tierra-Luna-Sol están alineados de forma que suman sus fuerzas; y a las mareas muertas cuando la Tierra-Luna-Sol están formando un ángulo recto contrarrestándose las fuerzas solares y lunares.

1.2.2.2 Vientos

Fundamentalmente, el viento afecta sobre la capa superficial del mar desplazándola y favoreciendo la entrada de aguas profundas ricas en nutrientes. En el hemisferio norte, debido al efecto Coriolis, la capa superficial se mueve con un ángulo de 45° a la derecha respecto a la dirección del viento. El movimiento se va transmitiendo hacia las capas contiguas formando lo que se conoce como espiral de Ekman (Figura 7).

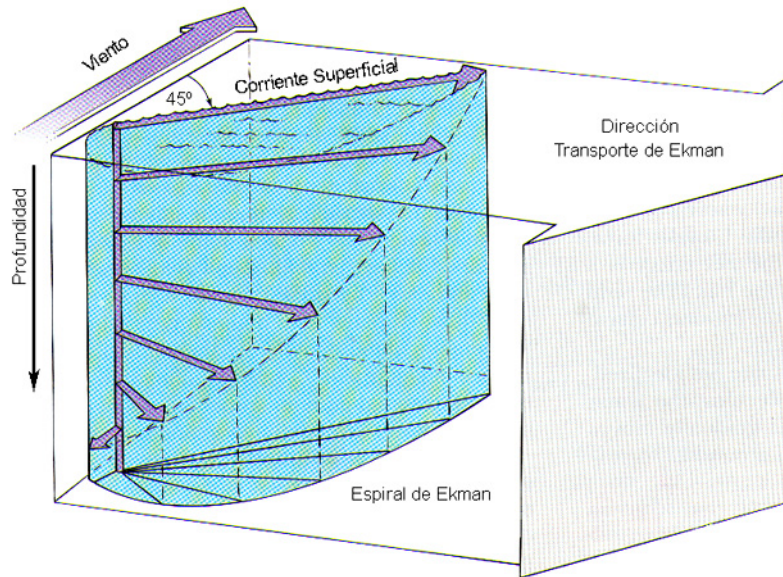


Figura 7. Representación esquemática de la espiral de Ekman. Adaptado de Thurnan¹³.

En las rías gallegas debido a su orografía, los vientos soplan preferentemente siguiendo el eje de estas, en ambos sentidos, sumándose o restándose a la corriente de marea. Con vientos moderados el arrastre del agua superficial por efecto del viento predomina sobre la marea cuando ambos son en sentido opuesto⁵.

1.2.2.3 Circulación residual

Respondiendo al tipo de estuario parcialmente estratificado, en todas las rías gallegas hay un aporte de agua dulce procedente del río desde la cabecera y una entrada de agua oceánica desde la boca de la ría. El agua dulce del río, por su menor densidad, fluye por la parte superficial mezclándose con el agua salada a medida que avanza hacia la boca de la ría. Esto se compensa con la entrada de agua oceánica por el fondo de la ría que se va mezclando verticalmente con el agua superficial que sale (Figura 8).

La velocidad de la componente vertical de la circulación residual es muy pequeña. Y a pesar de que la velocidad de la componente horizontal es 1000 veces mayor queda enmascarado con la velocidad de las corrientes de las mareas aproximadamente unas 10 veces mayor. Aunque de menor magnitud la circulación residual tiene un papel muy importante en el ciclo biogeoquímico con un aporte lento, pero continuo de aguas ricas en nutrientes y oxígeno hacia el interior de las rías.

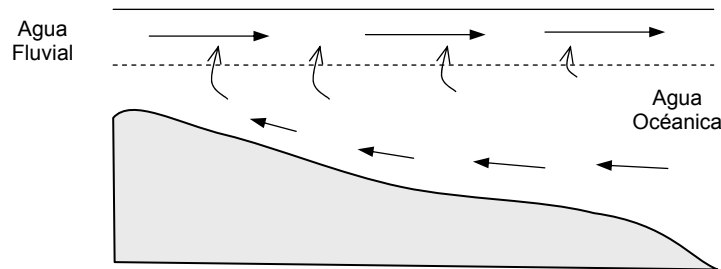


Figura 8. Esquema de la circulación residual.

En uno de los primeros estudios exhaustivos sobre la Ría de Arousa realizado por Otto¹⁸ a partir de los datos tomados en varias campañas oceanográficas entre 1962 y 1964, propuso las corrientes de circulación residual que se muestran en la figura 9, indicando los puntos de afloramiento. Este comportamiento ha sido confirmado en estudios posteriores¹⁹.

1.2.2.4 Afloramiento

El afloramiento (upwelling en inglés) es un fenómeno inducido por el viento que produce un ascenso de agua profundas¹³. Se distinguen 2 tipos de afloramiento:

- *Ecuatorial.*

Los vientos del Este fuerzan varias corrientes a ambos lados del Ecuador desplazan el agua superficial hacia latitudes mayores debido al transporte de Ekman. Esto provoca una deficiencia de agua en la superficie entre las dos corrientes, favoreciendo el ascenso de aguas más profundas.

- *Costero.*

Este tipo de afloramiento contribuye a la extraordinaria producción primaria de las aguas en las rías gallegas. En esta costa se produce 2 veces al año, una en primavera y otra al final de verano. Se caracteriza por una entrada excepcional de agua profunda cargada de nutrientes favorecida por la rápida salida del agua de la capa superficial forzada por el viento. Esta situación se da en las Rías Baixas cuando soplan vientos del noroeste con cierta intensidad durante varios días consecutivos. Debido a esta entrada de agua profunda se acelera la circulación estuárica con lo que el aporte de nutrientes es todavía mayor⁵. Como consecuencia, la temperatura superficial en la costa disminuye notablemente, llegando incluso a 8°C menos.

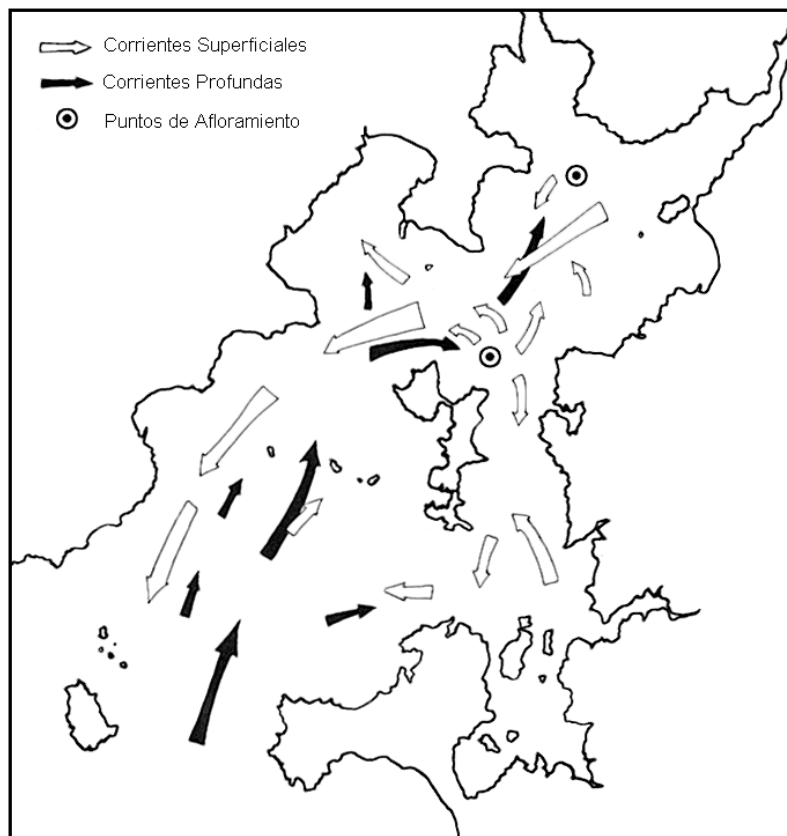


Figura 9. Corrientes residuales de la Ría de Arousa. Adaptado de Díaz-Fierros et al⁶.

1.2.3 Riqueza biológica

La gran riqueza de las rías gallegas se debe fundamentalmente a la constante renovación del agua. El sistema de circulación estuárica positivo ejerce una profunda influencia sobre el ciclo de las sales actuando como concentrador de nutrientes. Por un lado, existe un aporte de nutrientes a la capa superficial en el área de influencia del río, ya que el agua de los ríos contiene mayor cantidad de nutrientes, silicatos y nitratos, que el agua de mar. Y por otro lado, el agua oceánica que penetra por el fondo de las rías, más rica en sales nutrientes, a medida que avanza hacia el interior se eleva hasta la zona iluminada donde son asimiladas y transformadas en materia orgánica por el fitoplancton mediante la fotosíntesis. El fitoplancton mientras es arrastrado hacia la boca por la capa de agua superficial, se transforma por la acción de los herbívoros o por envejecimiento, y sedimentan. Las partículas, durante la sedimentación, son mineralizadas casi en su totalidad por la acción bacteriana, incrementando la concentración del agua que penetra por la parte inferior, entrando de nuevo en el ciclo biológico^{1,5}.

1.2.4 Impacto ambiental

En la actualidad la preocupación por el cuidado y la conservación del medioambiente aparente ha crecido. Una de las zonas de mayor sensibilidad es el litoral costero; por ello en Galicia la necesidad de controlar el impacto ambiental se hace más notable ya que es una de las comunidades autónomas españolas con más kilómetros de costa. Y además su economía depende de la explotación de los recursos marinos.

El hombre es el principal responsable de la degradación del litoral¹⁷ como por ejemplo en los casos que se relatan a continuación:

- La excesiva extracción de aguas subterráneas varía la interfase de aguas al agua dulce originando problemas ambientales en áreas de rápido desarrollo costero, por ejemplo salinización de acuíferos costeros.
- El vertido de aguas residuales no tratadas procedentes de aguas fecales, lavados industriales o comerciales. El medio costero puede amortiguar este impacto debido al movimiento de las masas de agua pero en ambientes de menor renovación del agua como lagunas costeras, bahías y estuarios presentan baja capacidad para aceptar aguas residuales. La descarga de aguas residuales en la costa produce toxicidad y escasez de oxígeno porque lo consumen las bacterias y microorganismos de estas aguas lo cual podría ocasionar la muerte de numerosas especies marinas.
- El dragado de sedimentos del fondo del mar para favorecer la navegación en canales hacia los puertos o bien como materiales para la construcción. Todo esto ocasiona un aumento de la turbidez de las aguas y la influencia en la biota; también un aumento de la pendiente los fondos generando rompientes de olas más próximas a la costa aumentando la erosión.
- La construcción de presas en los ríos impiden el aporte de sedimentos a la costa, esto modifica la dinámica en la desembocadura o en el estuario y consecuentemente de la costa.
- El relleno de zonas costeras para la ubicación de nuevos puertos, dársenas o diques modificando las corrientes y como consecuencia la posible desaparición de los arenales.

1.3 Ría de Arousa

La Ría de Arousa, la más extensa de las rías gallegas, se sitúa entre 42,44°-42,68° N y 9,05°-8,77° W, penetrando en la costa de Galicia unos 33 km en dirección SW-NE. Al igual que las otras Rías Baixas posee 2 bocas, separadas por la Isla de Sálvora. La boca norte entre dicha isla hasta Aguiño tiene 3,5 Km de

ancho y escasa profundidad alcanzando solo los 10 m, parcialmente cerrada por islotes y rocas. Por comparación, la boca sur entre la Isla de Sálvora y la península de O Grove con 4,5 km de ancho por donde pasa el canal principal alcanzando 60 m de profundidad en la boca^{5, 18}. Presenta una topografía compleja definida por una línea de costa suave como sucesión de arcos que forman zonas de abrigo naturales. Además existen gran número de pequeñas islas y 4 grandes islas: Sálvora, Arousa, A Toxa y Cortegada. La presencia de multitud de islas e islotes complica la circulación de agua en su interior. La profundidad es bastante uniforme, quedando por debajo de 5 m en una tercera parte de la ría en bajamar. En la cabecera de la ría desemboca el Río Ulla, con un caudal de $93 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$; en la costa sudeste frente a la Isla de A Toxa desemboca el Río Umia con un caudal de $16 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ y en la ensenada de Rianxo, desemboca el Río Beluso con un caudal de menor importancia⁵.

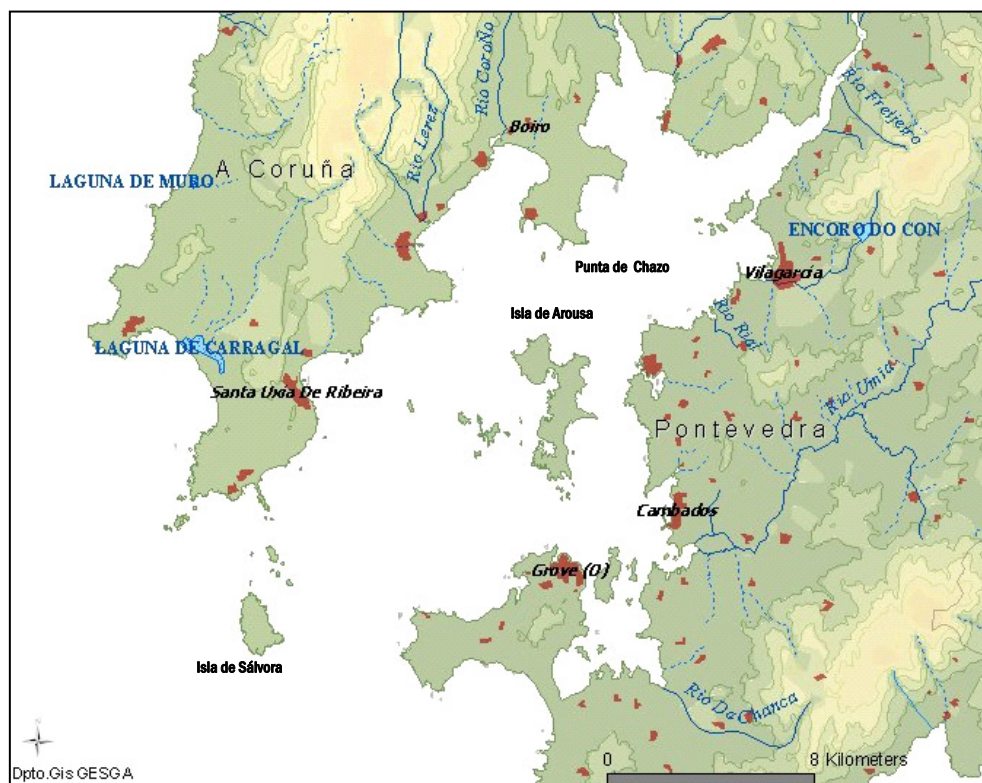


Figura 10. Mapa de la Ría de Arousa.

La Ría de Arousa se divide claramente en tres partes (Figura 10):

- *Interna*. Incluye la masa de agua situada al Este de la línea que une punta de Chazo con la Isla de Arousa. Esta zona se caracteriza por la elevada influencia de las aguas del Río Ulla.
- *Externa*. Bajo la influencia oceánica, comprende el volumen de agua situado entre la línea que une Ribeira y el sur de la Isla de Arousa y las bocas.
- *Central*. Situada entre las dos anteriores. Se encuentra influenciada tanto por los ríos como por el régimen de vientos existentes en la plataforma. Cabe destacar la existencia de una zona de aguas poco profundas en la costa Este, en la zona protegida por la península de O Grove.

La Ría de Arousa constituye un ecosistema de gran riqueza en que se desarrolla una intensa actividad económica en el sector de la acuicultura, siendo el principal cultivo el de mejillón, con la presencia en la ría de más de 2400 bateas (70% de las bateas de mejillón explotadas en Galicia).

A partir del Decreto 438/2003 aprobado el 13 noviembre por el Consello de la Xunta de Galicia surge el primer plan básico de contingencia de la contaminación marina en las rías gallegas publicado en el DOG nº 241 del 14 de diciembre de 2004. En este plan se contemplan los riesgos de contaminación y se localizan posibles puntos de riesgo, así como las zonas protegidas.

En el litoral de la Ría de Arousa se encuentran ubicados varios núcleos de población importantes, de entre los que destaca Vilagarcía de Arousa tanto por su población como su actividad económica. El puerto de Vilagarcía posee un tráfico de mercancías importante entre la que se encuentran algunos productos susceptibles de causar contaminación: fertilizantes, urea, cereales, metanol, gasoil, asfalto, fuel, formol, etc. Otros puntos de riesgo potencial son las numerosas conserveras, los astilleros y carpinterías de ribera, emisarios de aguas

residuales, y los desbordamientos de las EDAR (Estación Depuradora de Aguas Residuales).

Entre las zonas protegidas destaca el Complejo Intermareal Umia-O Grove, A Lanzada, Pta. Carreirón y Laguna Bordeira incluido en la Red Natura 2000; las 160 playas por su interés turístico y las zonas de marisqueo como el parque de Carril y los 24 polígonos de bateas.

1.4 Estudios previos sobre la concentración de metales en las rías gallegas

Ya desde los años 70 aparecen trabajos publicados sobre la Ría de Arousa que se centran fundamentalmente en el estudio de las condiciones oceanográficas durante diferentes campañas²⁰⁻²³. El primer estudio exhaustivo sobre la Ría de Arousa fue realizado por Leonard Otto, tal como se refleja en el libro titulado “*Oceanography of the Ria de Arosa (NW of Spain)*”¹⁸. Aunque este libro no fue publicado hasta 1975, en él se recogen los resultados de 3 campañas oceanográficas realizadas en los veranos de 1962, 1963 y 1964 y otra campaña realizada en el invierno de 1964. Los parámetros medidos fueron: temperatura, salinidad, penetración de la luz con disco Secchi, materia en suspensión, oxígeno disuelto, carbono orgánico disuelto, nutrientes y corrientes. Además se registraron datos meteorológicos como: temperatura ambiente, velocidad y dirección del viento, precipitaciones y nubosidad.

No obstante existe poca información sobre las concentraciones de metales disueltos en el agua de las rías gallegas, aunque en el caso del sedimento y la biota el número publicaciones es mayor. Esto se debe a las dificultades técnicas para la determinación de los metales en agua de mar dado que se encuentran en niveles de concentración muy bajos. No es hasta 1988²⁴ cuando se publica un estudio sobre el contenido de metales en agua de mar en la costa gallega, en el

cual se analizó el contenido de Cd, Pb y Zn en agua en estaciones situadas en la plataforma frente a las principales rías.

A medida que las técnicas analíticas han evolucionado mejorando la sensibilidad, se ha facilitado la determinación de metales traza en agua de mar. Sin embargo la información continúa siendo insuficiente. En la revisión realizada por Prego et al.²⁵ de los datos publicados hasta el año 2000 se puede comprobar esta deficiencia. Únicamente se ha analizado el contenido de Cd, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn y Sn disuelto en el agua de mar. Posteriormente se ha determinado el contenido de Cd, Cu, Pb y Zn mediante voltamperometría en las rías de Vigo, Pontevedra y Arousa²⁶ y la Ría de Ferrol²⁷.

En un trabajo reciente realizado por Peña-Vázquez et al²⁸. se ha determinado la concentración de As y Sb total en muestras de agua de mar tomadas en la Ría de Arousa. El método aplicado para el análisis de las muestras consiste en un sistema de preconcentración por precipitación con La y posterior determinación mediante HG-ICPOES.

Con esta tesis se pretende contribuir al subsanar esta falta de información con la aportación de nuevos métodos de análisis altamente sensibles adecuados para la determinación de As y Cr disueltos en agua de mar. Y sobre todo la posibilidad de la determinación selectiva de las especies inorgánicas más tóxicas de ambos elementos, As(III) y Cr(VI).

2 Aplicación de los métodos desarrollados

2.1 Muestreo

Las muestras fueron tomadas en la Ría de Arousa el 8 de julio del 2003, a bordo del buque oceanográfico *Mytilus* (IIM Vigo-CSIC).

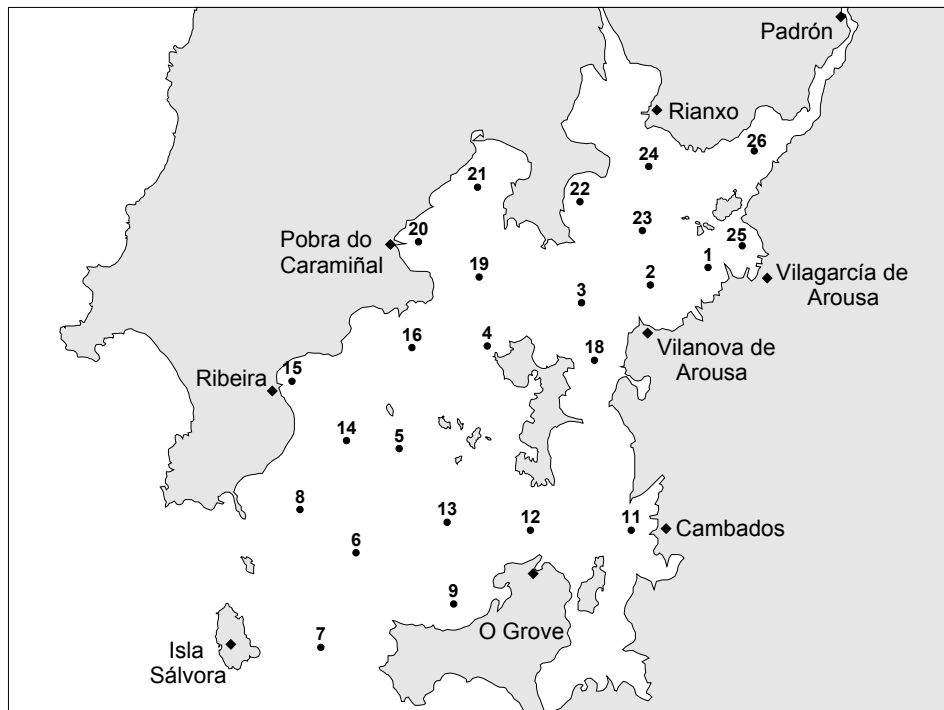


Figura 11. Mapa de estaciones de la Ría de Arousa (08/07/03)

Para establecer los puntos de muestreo se han considerado las corrientes, la situación de los principales núcleos de población y la batimetría. Se fijaron 24 puntos de muestreo distribuidos por toda la Ría, 7 de ellos situados sobre el canal principal de entrada hacia el puerto de Vilagarcía de Arousa. A pesar de la planificación inicial, no pudieron ser tomadas muestras en las estaciones 10 y 17

situadas en la parte Este de la Isla de Arousa y en la ensenada de O Grove porque la profundidad en esas zonas no era suficiente para acceder con el barco. Además se tomaron muestras en la cabecera de la Ría: unas en la desembocadura del Río Ulla, a la altura de Bamio y otras en el Carril, importante zona de marisqueo (Tabla 2 y Figura 11).

Tabla 2. Coordenadas de las estaciones de muestreo en la Ría de Arousa (08/07/03).

Estación	Latitud (N)		Longitud (W)		Profundidad/m
1	42°	35,944'	8°	47,339	7
2	42°	35,579'	8°	49,593	17
3	42°	35,201'	8°	51,321	25
4	42°	34,456'	8°	53,910	43
5	42°	32,490'	8°	55,986	53
6	42°	29,979'	8°	57,015	45
7	42°	27,980'	8°	58,261	60
8	42°	31,360'	8°	58,258	42
9	42°	29,098'	8°	54,970	20
11	42°	30,847'	8°	50,043	7
12	42°	30,440'	8°	51,919	19
13	42°	30,943'	8°	54,827	32
14	42°	32,745'	8°	57,497	37
15	42°	33,336'	8°	58,674	25
16	42°	34,025'	8°	56,011	33
18	42°	33,905'	8°	50,526	10
19	42°	35,463'	8°	53,731	35
20	42°	36,246'	8°	55,647	11
21	42°	37,423'	8°	54,008	16
22	42°	36,888'	8°	50,803	11
23	42°	36,689'	8°	49,702	11
24	42°	37,481'	8°	48,879	6
25	Carril	---	---	---	---
26	Bamio	---	---	---	---

Las muestras fueron recogidas con la ayuda de botellas *Niskin* en la superficie, el fondo y en las estaciones situadas en el canal principal también a 5 m de profundidad. Las botellas *Niskin* consisten en un tubo cilíndrico con unas sujeciones para su colocación en un cabo. Inicialmente las tapas inferior y

superior, unidas mediante una goma elástica, descienden abiertas. Cuando todas están situadas a la profundidad deseada se cierran con el lanzamiento de un peso que libera las tapas, las cuales cierran rápidamente, soltando el peso encargado de cerrar siguiente botella (Figura 12).

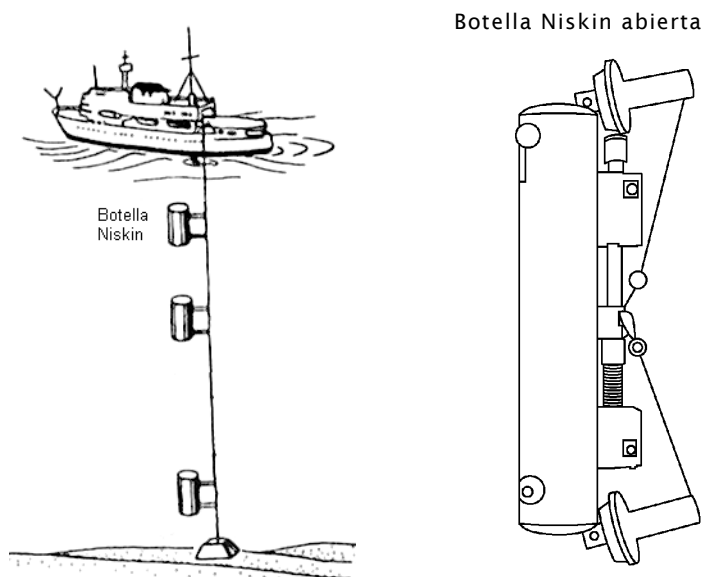


Figura 12. Toma de muestra de agua de mar con botellas Niskin. Adaptado de Crompton²⁹

Cuando las botellas *Niskin* están de nuevo a bordo se pasa la muestra por triplicado a botes de polietileno de alta densidad de 100 y 250 ml. Las muestras guardadas en los botes de 100 ml son acidificadas con el fin de evitar la adsorción de los metales traza en las paredes del bote. Sin embargo, para realizar los análisis de especiación no pueden acidificarse porque podrían alterar la proporción de las distintas especies. En previsión de la necesidad de preconcentrar las muestras para realizar los análisis de especiación se ha tomado un volumen mayor, 250 ml.

Con el fin de controlar los posibles problemas de contaminación se han preparado blancos de campo y transporte. Ambos blancos consisten en agua de mar sintética guardados en el mismo tipo de bote en los que se almacenaran las muestras. Los blancos de campo han sido expuestos a la misma atmósfera donde se trasvasaron las muestras de las botellas *Niskin* a los botes de polietileno. A continuación fueron tratados igual que las muestras.

Una vez en el laboratorio, las muestras son filtradas a través de un filtro de 45 μm de poro (Durapore, Millipore, USA) y almacenadas en el congelador hasta el momento del análisis.

2.2 Tratamiento de datos

Se han aplicado los métodos desarrollados para la especiación de As y Cr mediante la preconcentración con APDC usando reactores anudados en un sistema FI-ETAAS.

El agua de mar almacenada en cada uno de los botes fue analizado por triplicado con el fin de eliminar datos anómalos por posibles errores en la determinación o por contaminación durante el transporte, filtrado y almacenamiento.

Una vez calculada la concentración media de cada estación a diferentes profundidades se han interpolado los datos para su representación en los mapas de distribución que mostrarán a continuación. La interpolación ha sido realizada con el programa Surfer (Golden Software Inc., USA), diseñado para dibujar mapas de isolíneas. Este programa permite realizar diferentes tipos de interpolación empleando distintos algoritmos. Se ha seleccionado el modo "Kriging" por ser el más adecuado en este caso según recomienda Cressie³⁰. Se trata de un modo de interpolación geo-estadístico, bastante flexible, capaz de obtener mapas de isolíneas a partir de datos espaciados irregularmente.

2.2.1 Distribución de As total

En primer lugar se ha determinado la concentración de As total empleando el método optimizado para la preconcentración de As usando reactores anudados mediante un sistema FI-ETAAS, tal como se detalla en el segunda parte del capítulo 3.

Tabla 3. Concentración de As total expresada en $\mu\text{g l}^{-1}$ de las muestras de agua de mar recogidas en la Ría de Arousa (08/07/03).

Estación	Superficie	Fondo	5 m
1	2,09 ± 0,03	2,02 ± 0,11	
2	2,26 ± 0,26	2,28 ± 0,28	
3	2,36 ± 0,16	2,19 ± 0,04	2,02 ± 0,01
4	1,37 ± 0,07	1,27 ± 0,09	1,26 ± 0,09
5	1,51 ± 0,01	0,91 ± 0,11	0,85 ± 0,06
6	1,40 ± 0,37	2,05 ± 0,13	1,54 ± 0,24
7	1,21 ± 0,03	1,50 ± 0,17	1,30 ± 0,02
8	1,22 ± 0,17	1,56 ± 0,04	
9	2,01 ± 0,04	2,00 ± 0,09	
11	1,54 ± 0,11	1,31 ± 0,32	
12	1,92 ± 0,04	1,61 ± 0,16	
13	1,91 ± 0,26	1,99 ± 0,27	
14	1,81 ± 0,06	1,19 ± 0,08	
15	1,79 ± 0,01	1,68 ± 0,37	
16	1,13 ± 0,21	1,13 ± 0,03	
18	0,93 ± 0,05	0,90 ± 0,03	
19	1,40 ± 0,03	0,77 ± 0,21	
20	1,67 ± 0,13	2,01 ± 0,14	
21	0,94 ± 0,03	1,04 ± 0,19	
22	1,32 ± 0,03	1,07 ± 0,05	
23	0,95 ± 0,03	1,19 ± 0,04	
24	1,20 ± 0,04	0,89 ± 0,04	
25	1,01 ± 0,08		
26	1,55 ± 0,04		

Como se puede comprobar en los datos de la tabla 3, todos los valores obtenidos para la concentración de As total disuelto en el agua de mar se encuentran claramente por encima el LOD y LOQ del método propuesto, que son $0,016 \mu\text{g l}^{-1}$ y $0,053 \mu\text{g l}^{-1}$ de As total respectivamente. El rango de concentraciones obtenido es

de 0,93-2,36 $\mu\text{g l}^{-1}$ de As total en la superficie y 0,77-2,28 $\mu\text{g l}^{-1}$ de As total en el fondo. En ningún caso se supera 2,6 $\mu\text{g l}^{-1}$ de As total, valor considerado como normal por Turekian⁹.

Los mapas de distribución de As total en la Ría de Arousa (Figura 13) reflejan una tendencia decreciente de la concentración de As disuelto desde la parte interna hacia la boca norte, influenciada por la corriente superficial. Esta corriente superficial característica de las rías gallegas se debe a la circulación estuárica positiva, por la cual las aguas superficiales de menor salinidad, salen de la ría próximas a la costa norte.

El área de mayor concentración se halla en la parte interna (estaciones 1,2 y 3) próximas al mayor núcleo de población, Vilagarcía de Arousa, tanto en las muestras superficiales como de fondo (Figura 13).

2.2.2 Distribución de As(III)

Posteriormente se ha determinado la concentración la especie trivalente mediante el método desarrollado para la separación y preconcentración de As(III) mediante la adsorción en un reactor anudado del quelato formado con APDC usando un sistema FI-ETAAS (ver 1ª parte capítulo 3).

Una de las singularidades del agua de mar la estabilidad del pH, a pesar de la complejidad y la variabilidad de la disolución, con valores de pH entorno a 8. A este pH, teóricamente la forma predominante de arsénico debería ser HAsO_4^{2-} , por lo tanto As(V) debería ser la especie más estable en agua de mar³¹. Los resultados obtenidos corroboran esta suposición, las concentraciones de As(III) son insignificantes (Tabla 4). Todos los valores de concentración se encuentran por debajo del límite de cuantificación del método desarrollado, 0,023 $\mu\text{g l}^{-1}$ de As(III); y además, algunos de ellos por debajo del límite de detección, 0,008 $\mu\text{g l}^{-1}$

de As(III), indicados en la tabla 4 como n. d. (no detectado). La mayoría de estos valores corresponden a las muestras del fondo.

Tabla 4. Concentración de As(III) expresada en $\mu\text{g l}^{-1}$ de las muestras de agua de mar recogidas en la Ría de Arousa (08/07/03).

Estación	Superficie	Fondo	5 m
1	0,021 \pm 0,003	n. d.	
2	0,019 \pm 0,003	0,012 \pm 0,004	
3	0,020 \pm 0,003	0,012 \pm 0,006	0,01 \pm 0,003
4	0,015 \pm 0,003	0,010 \pm 0,004	0,01 \pm 0,003
5	0,011 \pm 0,004	n. d.	0,01 \pm 0,002
6	0,017 \pm 0,003	n. d.	0,01 \pm 0,004
7	0,016 \pm 0,002	0,013 \pm 0,001	0,02 \pm 0,005
8	0,009 \pm 0,003	0,009 \pm 0,002	
9	0,009 \pm 0,004	n. d.	
11	n. d.	0,009 \pm 0,003	
12	n. d.	n. d.	
13	0,012 \pm 0,003	n. d.	
14	0,012 \pm 0,001	n. d.	
15	0,012 \pm 0,005	n. d.	
16	0,009 \pm 0,001	0,011 \pm 0,004	
18	n. d.	n. d.	
19	n. d.	0,007 \pm 0,001	
20	0,010 \pm 0,005	n. d.	
21	0,013 \pm 0,003	0,009 \pm 0,004	
22	n. d.	0,010 \pm 0,006	
23	0,012 \pm 0,008	0,013 \pm 0,003	
24	0,012 \pm 0,002	0,013 \pm 0,003	
25	0,020 \pm 0,003		
26	0,009 \pm 0,005		

n.d. No detectado, inferiores al LOD 0,008 $\mu\text{g l}^{-1}$ de As(III).

En este caso no tiene sentido incluir los mapas de distribución, ya que los valores obtenidos son inferiores al límite de cuantificación. El arsénico disuelto en el agua de mar se encuentra únicamente en sus formas inorgánicas³², As(V) y As(III); entonces dado que la concentración de As(III) es insignificante puede considerarse que prácticamente todo el contenido de As hallado en las muestras corresponde a As(V).

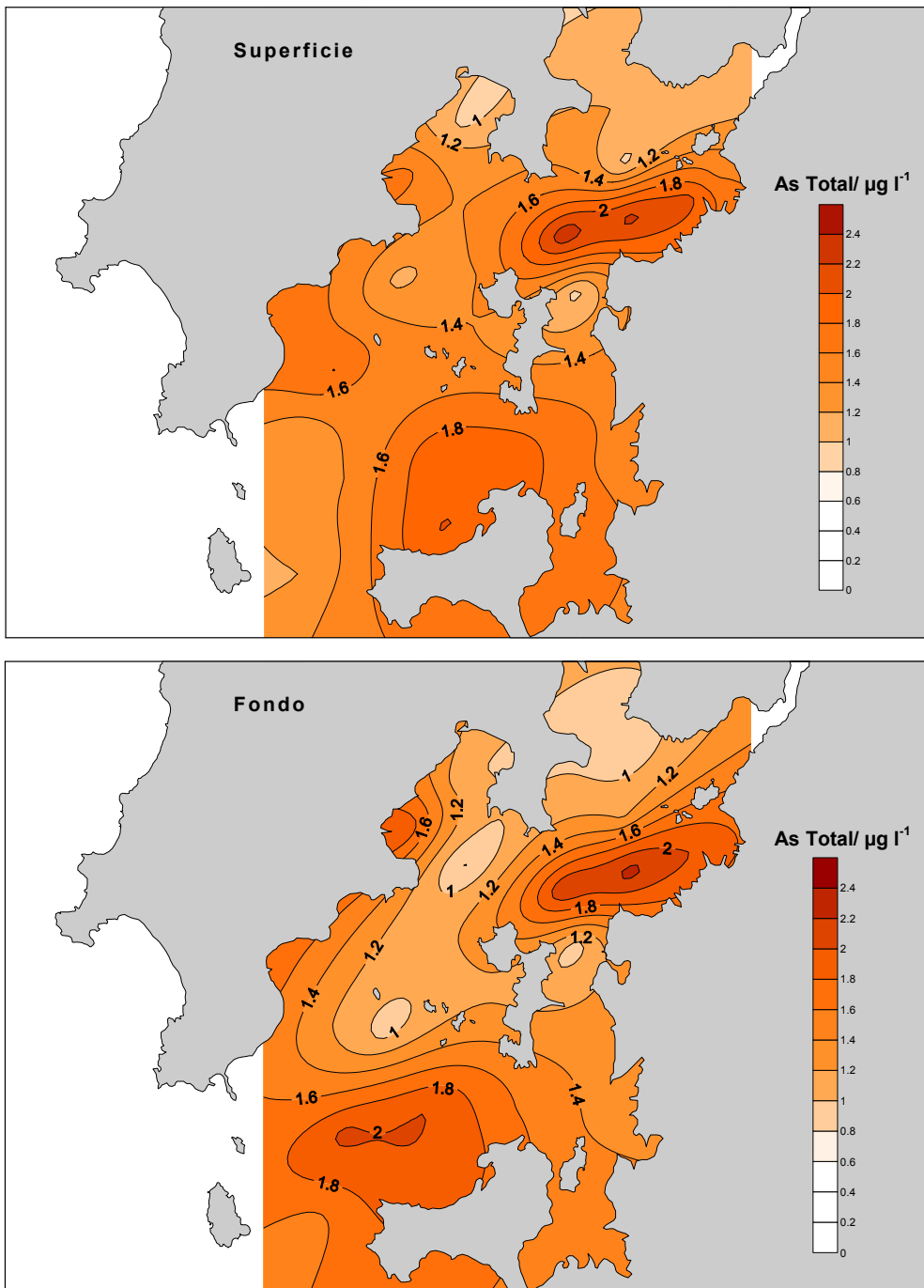


Figura 13. Distribución de As total en muestras de agua de mar de la Ría de Arousa (08/07/03).

2.2.3 Distribución de Cr total

Se ha aplicado el método optimizado para la determinación del contenido Cr total disuelto (ver 2ª parte capítulo 4) en muestras de agua de mar tomadas en la Ría de Arousa en el verano del 2003. Los valores obtenidos (Tabla 5) superan los límites de detección y cuantificación del método, $0,04 \mu\text{g l}^{-1}$ de Cr total y $0,14 \mu\text{g l}^{-1}$ de Cr total, respectivamente.

Tabla 5. Concentración de Cr total expresada en $\mu\text{g l}^{-1}$ de las muestras de agua de mar recogidas en la Ría de Arousa (08/07/03).

Estación	Superficie	Fondo	5 m
1	$0,56 \pm 0,06$	$0,53 \pm 0,03$	
2	$0,61 \pm 0,05$	$0,52 \pm 0,03$	
3	$0,57 \pm 0,00$	$0,46 \pm 0,01$	$0,46 \pm 0,02$
4	$0,44 \pm 0,03$	$0,34 \pm 0,02$	$0,37 \pm 0,01$
5	$0,52 \pm 0,02$	$0,39 \pm 0,00$	$0,42 \pm 0,02$
6	$0,49 \pm 0,01$	$0,51 \pm 0,02$	$0,47 \pm 0,01$
7	$0,42 \pm 0,02$	$0,41 \pm 0,02$	$0,36 \pm 0,03$
8	$0,49 \pm 0,00$	$0,51 \pm 0,01$	
9	$0,61 \pm 0,04$	$0,48 \pm 0,03$	
11	$0,48 \pm 0,01$	$0,42 \pm 0,02$	
12	$0,54 \pm 0,04$	$0,52 \pm 0,01$	
13	$0,68 \pm 0,10$	$0,72 \pm 0,14$	
14	$0,60 \pm 0,03$	$0,46 \pm 0,05$	
15	$0,59 \pm 0,02$	$0,57 \pm 0,03$	
16	$0,65 \pm 0,06$	$0,59 \pm 0,04$	
18	$0,33 \pm 0,03$	$0,27 \pm 0,02$	
19	$0,37 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,02$	
20	$0,33 \pm 0,03$	$0,31 \pm 0,07$	
21	$0,22 \pm 0,01$	$0,23 \pm 0,04$	
22	$0,38 \pm 0,03$	$0,39 \pm 0,01$	
23	$0,44 \pm 0,05$	$0,44 \pm 0,01$	
24	$0,52 \pm 0,00$	$0,40 \pm 0,02$	
25	$0,33 \pm 0,04$		
26	$0,46 \pm 0,03$		

La concentración de Cr total en todas las estaciones es superior a $0,2 \mu\text{g l}^{-1}$ de Cr total, la concentración considerada normal según Turekian⁹. No obstante los valores obtenidos están muy lejos del valor límite $50 \mu\text{g l}^{-1}$ de Cr total, establecido por la Ley 8/2001 (BOE 25/09/01). En la superficie oscilan entre $0,22$ - $0,68 \mu\text{g l}^{-1}$ de Cr total, mientras que en el fondo oscilan entre $0,23$ - $0,72 \mu\text{g l}^{-1}$ de Cr total.

En general los valores obtenidos en el fondo son ligeramente inferiores a los de superficie comparando las concentraciones de las muestras tomadas de cada estación para los dos niveles de profundidad, obteniendo una buena correlación como se refleja en la figura 14.

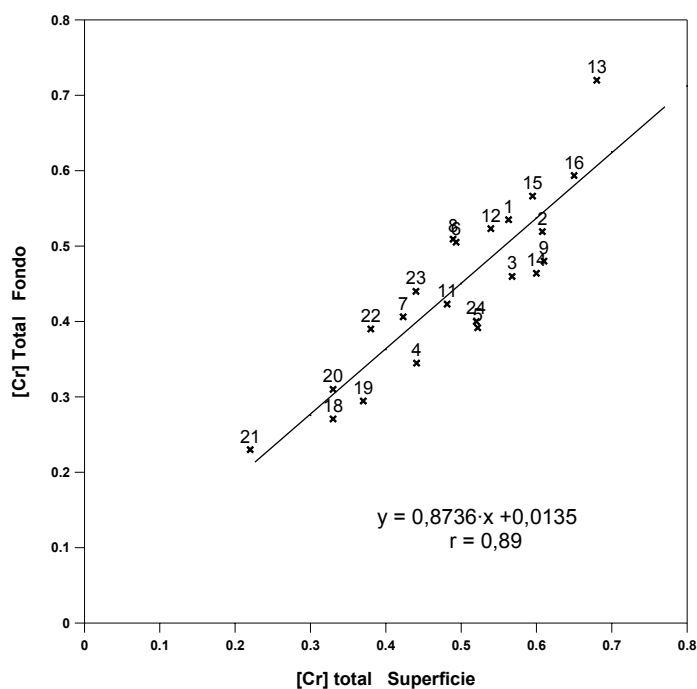


Figura 14. Relación entre la concentración de Cr total en la superficie y el fondo.

Parece que la actividad portuaria afecta a la concentración de Cr, ya que los puntos de mayor concentración se han encontrado en las proximidades de puertos

importantes: Vilagarcía de Arousa, Riveira y O Grove (Figura 11). Como se puede observar en los mapas de distribución de Cr total en la Ría de Arousa (Figura 15), los máximos de Cr se encuentran en 3 diferentes áreas: una en el interior hacia la costa sur (estaciones 1 y 2), otra en la parte exterior hacia la costa norte (estaciones 15 y 16) y una última entre la península de O Grove y la Isla de Arousa (estación 13). A pesar que la estación 13 está algo alejada del puerto de O Grove, teniendo en cuenta las corrientes superficiales y la situación del puerto se comprende esta lejanía. El puerto de O Grove está ubicado en la costa noreste de la península, cerca de la Isla de A Toxa, zona de escasa profundidad y muy acotada por el perfil costero, así que el tráfico debe dirigirse hacia el canal principal de la ría, pasando por la estación 13. Además las corrientes superficiales dominantes en esa zona se tiene dirección Este-Oeste, la misma dirección de tránsito para este puerto.

La estación 21, situada al norte de la ensenada de A Pobra do Caramiñal, presenta las concentraciones más bajas, $0,22 \mu\text{g l}^{-1}$ de Cr total en la superficie y $0,23 \mu\text{g l}^{-1}$ de Cr total en el fondo. Se trata de una zona muy protegida donde apenas llega la corriente principal procedente de la cabecera de la ría, por lo que la dispersión de Cr desde las proximidades de Vilagarcía no llega hasta esta estación.

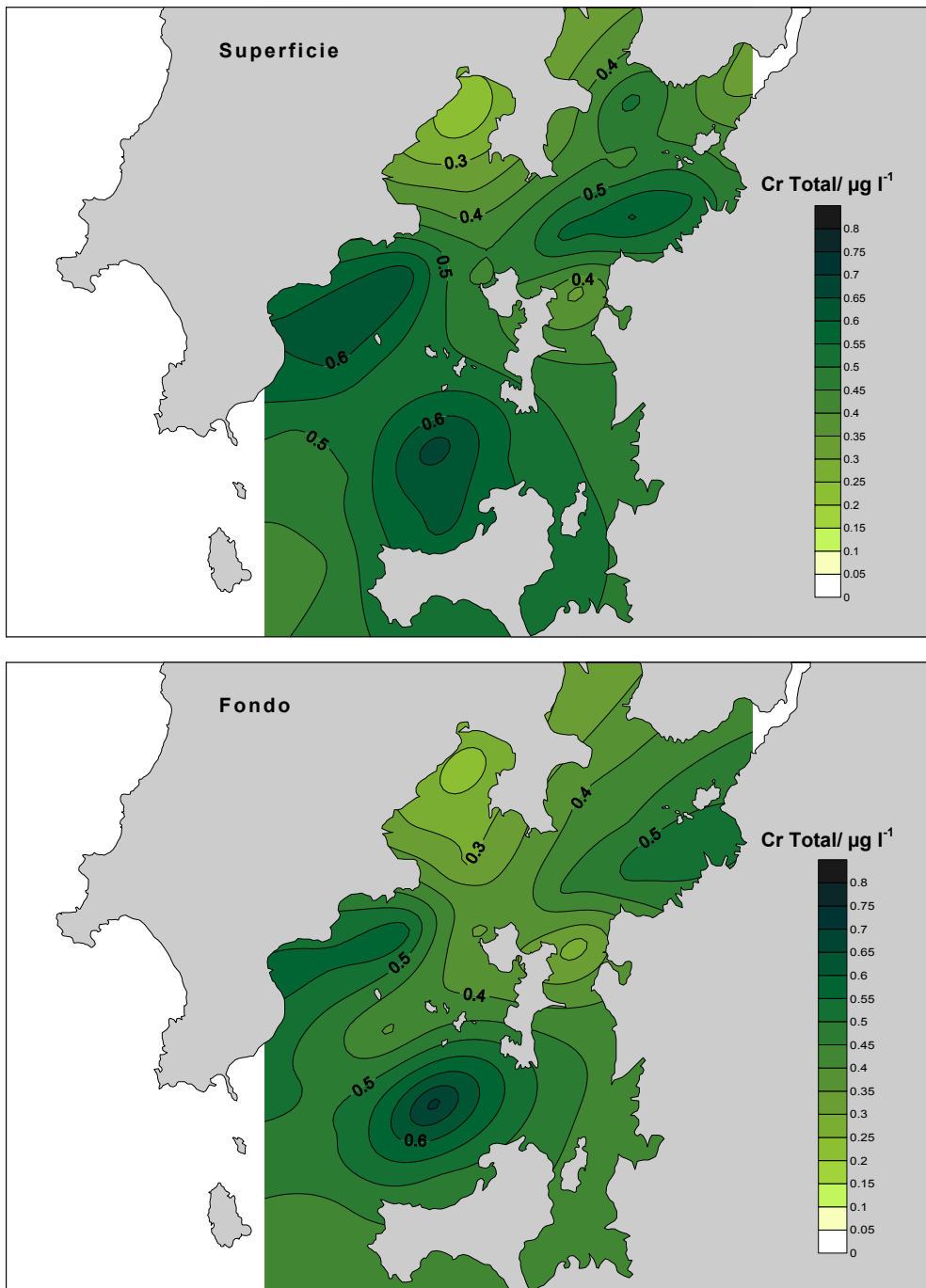


Figura 15. Distribución de Cr total en muestras de agua de mar de la Ría de Arousa (08/07/03).

2.2.4 Distribución de Cr(VI)

Las concentraciones de Cr(VI) son muy similares en todos los puntos de la ría analizados. El rango de concentración oscila entre 0,03-0,08 $\mu\text{g l}^{-1}$ de Cr(VI) en las muestras de superficie y entre 0,04-0,09 $\mu\text{g l}^{-1}$ de Cr(VI) para las muestras del fondo (Tabla 6). A pesar de que las concentraciones son bastante bajas, todas ellas superan el límite de detección y de cuantificación del método propuesto (LOD 0,007 $\mu\text{g l}^{-1}$ y LOQ 0,023 $\mu\text{g l}^{-1}$).

Tabla 6. Concentración de Cr(VI) expresada en $\mu\text{g l}^{-1}$ de las muestras de agua de mar recogidas en la Ría de Arousa (08/07/03).

Estación	Superficie	Fondo	5 m
1	0,07 ± 0,02	0,06 ± 0,00	
2	0,07 ± 0,03	0,06 ± 0,01	
3	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,01
4	0,05 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,00
5	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,01
6	0,06 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,07 ± 0,01
7	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,07 ± 0,00
8	0,03 ± 0,01	0,09 ± 0,01	
9	0,07 ± 0,02	0,07 ± 0,01	
11	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,01	
12	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01	
13	0,06 ± 0,01	0,08 ± 0,00	
14	0,07 ± 0,00	0,05 ± 0,02	
15	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	
16	0,06 ± 0,02	0,06 ± 0,01	
18	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01	
19	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,01	
20	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,01	
21	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	
22	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	
23	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,02	
24	0,06 ± 0,00	0,05 ± 0,01	
25	0,05 ± 0,01		
26	0,07 ± 0,00		

Comparando los valores obtenidos en cada estación en la superficie y en el fondo se observa la misma uniformidad. Es decir, la concentración de Cr(VI) en las muestras tomadas en la Ría de Arousa presentan homogeneidad tanto horizontal como vertical. La distribución de Cr(VI) en la Ría de Arousa se representa en la figura 16.

Únicamente cabe destacar la situación encontrada en la estación 8, en la boca norte. Las concentraciones obtenidas en la superficie y el fondo para esta estación son las más dispares, coincidiendo con los valores mínimo y máximo.

En la Ley 8/2001, de *Protección de la Calidad de las Aguas de las Rías de Galicia y de Ordenación del Servicio Público de Depuración de Aguas Residuales Urbanas*, publicado en el BOE del 25 de septiembre del 2001 se establece como límite $5 \mu\text{g l}^{-1}$ de Cr(VI). Curiosamente, el cromo es el único metal que además del contenido total regulan la concentración de una de sus especies. Esta ley también regula los valores límite en caso de vertido, especificando el máximo para la media mensual y diaria y el valor máximo puntual; que en este caso son $0,2 \mu\text{g l}^{-1}$, $0,4 \mu\text{g l}^{-1}$ y $0,5 \mu\text{g l}^{-1}$ de Cr(VI).

No existe problema por contaminación de Cr(VI) en la Ría de Arousa porque los niveles de concentración obtenidos de las muestras recogidas el 8 de julio de 2003 se encuentran entre $0,03$ - $0,08 \mu\text{g l}^{-1}$ de Cr(VI), muy por debajo del límite establecido, $5 \mu\text{g l}^{-1}$ de Cr(VI), por la ley citada anteriormente.

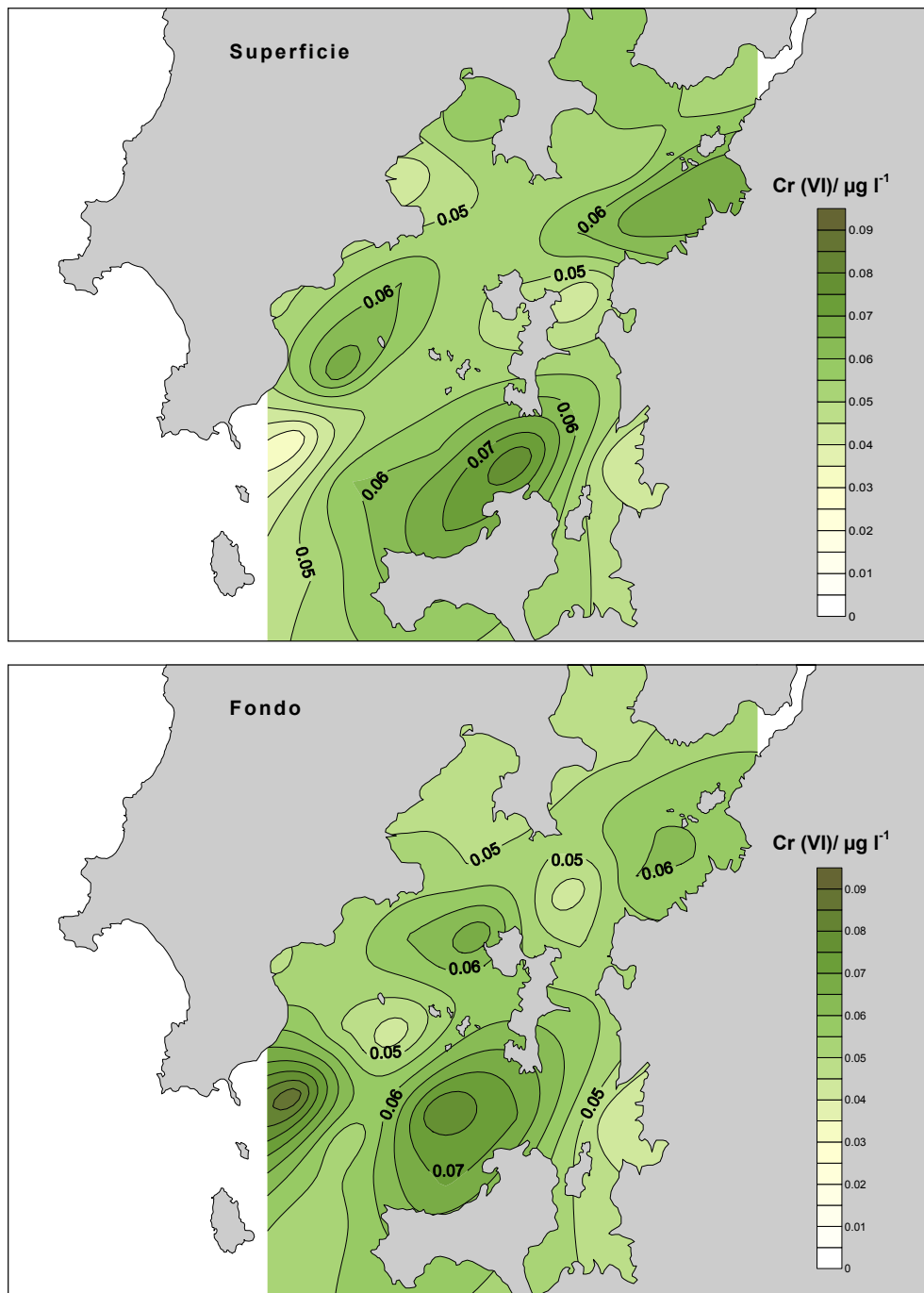


Figura 16. Distribución de Cr(VI) en muestras de agua de mar de la Ría de Arousa (08/07/03).

2.2.5 Estudio quimiométrico

Con la ayuda de un CTD se han registrado la temperatura, salinidad y densidad de la columna de agua en cada uno de los puntos de muestreo. Como ya se ha comentado en la introducción de este capítulo, estos parámetros sirven para la caracterización de las diferentes masas de agua y además condicionan la circulación residual. Por ello, deben tenerse en cuenta en el estudio de la dispersión de contaminantes en el agua de mar.

Se han empleado herramientas estadísticas para evaluar la relación entre los factores físicos y las concentraciones de las As y Cr obtenidas, con la ayuda del programa Statistica 6.0, Statsoft, USA.

2.2.5.1 Pretratamiento de datos

Antes de llevar a cabo un estudio quimiométrico se deben tratar los datos para mejorar los resultados o evitar que se obtengan resultados incorrectos o absurdos. Las modificaciones a tener en cuenta son: el relleno de huecos, el cambio de escala, el centrado y la eliminación de valores anómalos.

En este caso las magnitudes y las unidades de las variables a comparar son muy dispares, por tanto resulta imprescindible la homogeneización de los datos. Para la normalización se ha empleado la transformación “*Half-range and central value*” recomendada por Moreda-Piñeiro et al.³³ considerando el valor central (*central value*) y el rango medio (*half-range*) de cada variable. Aplicando las siguientes fórmulas a cada columna de la matriz de datos se homogeneizan los valores transformándola en una matriz cuyos valores oscila entre -1 y +1.

$$\text{Valor central } C_{vj} = \frac{\text{Max}(x_j) + \text{Min}(x_j)}{2}$$

$$\text{Rango medio } h_{rj} = \frac{\text{Max}(x_j) - \text{Min}(x_j)}{2}$$

$$\text{Valor transformado } X_{j \text{ transform}} = \frac{X_{ij} - C_{v_j}}{h_{r_j}}$$

2.2.5.2 Análisis factorial

Una de las técnicas estadísticas para el estudio del comportamiento de una matriz de datos es el análisis factorial mediante el cual se intenta identificar las variables fundamentales que expliquen la configuración de los grupos de datos y correlaciones observadas³⁴. Generalmente una de las mejores formas para visualizar una nube de datos consiste en la reducción de dimensiones proyectando los objetos sobre planos oblicuos definidos por vectores que son combinaciones lineales de las variables de la matriz. Se recomienda el uso de los componentes principales, que surgen de la rotación propia de los datos, para la primera exploración de los datos. Los componentes principales buscan la mínima varianza residual y la máxima varianza explicada. La suma de la varianza explicada de cada componente principal con las anteriores nos da la varianza acumulada. Este valor indica el porcentaje de la información contenida en el modelo respecto a la información total de la matriz de datos original que nos puede ayudar a decidir cual es el número mínimo de componentes principales necesarias para explicar el modelo con la menor pérdida de información posible.

Se ha realizado un análisis factorial mediante componentes principales sin rotación, considerando la profundidad, temperatura, salinidad, concentración de As total, concentración de Cr total y concentración de Cr(VI) para todas las muestras tomadas en la superficie, a 5 m en las estaciones del canal principal y en el fondo. Se han descartado los datos de densidad porque se trata de una función de la temperatura y la salinidad y esta dependencia podría incluir sesgos en el análisis factorial. Tampoco se ha considerado las concentraciones de As(III) ya que no superan el límite de cuantificación del método.

A la vista de los valores propios obtenidos (Tabla 7) se comprueba que es posible la representación de los datos en 2 dimensiones ya que la varianza explicada acumulada de las 2 primeras componentes principales roza el 70%.

Tabla 7. Valores propios y varianza explicada acumulada para los componentes principales obtenidos del análisis factorial aplicado a las muestras de la Ría de Arousa (08/07/03).

	Valor propio	%Varianza	Valor propio Acumulado	%Varianza Acumulado
1	2,27	37,81	2,27	37,81
2	1,91	31,76	4,17	69,57
3	0,77	12,85	4,94	82,42
4	0,54	9,04	5,49	91,46
5	0,41	6,91	5,90	98,36
6	0,10	1,64	6,00	100,00

En la figura 17 se puede ver claramente la contribución de las variables sobre cada una de las componentes PC1 y PC2 mediante la representación del diagrama de cargas (*loadings*).

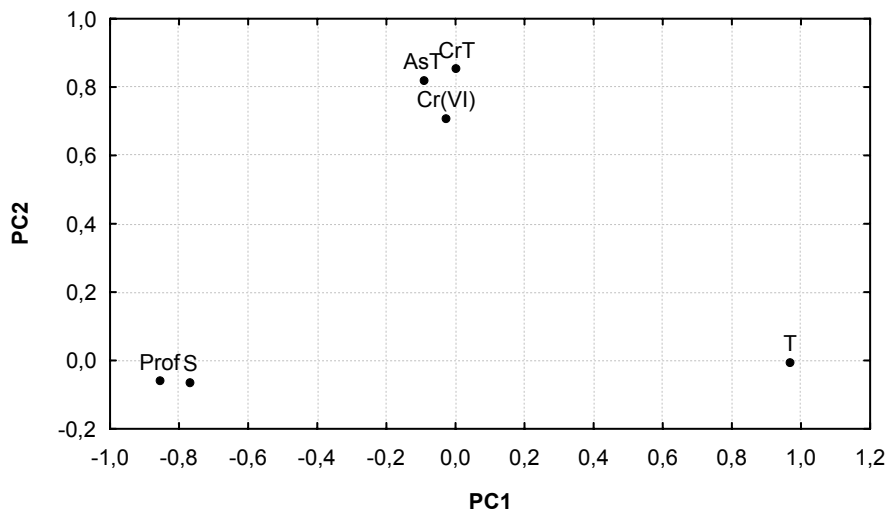


Figura 17. Diagrama de cargas para los componentes principales obtenidos del análisis factorial aplicado a las muestras de la Ría de Arousa (08/07/03). Las variables son profundidad (Prof), temperatura (T), salinidad (S), concentraciones de As total (AsT), Cr total (CrT) y Cr(VI).

2.2.5.3 Análisis de cluster

Otra técnica de exploración de pautas, conocida como análisis de cluster o conglomerados, consiste en la agrupación de los objetos o las variables según su similitud según la correlación o la distancia. Los resultados de este análisis suelen representarse mediante un dendrograma, esquema en el cual los objetos o las variables se agrupan jerárquicamente de acuerdo a sus similitudes³⁴.

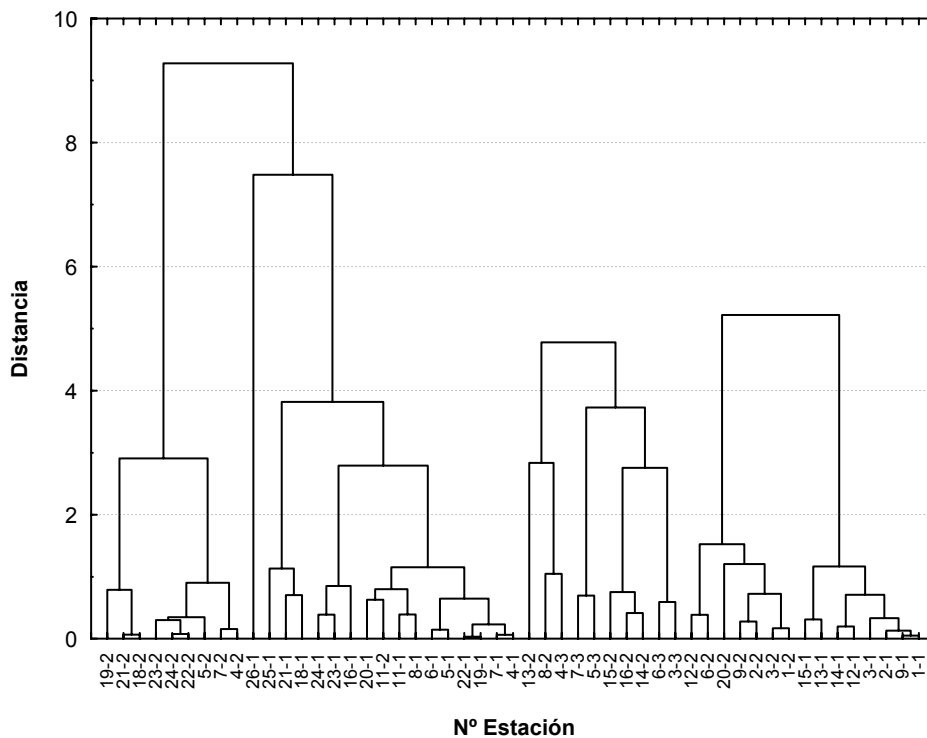


Figura 18. Dendrograma correspondiente a todos los casos obtenido mediante el método de Ward y la distancia Manhattan.

Con el fin de comprobar si existen pautas de comportamiento entre las estaciones se ha realizado un análisis de cluster. El dendrograma obtenido (Figura 18) mediante el método de Ward y el cálculo de la distancia mediante Manhattan refleja una agrupación en 3 bloques dentro de los cuales se subdividen en

muestras de superficie y de fondo. Las muestras se han codificado indicando en numero de estación, seguido de un 1 para las muestras tomadas de la superficie, 2 para las de 5 m de profundidad y 3 para las muestras tomadas en el fondo.

Por ello, se ha decidido repetir el análisis de cluster estudiando por un lado las muestras de superficie (Figura 19) y por otro las de fondo (Figura 20). En ambos casos se han obtenido 3 grupos por debajo de una distancia de 6. Aunque con ligeras diferencias se observan pautas comunes: un grupo corresponde las estaciones de la desembocadura y la costa norte de la parte interna (21, 23,24). Y otro grupo lo forman las estaciones del canal principal próximas a Vilagarcía (1, 2, 3), la situada frente al puerto de Ribeira (15) y las estaciones próximas al puerto del O Grove (9, 12, 13).

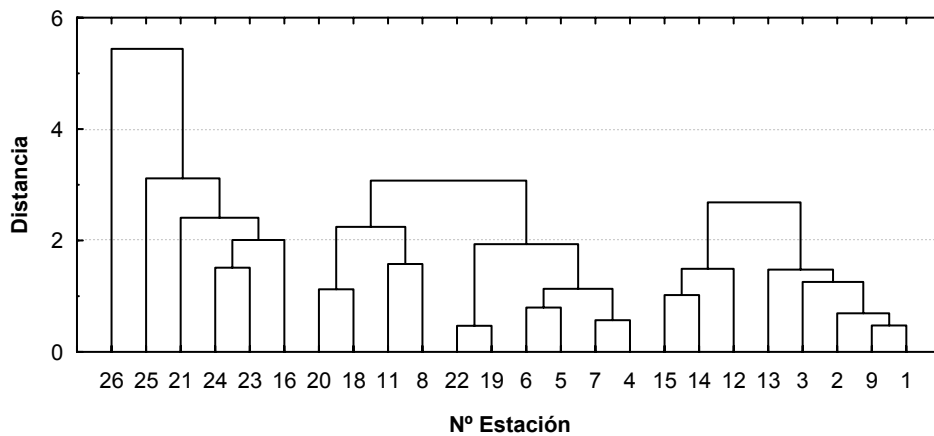


Figura 19. Dendrograma correspondiente a las muestras de superficie obtenido mediante el método de Ward y la distancia Manhattan.

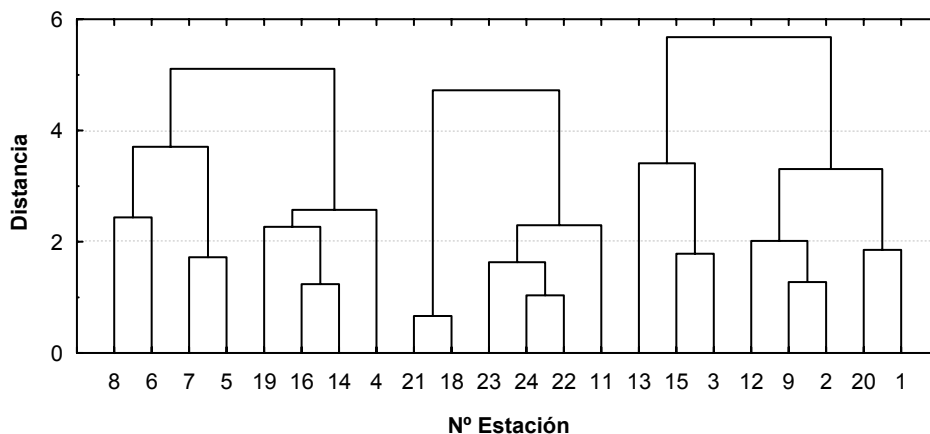


Figura 20. Dendrograma correspondiente a las muestras de fondo obtenido mediante el método de Ward y la distancia Manhattan.

En conclusión, el estudio de los componentes principales refleja la independencia entre las variables físicas (profundidad, temperatura y salinidad) y las variables químicas (concentración de As total, Cr total y Cr(VI)); ya que es posible la reducción de las dimensiones al plano definido por la 2 primeras componentes principales definidas por un lado por las variables físicas y por otro por las variables químicas. Mediante el análisis de cluster se corrobora la influencia de la actividad portuaria sobre la concentración de As y Cr disuelto en el mar, que se ha encontrado al comparar la concentración de Cr total con el mapa de corrientes (Figura 9).

3 Bibliografía

- [1]. Chester, R., *Marine Geochemistry*. 2º ed.; Blackwell Science Ltd: Malden, USA, **2003**.
- [2]. Lalli, C. M.; Parsons, T. R., *Biological Oceanography: An Introduction*. 1º ed.; Pergamon Press: Oxford, **1993**.
- [3]. Millero, F. J.; Sohn, M. L., *Chemical oceanography*. 1º ed.; CRC Press: Boca Raton, **1992**.
- [4]. Wilson, T. R. S., Salinity and the Major Elements of the Seawater. In *Chemical Oceanography*, 2º ed.; Riley, J. P.; Skirrow, G., Eds. Academic Press: London, **1975**; Vol. 1, pp 365-413.
- [5]. Diaz-Fierros Viqueira, F.; Antelo Cortizas, J. M., *As Augas de Galicia*. Consello da Cultura Galega: Santiago de Compostela, **1996**.
- [6]. Förstner, U.; Wittmann, G. T. W., *Metal Pollution in Aquatic Environment*. 2º ed.; Springer Verlag: Berlin, **1983**.
- [7]. Grasshoff, K.; Ehrhardt, M.; Kremling, K., *Methods of Seawater Analysis*. 2ª ed.; Chemie-Verlag: Weinheim, **1983**.
- [8]. Brewer, P. G., Minor Elements in Sea Water. In *Chemical Oceanography*, 2º ed.; Riley, J. P.; Skirrow, G., Eds. Academic Press: London, **1975**; Vol. 1, pp 416-496.
- [9]. Turekian, K. K., *Oceans*. Prentice-Hall: New York, **1968**.
- [10]. Rosón Porto, G.; Varela, R. A., *Manual de Oceanografía Física Descriptiva*. Servicio de Publicacións da Universidade de Vigo: Vigo, **2002**.
- [11]. Gabeiras Vérez, X. M.; Valiela Villar, J.; Lema Bouzas, L., *Onde Galicia é mar*. Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura. Xunta de Galicia: Santiago de Compostela, **1993**.
- [12]. Miller, W. L., Introduction and Overview. In *Chemistry in the Marine Environment*, Hester, R. E.; Harrison, R. M., Eds. The Royal Society of Chemistry: Cambridge, **2000**; Vol. 13, pp 1-12.
- [13]. Thurnan, H. V., *Essentials of Oceanography*. 5º ed.; Prentice-Hall: New Jersey, **1996**.
- [14]. Nienhuis, P. H., Distribution of organic matter in living marine organisms. In *Marine Organic Chemistry. Evolution, Composition, Interactions and Chemistry of Organic Matter in Seawater*, Duursma, E. K., Ed. Elsevier: Amsterdam, **1981**; Vol. 31, pp 31-69.
- [15]. Fairbridge, R. W., The Estuary: its definition and geodynamic cycle. In *Chemistry and Biogeochemistry of Estuaries*, Olausson, E.; Cato, I., Eds. John Wiley and Sons: Chichester, **1980**; pp 1-36.
- [16]. Duinker, J. C., Formation and Transformation of Elements Species in Estuaries. In *The Importance of Chemical Speciation in Environmental Processes*, Bernhard, M.; Brinckman, F. E.; Sadler, P. J., Eds. Springer-Verlag: Berlin, **1986**; pp 365-384.
- [17]. Martínez Graña, A. M., *Formación e dinámica das Rías Galegas*. Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura. Xunta de Galicia: Santiago de Compostela, **1994**.
- [18]. Otto, L., *Oceanography of the Ría de Arosa (NW Spain)*. Staatsdrukkerij's Gravenhage: Holanda, **1975**.
- [19]. Pascual, J. R., Un modelo de circulación inducida por el viento en la Ría de Arosa. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* **1987**, 4, (1), 107-120.
- [20]. Gomez-Gallego, J., Estudio de las condiciones oceanográficas en la Ría de Arousa, en verano. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* **1971**, 147, 1-39.
- [21]. Gonzalez, N.; Gonzalez, G. D.; Garcia, C.; Cabanas, J., Dinámica de nutrientes en las rías de Arosa y Muros (NW España). *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* **1979**, 269, 51-79.
- [22]. Iglesias, M. L.; Nunes, M. T., Variación anual de algunos parámetros físicos-químicos en la Ría de Arosa. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* **1982**, 7, (2), 181-190.

- [23]. Gonzalez, N.; Cabanas, J. M.; Iglesias, M. L.; Nunes, M. T., Introducción al estudio de la plataforma contigua a las Rías de Arosa y Muros (NW de España). I. Estudio químico. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* **1980**, 5, (4), 77-87.
- [24]. Guerrero-Perez, J.; Rodriguez-Puente, C.; Jornet Sancho, A., Estudio de metales pesados en aguas y sedimentos superficiales en las costas cantábrica y gallega. *Informes Técnicos Instituto Español de Oceanografía* **1988**, 64, 1-16.
- [25]. Prego, R.; Cobelo-García, A., Twentieth century overview of heavy metals in the Galician Rias (NW Iberian Peninsula). *Environmental Pollution* **2003**, 121, 425-452.
- [26]. Beiras, R.; Bellas, J.; Fernandez, N.; Lorenzo, J. I.; Cobelo-García, A., Assessment of coastal marine pollution in Galicia (NW Iberian Peninsula); metal concentrations in seawater, sediments and mussels (*Mytilus galloprovincialis*) versus embryo-larval bioassays using *Paracentrotus lividus* and *Ciona intestinalis*. *Marine Environmental Research* **2003**, 56, 531-553.
- [27]. Cobelo-García, A.; Prego, R.; DeCastro, M., Metal distributions and their fluxes at the coastal boundary of a semi-enclosed ria. *Marine Chemistry* **2005**, 97, 277-292.
- [28]. Peña-Vázquez, E.; Villanueva-Alonso, J.; Bermejo-Barrera, A.; Bermejo-Barrera, P., Arsenic and antimony distribution in the Ria de Arousa: before and after the Prestige oil tanker sinking. *J. Environ. Monit.* **2006**, 8, 641-648.
- [29]. Crompton, T. R., *Analysis of Seawater. A Guide for the Analytical and Environmental Chemist*. Springer Verlag: Berlin, **2006**.
- [30]. Cressie, N. A. C., *Statistics for spatial data*. Rev. ed.; Wiley: New York, **1993**; p xx, 900 p.
- [31]. Dyrssen, D.; Wedborg, M., Mayor and minor elements, chemical speciation in estuarine waters. In *Chemistry and Biogeochemistry of Estuaries*, Olausson, E.; Cato, I., Eds. John Wiley and Sons: Chichester, **1980**; pp 71-120.
- [32]. Burton, J. D.; Stratham, P. J., Trace metals in seawater. In *Heavy Metals in the Marine Environment*, Furness, R. W.; Rainbow, P. S., Eds. CRC Press: Boca Raton, Florida, **1990**; pp 5-26.
- [33]. Moreda-Piñeiro; Marcos, A.; Fisher, A.; Hill, S. J., Evaluation of the effect of data pre-treatment procedures on classical pattern recognition and principal components analysis: a case study for the geographical classification of tea. *J. Environ. Monit.* **2001**, 3, 352-360.
- [34]. Ramis-Ramos, G.; García Álvarez-Coque, M. C., *Quimiometría*. Ed. Síntesis: Madrid, **2001**.

CAPÍTULO 6

CAPÍTULO 6

Conclusiones

Disponer de métodos analíticos que permitan la determinación de las diferentes especies químicas de los metales traza es uno de los grandes retos para los químicos marinos, dada su importancia para poder comprender el papel de los metales traza en el ciclo biogeoquímico. Con este trabajo se realiza una pequeña aportación en este campo.

ETAAS

La formación de quelatos volátiles, usando β -dicetonas como ligando, permite la separación de los diferentes estados de oxidación, siendo posible su especiación de forma sencilla. Se han optimizado los métodos para la determinación de Cr(VI) en muestras de agua y de agua de mar usando el TFA como agente complejante mediante ETAAS. El TFA reacciona selectivamente con Cr(III) formando un quelato muy volátil, el cual se evapora antes de la determinación de Cr(VI) en la cámara de grafito.

Tanto para el agua como para el agua de mar se han obtenido resultados satisfactorios. Los métodos optimizados son selectivos, sensibles, precisos y exactos.

No obstante, la concentración de Cr en las muestras de agua de mar tomadas en la Ría de Arousa (07/02/03) es muy baja por lo que es necesario un método con mayor sensibilidad.

Las características analíticas de los métodos propuestos se detallan en la siguiente tabla.

		Agua	Agua de mar
Sensibilidad	LOD/ $\mu\text{g l}^{-1}$	0,15	0,5
	LOQ/ $\mu\text{g l}^{-1}$	0,52	1,8
	m_0 / pg	$6,1 \pm 0,5$	$7,3 \pm 0,5$
Precisión	CV/ %	5,8	6,4
	Recuperación/ %	99,6	101,8
Exactitud	CRM 544		
	$22,8 \pm 1,0 \mu\text{g l}^{-1}$	$22,8 \pm 1,5 \mu\text{g l}^{-1}$	-----

FI-ETAAS

Otro ligando que forma quelatos de forma selectiva según el estado de oxidación del elemento es el APDC, el cual ha sido empleado para la especiación de As y Cr en muestras de agua de mar mediante un sistema FI-ETAAS usando un reactor anudado para la separación y preconcentración del complejo.

Una de las principales ventajas de este modo de preconcentración radica en la determinación directa As(III) y Cr(VI), las formas más tóxicas de As y Cr. Esto es posible dada la selectividad de APDC en la reacción de formación del quelato precisamente con las especies más tóxicas de ambos metales. De este modo se evita la suma de los posibles errores cometidos en el análisis de una de las especies inorgánicas y del contenido total, al calcular por diferencia la concentración de la otra especie.

Empleando un equipamiento sencillo, un equipo Perkin-Elmer FIAS 400 acoplado a un espectrómetro Perkin-Elmer Model 4100ZL se ha desarrollado un método

para la especiación de As en agua de mar. El uso de un reactor anudado para la adsorción del complejo As-APDC permitiendo la separación y preconcentración de As(III), ha resultado muy eficaz, alcanzado un factor de preconcentración de 44.

La concentración de As total se ha determinado empleando el mismo sistema FI-ETAAS con una pequeña modificación, el acoplamiento de un microondas focalizado donde tiene lugar la etapa de prerreducción. Para ello se ha añadido la disolución reductora 0,25% (m/v) L-cisteína/ 0,1 M HCl, la cual se mezcla con la muestra antes de la entrada en el microondas. La función del microondas focalizado consiste en la aceleración de la transformación del contenido en las muestras de As(V) a As(III). Una vez reducido se somete a las mismas etapas que para la determinación de As(III).

Las características analíticas de los métodos propuestos para la especiación de As reflejan la gran sensibilidad, buena precisión y exactitud para los dos métodos.

		As(III)	As Total
Sensibilidad	LOD/ ng l ⁻¹	8	16
	LOQ/ ng l ⁻¹	23	53
	m _o / pg	0,5 ± 0	8,5 ± 0,2
Precisión	CV/ %	4,5	4,3
	Recuperación/ %	97,8 ± 2,6	99,8 ± 1,9
Exactitud	NASS-4	---	1,27 ± 0,09 µg l ⁻¹
	1,26 ± 0,09 µg l ⁻¹	---	---
Factor de preconcentración		44	18

Además se ha comprobado la selectividad del método de determinación de As(III) mediante el estudio de interferencias de todos los cationes que podrían formar complejos con el APDC, compitiendo con el As(III). De todos ellos, únicamente se

ha observado una ligera interferencia producida por Fe(II) con valores de recuperación entre 111 y 119% para 4, 10 y 100 $\mu\text{g l}^{-1}$ de Fe.

A continuación se han optimizado los parámetros para la especiación de Cr empleando el mismo método de separación y preconcentración “on-line” mediante la adsorción del complejo Cr(VI)-APDC en las paredes de un reactor anudado y posterior determinación en ETAAS.

En este caso para la determinación de Cr total se ha incluido una etapa de preoxidación con el fin de transformar el Cr(III) a Cr(VI) con la ayuda de un microondas focalizado y utilizando $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ al 0,15% (m/v) como oxidante.

Las características analíticas que se muestran en la siguiente tabla demuestran la sensibilidad, precisión y exactitud de los métodos para la determinación de Cr(VI) y Cr total disuelto en agua de mar. También se ha comprobado su selectividad, las interferencias aparecen a niveles de concentración muy superiores a los habituales en agua de mar.

		Cr(VI)	Cr Total
Sensibilidad	LOD/ ng l^{-1}	7	40
	LOQ/ ng l^{-1}	23	140
	m/ pg	$0,7 \pm 01$	$1,5 \pm 0,1$
Precisión	CV/ %	4,4	3,3
Exactitud	Recuperación/ %	$99,3 \pm 1,7$	$101,2 \pm 1,2$
Factor de preconcentración		31	12

Los niveles de concentración de los metales disueltos en el agua de mar son extremadamente bajos. El no disponer de una técnica analítica lo suficiente sensible supone el mayor inconveniente para realizar su determinación. Con este

método se ha resuelto este problema ya que se alcanzan límites de detección extraordinariamente bajos, del orden de ng l^{-1} , sin necesidad de una gran inversión en equipamiento.

Estudio de la Ría de Arousa

Estos métodos para la determinación “on-line” de As y Cr han sido aplicados en muestras de agua de mar tomadas en la Ría de Arousa en el verano de 2003.

Teniendo en cuenta la gran extensión de la ría, el número de puntos fijados únicamente permiten obtener una visión general de la distribución de la concentración de As y Cr en la Ría de Arousa. Además el agua de mar está en constante movimiento y renovación, por tanto este estudio refleja únicamente la situación en el verano de 2003 y esta no se puede extrapolar a la actualidad.

Distribución de As

En primer lugar se ha analizado el contenido de As total, obteniendo valores que oscilan entre 0,77 y 2,36 $\mu\text{g l}^{-1}$. Las muestras tomadas tanto en la superficie como en el fondo presentan un comportamiento muy similar aunque la concentración en el fondo, por lo general, es ligeramente inferior. Los valores más elevados se encuentran en las estaciones situadas en el interior de la ría coincidiendo con el canal de entrada al puerto de Vilagarcía de Arousa, uno de los núcleos de población más importante.

A continuación se ha analizado la concentración de As(III) en las mismas muestras. A pesar que en la mayoría de las estaciones se ha detectado una concentración muy baja de As(III), no se puede concretar su concentración puesto que todos los valores están por debajo del límite de cuantificación del método establecido en 0,023 $\mu\text{g l}^{-1}$ de As. Estos resultados concuerden con lo esperado,

ya que según cálculos termodinámicos el arsénico en agua de mar suficientemente oxigenada debería encontrarse mayoritariamente como arsenato, As (V).

A la vista de los resultados de este estudio se puede afirmar que la Ría de Arousa no presentaba problemas de contaminación por arsénico en sus aguas en verano del 2003, ya que los niveles de concentración obtenidos están muy por debajo de $50 \mu\text{g l}^{-1}$ de As total, límite establecido en la Ley 8/2001, de *Protección de la Calidad de las Aguas de las Rías de Galicia y de Ordenación del Servicio Público de Depuración de Aguas Residuales Urbanas*, publicado en el BOE del 25 de septiembre del 2001. Y además la concentración de As(III), la especie más tóxica es insignificante, por lo no existía contaminación por As en la Ría de Arousa.

Distribución de Cr

Al analizar el contenido de Cr total se han encontrado concentraciones superiores a $0,2 \mu\text{g l}^{-1}$, concentración considerada como normal según Turekian, en todas las estaciones tanto en superficie como en el fondo. Los valores obtenidos oscilan entre $0,22$ - $0,72 \mu\text{g l}^{-1}$ de Cr total. No obstante, esta situación no es preocupante ya que están lejos del valor límite $50 \mu\text{g l}^{-1}$ de Cr total, establecido por la Ley 8/2001 citada anteriormente.

Se haya una relación entre la ubicación de los puertos de Vilagarcía de Arousa, Ribeira y O Grove y los puntos de mayor concentración, por lo que parece que la actividad portuaria provoca un incremento de la concentración de Cr total.

La concentración de Cr(VI) en las muestras tomadas en la Ría de Arousa presenta gran homogeneidad en su distribución tanto horizontal como vertical, oscilando entre $0,03$ - $0,09 \mu\text{g l}^{-1}$ de Cr(VI). Por tanto, no existía contaminación de Cr(VI) en la Ría de Arousa porque los niveles de concentración obtenidos se encuentran muy por debajo $5 \mu\text{g l}^{-1}$ de Cr (VI), límite establecido por la Ley 8/2001.

Estudio quimiométrico

Se ha realizado un estudio estadístico para evaluar la influencia de la dinámica estuárica con la distribución de As y Cr. Mediante el análisis de los componentes principales se observa la independencia entre las variables físicas (profundidad, temperatura y salinidad) y las variables químicas (concentración de As total, Cr total y Cr(VI)); ya que es posible la reducción de las dimensiones al plano definido por las 2 primeras componentes principales definidas por un lado por las variables físicas y por otro por las variables químicas.

Por otro lado el análisis de cluster corrobora la influencia de la actividad portuaria sobre la concentración de As y Cr disuelto en el mar, que se ha encontrado al comparar los valores de concentración de Cr total con el mapa de corrientes residual de la Ría de Arousa propuesto por Otto y confirmado posteriormente por otros autores.

ANEXO

Flow on-line sorption preconcentration in a knotted reactor coupled with electrothermal atomic absorption spectrometry for selective As(III) determination in sea-water samples

Paloma Herbello-Hermelo, M. Carmen Barciela-Alonso, Adela Bermejo-Barrera and Pilar Bermejo-Barrera*

Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Chemistry, University of Santiago de Compostela, E-15782 Santiago de Compostela, Spain.
E-mail: pbermejo@usc.es; Fax: 34 981 595012; Tel: 34 981 591079

Received 3rd November 2004, Accepted 10th May 2005
First published as an Advance Article on the web 23rd May 2005

A flow injection on-line sorption preconcentration system using a polytetrafluoroethylene (PTFE) knotted reactor was coupled with electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS) to determine selectively As(III) in sea-water samples. Separation of arsenic inorganic species was achieved by the on-line formation of As(III)–pyrrolidine dithiocarbamate (PDC) complex in an acid medium, its sorption onto the inner walls of the knotted reactor (KR) and elution with 40 μl of ethanol. An enhancement factor (EF) of 44 was obtained compared with the slope of the linear portion of the calibration curve before and after preconcentration. The detection limit (3 s) was 0.008 $\mu\text{g l}^{-1}$ As(III). The precision (RSD $n = 11$) was 4.5% at 0.1 $\mu\text{g l}^{-1}$ As(III). The accuracy was demonstrated by total arsenic determination in certified reference material, NASS-4, after pre-reduction of As(V) with L-cysteine 0.25% (m/v).

Introduction

The toxicity of arsenic depends on its chemical form, As(III), or arsenite, being the most toxic.¹ The total arsenic concentration in clean coastal and ocean waters is between 1–3 $\mu\text{g l}^{-1}$, so highly sensitive and selective techniques are required to determine arsenic species.² The use of knotted reactors (KR) was first proposed by Fang *et al.*³ Subsequently, Sperling *et al.*⁴ and Yan *et al.*⁵ extended the use to applications in on-line preconcentration for ETAAS. This system allows the analysis to be conducted at low cost, owing to the nearly unlimited lifetime and ease of construction of KR, good stability sorption properties and permits the use of higher sample loading rates for achieving higher sensitivity.^{6–10} In this paper, we have proposed a new application of flow on-line sorption preconcentration in a knotted reactor for As(III) determination in sea-water samples by ETAAS. Selective determination of As(III) in the presence of As(V) was obtained by selective formation of As(III)–pyrrolidinedithiocarbamate (PDC) complex, its simultaneous sorption onto the inner walls of the KR, elution with ethanol and detection by ETAAS.

Experimental

Instrumentation

A PerkinElmer Model 4100 ZL atomic absorption spectrometer with a transversely heated graphite tube atomizer (THGA) and Zeeman-effect background correction, equipped with AS-71 furnace autosampler, was employed throughout this work. An electrodeless discharge lamp for As was used as the radiation source at 193.7 nm wavelength with a spectra slit width of 0.7 nm. Standard pyrolytically coated polycrystalline electrographite THGA tubes with an integrated L'vov platform were used. The spectrometer was operated in the FIAS-furnace mode controlled by AAWinLab software 4.01. A PerkinElmer FIAS-400 flow injection system equipped with two individually controlled peristaltic pumps and standard rotary injector valve (four-port on the rotor and five-port on the stator), were used for the FI on-line sorption preconcentration

and separation. An additional 6 position/6 port selection valve, Rheodyne, was used. Several laboratory-made KRs from PTFE tubing of 0.5 mm id and different lengths were used for the sorption of the analyte complex. Tygon pump tubes (PerkinElmer) were employed to propel the sample, reagent, eluent and air. Different lengths of PTFE tubing were used as the eluent loop.

Reagents

All reagents were of the highest available purity and at least of analytical grade. Ultrapure water (18 $\text{M}\Omega \text{ cm}^{-1}$), obtained from a Milli-Q (Millipore, USA) purification system, was used to prepare all reagents and standard solutions. A 0.05% m/v solution of ammonium pyrrolidine dithiocarbamate (APDC) was prepared daily by dissolution of a 1.0% stock solution of APDC in water. This stock solution was prepared as an ammonium salt of pyrrolidinedithiocarbamate (Sigma, Germany). A hydrochloric acid 0.01 M solution was prepared by dissolution with hydrochloric acid 35% Hiperpur (Panreac, Spain). A washing solution was prepared with APDC 0.01% m/v and HNO_3 0.02% using nitric acid 69% Hiperpur (Panreac, Spain). Absolute ethanol for analysis (Panreac, Spain) was used as the eluent. The working standard solution of As(III) was prepared daily by dissolution of stock solution arsenic chloride SpectroSol (BDH, Poole, England). The As(V) stock solution of 1 g l^{-1} was prepared by dissolution of disodium hydrogen arsenate for analysis (Merck, Germany). Synthetic sea-water was prepared by dissolving 32 g of NaCl for analysis (Merck, Germany), 14 g of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ PA-ACS (Panreac, Spain) and 0.15 g of NaHCO_3 for analysis (Merck, Spain), making the solution up to 1000 ml with ultrapure water. Iridium(III) chloride (Sigma, Germany) solution, 1 g l^{-1} , was needed as a permanent modifier for the graphite tube. A 0.25% (m/v) L-cysteine solution was prepared as the preductant by dissolution of L-cysteine (Fluka, Switzerland) in ultrapure water. The certified reference material NASS-4 (National Research Council of Canada) was used to check the accuracy. Argon N50 gas was used as a carrier gas in the atomic

Table 1 Operation sequence of the FI on-line sorption preconcentration system for ETAAS determination of As(III)

Step	Time/s	Injector valve	Pump active	Medium pumped	Flow rate/ml min ⁻¹	Function
1	3	Fill	P1	Ethanol	2.5	Fill eluent loop. Insert the capillary tip into furnace
2	45	Inject	P1	Air	1	Elution. Start the graphite furnace programme
3	120	Inject	P2	Sample HCl APDC	5 5 1.5	Preconcentration
4	10	Inject	P1	Washing solution	3	Wash knotted reactor
5	20	Inject	P1	Air	3	Remove residual solution. Finish the graphite furnace programme

absorption spectrometer. All glassware was soaked for at least 48 h in 10% nitric acid and finally rinsed in ultrapure water before use.

Procedures

The FI manifold and the operation sequence for the preconcentration and separation are shown in Table 1. The preconcentration was performed in parallel with the ETAAS determination of the previous sample concentration cycle.

Results and discussion

A flow on-line sorption preconcentration system in a knotted reactor depends on too many parameters to control at the same time: a univariate approach was used for optimisation and the integrated absorbance was taken as the main figure of importance, but with simultaneous considerations of precision and efficiency. The parameters used successfully in previous work⁵ for Sb determination in water by FI on-line sorption preconcentration coupled with ETAAS were used as starting point for further optimisation.

Optimisation of graphite furnace programme

The graphite furnace programme was studied in discontinuous mode with a solution of ethanol spiked with 20 µg l⁻¹ of As(III) using a graphite tube pretreated with iridium as a permanent modifier. It was found that the optimum mineralisation and atomisation temperatures were 1200 °C and 2100 °C, respectively.

Optimisation of FI separation and preconcentration

In this work, HCl, which has been widely used by other research groups⁶⁻⁹ was selected to adjust the sample's acidity. The effect of sample acidity on the integrated absorbance of As was examined in a HCl concentration range 0–1 mol l⁻¹ with fixed 0.05% (m/v) APDC concentration using synthetic sea-water spiked with 0.5 µg l⁻¹ As(III). At acidities under 0.005 mol l⁻¹ HCl the sensitivity was very low, probably due to unfavourable conditions for the complex reaction between As(III) and APDC. Also, the preconcentration efficiencies decreased significantly if the acid concentration was over 0.1 mol l⁻¹. Then, the optimum range of sample acidity was found between 0.005 and 0.1 mol l⁻¹ HCl. For further experiments, a HCl concentration of 0.01 mol l⁻¹ was used. The same study was repeated using synthetic sea-water spiked with As(V). These signals can be considered insignificant relative to the As(III) signals. It was reported that the formation of the As(V)–PDC chelate was very slow,¹¹ so it is possible to carry out the As(III) determination selectively.

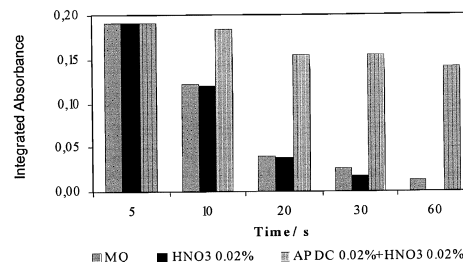
APDC was chosen as the complexing agent in this work due to its solubility in water and relative stability in an acidic medium. The influence in the integrated absorbance of APDC

concentration in the range 0–0.5% (m/v) was investigated when the flow rates of sample, HCl and APDC solutions were kept constant at 5 ml min⁻¹, 5 ml min⁻¹ and 1.5 ml min⁻¹, respectively. An increase in the integrated absorbance with increase in the APDC concentration was observed. Without APDC, As(III) was not recovered, as might be expected. The formation of the As–PDC complex and its subsequent sorption on the inner walls of the knotted reactor play an important role in the preconcentration. An 0.05% (m/v) APDC concentration was used in further experiments.

The effect of sample flow rate was evaluated at a fixed APDC flow rate of 1.5 ml min⁻¹ with 60 s of preconcentration time. The increase of sample flow rate led to an enhancement of the analytical response, obviously due the amount of analyte that flows through the KR increasing with the sample flow rate. A good level of sensitivity was obtained with 5 ml min⁻¹ sample flow rate, therefore it was chosen after considering the sample consumption.

The effect of preconcentration time was studied in the range from 10 to 120 s at two sample flow rates, 5 ml min⁻¹ and 10 ml min⁻¹, to achieve a compromise value between sensitivity and sample consumption. A good level of sensitivity and higher reproducibility were obtained with 5 ml min⁻¹ sample flow rate and 120 s of preconcentration time, therefore these were selected to further experiments.

An efficient KR rinsing step should effectively remove the non-adsorbed constituents of the matrix and/or even those weakly bound concomitant elements but not strip the adsorbed analyte from the KR. Fig. 1 shows the effects of different wash medium and wash time on the integrated absorbance of synthetic sea-water spiked with 0.2 µg l⁻¹ As(III). The retained analyte chelate was easily removed when ultrapure water or 0.02% (v/v) HNO₃ were used as a washing solution. The minimum time necessary to rinse the KR completely was 10 s. At this time insignificant analyte losses were observed when a 0.02% (v/v) HNO₃ solution containing 0.02% (m/v) APDC was used for KR rinsing. On the other hand, the effect of APDC concentration in the wash medium was studied, varying the concentration between 0.001 and 0.1% (m/v) of APDC.

**Fig. 1** Influence of wash medium and washing time on integrated absorbance of sea-water sample spiked with 0.2 µg l⁻¹ As(III).

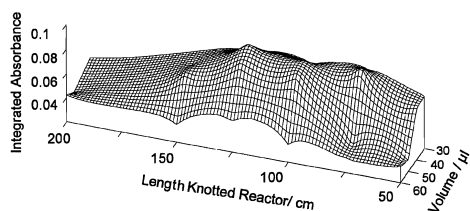


Fig. 2 Effects of eluent volume and KR length tube on integrated absorbance of $0.2 \mu\text{g l}^{-1}$ As(III).

The addition of 0.01% (m/v) of APDC to the wash solution effectively prevented analyte loss. The analyte loss during KR rinsing without APDC in the wash solution could be caused by the rapid dissociation of the adsorbed As-PDC complex. The presence of APDC in the wash medium probably inhibited complex dissociation, and therefore prevented the analyte loss.

The eluent volume needed for quantitative elution is critical for the successful adaptation of the KR sorption separation and preconcentration system to the requirements of ETAAS.^{4,5,12} To achieve this, the residual rinsing solution in the KR and eluate delivery tube was completely removed by an air flow of 3 ml min^{-1} before elution. The inclusion of air in the pump propelled flow between different solutions, effectively reducing mutual dispersion between these fluids and significantly improving the efficiency. The KR tube length, eluent volume and the flow rate for elution had to be optimised. The effect of knotted reactor length was studied in the range of 50–200 cm for several eluent volumes between 20 and 60 μl . As is shown in Fig. 2, the maximum integrated absorbance was obtained with a 125 cm KR and an eluent volume of 40 μl . With longer KR (150 and 200 cm), eluent volumes of above 60 μl were needed for elution efficiency, but a worse precision of the ETAAS determination was obtained due to the irreproducible spreading of the larger ethanolic eluate in the graphite tube. A 20 μl eluent volume was rejected because the eluate drop was too little due to fragmentation caused by hydrodynamic impedance in the KR. The elution flow rate was varied by $1\text{--}3 \text{ ml min}^{-1}$. A lower flow rate (1 ml min^{-1}) was found to be preferable in the ensuing work, because the slower eluent flow favoured both the recovery of the adsorbed analyte from the inner walls of the KR and the accommodation of the eluate in the graphite tube.

Interferences

It was well known that transition metals could form complexes with APDC, so Mo, Ni, Zn, Fe, V, Se, Cu, Sn, Mn, Co, Sb, Ag, Cr, Cd, Pb, Ga and Bi were investigated as potential interferences. A $0.2 \mu\text{g l}^{-1}$ As solution was spiked with each ion at several concentration levels: the lower levels were equal to the content in sea-water¹³ and analysed. An ion was considered as interfering when the recovery changed $\pm 10\%$. An interference effect was only observed with $4 \mu\text{g l}^{-1}$ of Fe at the slightly higher concentration that was usually found in sea-water composition ($3.4 \mu\text{g l}^{-1}$). The rest of ions produced interferences at levels between 15 and 900 times higher than their usual concentration in sea-water.

Analytical performance

The analytical performance of on-line KR sorption preconcentration ETAAS for selective As(III) determination is summarized in Table 2. The enrichment factor was assessed by comparing the slope of the linear portion of the calibration curve before and after preconcentration,¹⁴ thus an enrichment factor of 44 was achieved. The adsorption efficiency was evaluated to be 17% compared with the total analyte mass loaded onto the KR. A detection limit of $0.008 \mu\text{g l}^{-1}$ and

Table 2 Characteristic performance data of FI on-line sorption preconcentration system for ETAAS determination of As(III)

Preconcentration time/s	120
Sample consumption/ml	10
Reagent consumption/ml	
Ethanol	0.125
0.01 mol l ⁻¹ HCl	10
0.05% m/v APDC	3
0.02% HNO ₃ + 0.01% m/v APDC	0.5
Precision (% RSD) (n = 11)	4.5 (0.1 $\mu\text{g l}^{-1}$)
Detection limit (3 s)/ $\mu\text{g l}^{-1}$	0.008
Quantification limit (10 s)/ $\mu\text{g l}^{-1}$	0.028
Calibration function	$A_{\text{int}} = 0.3205$
(5 standards, n = 3, C_{As} $\mu\text{g l}^{-1}$)	$C_{\text{As}} + 0.0035$
Working range/ $\mu\text{g l}^{-1}$	0.03–0.5
Correlation coefficient	0.9978
Enrichment factor	44
Adsorption efficiency (%)	17

quantification limit $0.028 \mu\text{g l}^{-1}$ was obtained. As these values show, the proposed method provides better sensitivity than other similar methods using ICP-MS¹⁵ or HG-AFS¹⁶ detection with detection limits of $0.021 \mu\text{g l}^{-1}$ and $0.023 \mu\text{g l}^{-1}$, respectively. The precision (RSD) for 11 replicate determinations of $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$ As(III) was 4.5%. As no standard reference materials with certified values of arsenic species are currently available, synthetic mixtures of As(III) and As(V) spiked sea-water were prepared to calculate the recovery ($102.7 \pm 2.2\%$). Also, the accuracy of the proposed method was demonstrated by total arsenic determination in NASS-4 with $1.26 \pm 0.09 \mu\text{g l}^{-1}$ As certified concentration after pre-reduction of As(V) to As(III) with 0.25% (m/v) L-cysteine. It was found to be $1.25 \pm 0.12 \mu\text{g l}^{-1}$ As.

Finally, the satisfactory analytical capabilities and practical advantages of the proposed method make it a reliable alternative to similar methods using more expensive and complicated instrumentation.

Acknowledgements

This work is a contribution to the project financed by Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain (ref. REN2002-01941).

References

- 1 K. S. Subramanian in *Arsenic*, eds. H. A. McKenzie and L. E. Smythe, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1988, pp. 573–585.
- 2 J. M. Neff, *Environ. Toxicol. Chem.*, 1997, **16**, 917–927.
- 3 Z. L. Fang, S. K. Xu, L. P. Dong and W. Q. Li, *Talanta*, 1994, **41**, 2165–2172.
- 4 M. Sperling, X. P. Yan and B. Welz, *Spectrochim. Acta, Part B*, 1996, **51**, 1891–1908.
- 5 X. P. Yan, W. Van Mol and F. Adams, *Analyst*, 1996, **121**, 1061–1067.
- 6 K. Benkhedda, B. Dimitrova, H. Goenaga Infante, E. Ivanova and F. C. Adams, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2003, **18**, 1019–1025.
- 7 I. Benkhedda, E. Ivanova and F. Adams, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1999, **14**, 957–961.
- 8 Y. Li, Y. Jiang, X. P. Yan, W. J. Peng and Y. Y. Wu, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 1075–1080.
- 9 Z. L. Fang, *Spectrochim. Acta, Part B*, 1998, **53**, 1371–1379.
- 10 E. V. Alonso, A. G. de Torres and J. M. C. Pavon, *Talanta*, 2001, **55**, 219–232.
- 11 K. S. Subramanian and J. C. Meranger, *Anal. Chim. Acta*, 1981, **124**, 131–142.
- 12 X. P. Yan and Y. Jiang, *Trends Anal. Chem.*, 2001, **20**, 552–562.
- 13 K. K. Turekian, *Oceans*, Prentice-Hall, New York, 1968.
- 14 Z. Fang, *Flow Injection Separation and Preconcentration*, ed. Z. Fang, VCH, Weinheim, 1993.
- 15 X. P. Yan, R. Kerrich and M. J. Hendry, *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 4736–4742.
- 16 X. P. Yan, X. B. Yin, X. W. He and Y. Jiang, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 2162–2166.

Chromium Speciation by ETAAS Using 1,1,1-trifluoro-2,4-pentadione to Form a Volatile Chelate With Cr(III)

*P. Bermejo-Barrera, P. Herbello-Hermelo, M.C. Barciela-Alonso, and A. Bermejo-Barrera
Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Chemistry
University of Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

INTRODUCTION

Chromium can exist in valences from -2 to 6, but in the environment it is mainly in a trivalent or hexavalent state. Trivalent chromium [Cr(III)] is the most common and naturally occurring state, and most soils and rocks contain small amounts of chromic oxide (Cr₂O₃). Hexavalent chromium [Cr(VI)] occurs infrequently in nature; while chromates (CrO₄²⁻) and dichromates (Cr₂O₇²⁻) present in the environment are generally the result of industrial and domestic emissions. The most frequent sources of chromium are industrial processes such as plating, tanning, paint and pigment production, metallurgy, and the chemical industry (1).

The toxicity of chromium depends on its oxidation state. Trivalent chromium is an essential trace element for both humans and animals, and plays an important role in the control of glucose and the lipid metabolism. Hexavalent chromium is a well-known carcinogen that can cause serious toxic effects (2-4). For this reason, the determination of Cr(III) and Cr(VI) has become very important in environmental samples.

The techniques more commonly used for Cr determination are flame and furnace atomic absorption spectrometry (AAS) or inductively coupled plasma atomic emission spectrometry and the hyphenated techniques. Other techniques such as UV-VIS spectrometry or chromatography have also been used (5). Chromium speciation

*Corresponding author.
e-mail: pbermejo@usc.es
Tel: 34981591079
Fax: 34981595012

ABSTRACT

A new method has been developed for the speciation of chromium by electrothermal atomic absorption spectrometry. The 1,1,1-trifluoro-2,4-pentadione (TFA) reacts selectively with Cr(III) to form a volatile complex. Then, the Cr(III)-TFA complex is volatilized in the graphite furnace before atomization of Cr(VI). The conditions for the complex formation were studied using acetic acid/sodium acetate as the buffer solution at pH 6 and TFA at a concentration of 4% (v/v), with subsequent heating in a microwave oven for 2 minutes at 100 W.

The optimum charring and atomization temperatures for the Cr(VI) determination were 1500°C and 2200°C, respectively. The volatilization temperature of the Cr(III)-TFA complex was 140°C, where Cr(III) was completely removed. The method described for the determination of Cr(VI) is sensitive (with detection and quantification limits of 0.15 and 0.52 µg L⁻¹, respectively), accurate, and precise. The Cr(III) concentration was established by calculating the difference between total chromium and Cr(VI) concentration.

by atomic absorption requires a sample pretreatment procedure and the most commonly applied methods are complex formation (6), preconcentration (7), ionic exchange (8), processes of oxidation-reduction (9), and extraction (10).

The formation of complexes with β-diketone has been used for the determination of various elements (11-19). Some

β-diketones, such as 1,1,1-trifluoro-2,4-pentadione (TFA), selectively react with certain elements and results in speciation.

The aim of this study was the selective determination of chromium in water samples by electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS). By adding TFA, Cr(III) forms the complex Cr(TFA)₃, a chelate of high volatility. This complex volatilizes in the graphite furnace before the atomization step, and only then can Cr(VI) be atomized. The Cr(III) concentration is established by calculating the difference between total chromium and Cr(VI) concentrations.

EXPERIMENTAL

Instrumentation

The measurements were performed using a PerkinElmer Model 4100ZL atomic absorption spectrometer (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT USA), equipped with a THGA™ transversely heated graphite atomizer and an AS-71 autosampler. The light source was a hollow cathode lamp, operating at 12 mA, using the 357.9-nm line and a spectral bandwidth of 0.7 nm. Zeeman background correction and pyrolytically coated graphite tubes with L'vov platforms were used. For all measurements, integrated absorbance was used with an integration time of 5 s. The volume injected was 20 µL.

A Model Panasonic NN-5256 domestic microwave oven was used for the complex formation.

All glassware was kept in 10% nitric acid for at least 48 hours and before use was washed three times with ultrapure water.

Reagents

Cr(III) nitrate standard solution (1000 mg L⁻¹) (Merck, Darmstadt, Germany). Each test solution was prepared with ultrapure water immediately before use.

Cr(VI) standard solution (1000 mg L⁻¹) was prepared by dissolving K₂Cr₂O₇ (99%) (Aldrich Chemical, Milwaukee, WI, USA).

Sodium acetate (Panreac, Barcelona, Spain).

Acetic acid glacial, HPLC grade (Scharlau, Barcelona, Spain).

1,1,1-trifluoro-2,4-pentadione 99% (Avocado-Panreac, Sintesis, Spain).

Magnesium nitrate (Suprapur®, Merck, Darmstadt, Germany).

Reference Material, CRM 544 Lyophilized Chromium Solution, (Bureau Community of Reference, from the European Commission).

Ultrapure water, resistivity 18 MΩ.cm, obtained with a Milli-Q™ water purification system (Millipore, Bedford, MA USA).

Complex Formation

One mL of sample with 2 mL of HAC/NaAc buffer solution at pH 6 and 1 mL of 1,1,1-trifluoro-2,4-pentadione (TFA) (4%, v/v) were transferred into a test tube and heated for 2 min in a microwave

oven at 100 W. Twenty μL of this solution was injected into the pyrolytically coated graphite tube for ETAAS analysis according to the graphite furnace program shown in Table I.

RESULTS AND DISCUSION

Complex Formation

Effect of Microwave Oven Power and Heating Time

To study the effects of power and heating time in the microwave oven, 1 mL of the sample was mixed in the test tube with 7 μg L⁻¹ of Cr(III) or Cr(VI), 2 mL of HAC/NaAc buffer, and 1 mL of 1,1,1-trifluoro-2,4-pentadione (TFA) (1%). The experiments were performed using a microwave oven by varying the time of warming from 1 to 2 min and the microwave power from 100 and 200 W. It was found that the sample was lost due to vigorous boiling when it was heated for a longer period of time or at a power higher than 200 W. The optimum complex formation conditions selected for this study were 2 min at 100 W.

Effect of pH

The influence of pH on the formation of the Cr(TFA)₃ complex was studied by preparing a series of solutions and adjusting the pH to values from 3.5 to 7.7 with acetic acid/sodium acetate (0.5 M). A

significant reduction in signal appeared at a pH above 5. The optimum pH value selected for this study was 6.

Amount of 1,1,1-trifluoro-2,4-pentadione

The TFA concentration was optimized by varying the concentration from 0.0001-10% (v/v). The results obtained (Figure 1) show that the absorbance signal diminishes when the TFA concentration is increased. For TFA concentrations higher than 1% (v/v), the signal remained constant. A TFA concentration at 4% (v/v) was selected as optimum to guarantee the volatilization of Cr(III).

Stability of the Complex

In order to study the stability of the Cr(TFA)₃ complex, the sample containing 7 μg L⁻¹ Cr(III) was measured at time intervals from 15 min and 3 hrs. The results obtained show that the signal remains constant throughout all time intervals.

Optimization of Graphite Furnace Program

The graphite furnace temperature program was optimized for the determination of Cr(VI). Drying of the sample was carried out in two stages: 110°C and 130°C. The charring and atomization temperatures were optimized for a

TABLE I
Graphite Furnace Program for Cr(VI) Determination

Step	Temp (°C)	Ramp time (s)	Hold time (s)	Ar flow (mL min ⁻¹)
1	110	1	10	250
2	130	5	30	250
3	1500	10	20	250
4	2200	0	5	0
5	2450	1	3	250

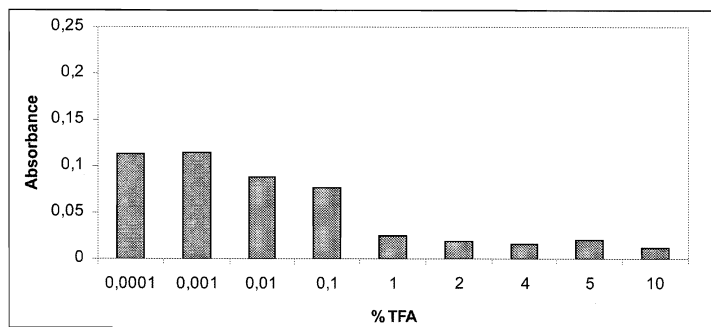


Fig. 1. Optimization of amount of 1,1,1-trifluoro-2,4-pentadione.

standard solution containing $7 \mu\text{g L}^{-1}$ of Cr(VI), and for the mixture of a standard solution with HAC/NaAc buffer and chelating agent. The optimum charring and atomization temperatures used were 1500°C and 2200°C , respectively. Table I lists the furnace conditions. Influence of the charring temperature on the volatilization of Cr(III) was also studied. As can be seen in Figure 2, the absorbance signal produced by Cr(III) does not vary considerably with an increase in the charring temperature since volatilization takes place at temperatures as low as 200°C .

Chemical Modifiers

Over the last decade, different matrix modifiers have been proposed for the determination of chromium such as acid nitric (10), magnesium nitrate (10,20,21), sodium tungstate (10), ammonium nitrate (22), and calcium nitrate (21). In this work, the effect of the addition of magnesium nitrate as the chemical modifier was studied. Twenty μL of $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ with a concentration ranging from 0–60 mg L^{-1} was injected into the graphite tube. No difference was observed with or without the chemical modifier $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$; therefore, no modifier was used for this study.

Analytical Performance

Calibration

Calibration curves and standard additions were obtained using two procedures: (a) the solutions were prepared from stock standard solutions and placed into the autosampler cups; (b) the solutions were prepared in test tubes following the same treatment as for the samples. Appropriate volumes of TFA and buffer solution were added to the standard solutions and the test tubes warmed for 2 minutes at 100 W. The calibration curves obtained from solutions exposed to microwave energy were used to calculate the concentrations of the samples, because it was observed that the sample treatment influences the calibration curves.

The concentration range used for the two procedures was between 0–8 $\mu\text{g L}^{-1}$ of Cr(VI).

The equations obtained were as follows:

Calibration curve:

$$A = 0.01 + 0.0088 c \quad r = 0.9944$$

Standard addition curve:

$$A = 0.0092 + 0.0091 c \quad r = 0.9987$$

where A is the integrated absorbance and c the Cr(VI) concentration in $\mu\text{g L}^{-1}$. No differences were observed when comparing the slopes of the calibration and the addition curves using the Student's *t*-test with a significance level of 95% (23). All measurements were made using the calibration curve.

Sensitivity

In order to express the sensitivity of a method, the following parameters were used: the limit of detection (LOD), the limit of quantification (LOQ), and the characteristic mass (m_0).

The LOD, defined as the lowest concentration level that can be determined to be statistically different from a blank, is calculated as $\text{LOD} = 3 \times \text{SD} / m$ at a 99% confidence level, where m is the slope of the calibration curve and SD is the within-run standard deviation of 10 blank replicates. The LOQ is defined as the level above which quantitative results can be obtained with a specific degree of confidence. At the 99% confidence level, the value recommended is $\text{LOQ} = 10 \times \text{SD} / m$. The values obtained using the method described were $0.15 \mu\text{g L}^{-1}$ and $0.52 \mu\text{g L}^{-1}$ for LOD and LOQ, respectively. These Cr(VI) values are better than those reported by Yingliang (24) using sequential ETV-ICP-AES ($1.4 \mu\text{g L}^{-1}$), Kingston (25) and Groll (26) using HPLC-ICP-MS ($0.37 \mu\text{g L}^{-1}$), and HPLC-FAAS (0.5 – $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$), respectively.

The characteristic mass, m_0 , is defined as the mass (pg) of the analyte required to give a signal of 0.0044 s for integrated absorbance. The results obtained were $6.07 \pm 0.51 \text{ pg}$.

Precision

The within-run precision of the method (instrumental and matrix factors), obtained for 10 replicate analyses of a single sample during

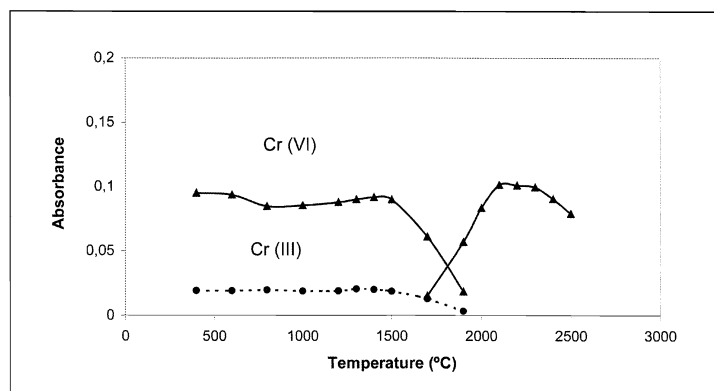


Fig. 2. Charring and atomization curves, $7 \mu\text{g L}^{-1}$ of Cr(VI).

the same run, was 0.64% [for 7 $\mu\text{g L}^{-1}$ of Cr(VI)].

The within-batch precision of the method, obtained for five replicates of the three samples with different concentrations of chromium added (2, 4, and 6 $\mu\text{g L}^{-1}$), was also investigated and the results obtained were 5.3, 6.3, and 5.8%, respectively.

Accuracy

The accuracy of the method was studied using the certified reference material, CRM 544 Lyophilized Chromium Solution, having a Cr(VI) certified value of $22.8 \pm 1.0 \mu\text{g L}^{-1}$. The reference material was reconstituted with 20 mL of $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{CO}_3$ buffer, using pH 6.4 for stability reasons. In order to maintain the pH buffer at 6.4, the flask needs to be flushed with CO_2 at each use. It is recommended that the samples be analyzed as soon as possible after reconstitution. Three portions of this reference material were analyzed and the values found, expressed as the mean \pm standard deviation, was $22.83 \pm 1.5 \mu\text{g L}^{-1}$ of Cr(VI). No difference was observed between the certified and found values using the Student's *t*-test at a significance level of 95%. The accuracy of the method was verified by recovery studies using the method of standard addition for 2, 4, 6, and 8 $\mu\text{g L}^{-1}$ of Cr(VI), resulting in 93.2, 96.6, 105.7, and 102.8%, respectively, with a mean value of 99.6%.

Futhermore, the total Cr concentration was measured in three subsamples of CRM 544 using the method proposed by Beceiro-Gonzalez (27). The certified Cr total concentration in the reference material, CRM 544 Lyophilized Chromium Solution, is $49.4 \pm 0.9 \mu\text{g L}^{-1}$ of Cr and the found values were $49.19 \pm 0.97 \mu\text{g L}^{-1}$ of Cr. There is no significant difference between the certified and found values using the Student's *t*-test at a significance

level of 95%. Thus, the Cr(III) concentration can be exactly calculated by the difference between the total Cr and Cr(VI) concentrations; the Cr(III) concentration found was $26.36 \mu\text{g L}^{-1}$.

CONCLUSION

Formation of the $\text{Cr}(\text{TFA})_3$ complex resulted in the separation of Cr(III) during volatilization in the graphite furnace before atomization, with subsequent determination of Cr(VI) in the sample. The Cr(III) concentration is obtained by calculating the difference between the total Cr and Cr(VI) concentrations. The direct separation of the two species in the graphite furnace offers several advantages over other methods such as precipitation or liquid-liquid extraction, including reduced sample preparation time, minimal risk of contamination, and no loss of analyte. The proposed method is simple, rapid, and economical and provides good sensitivity, precision, and accuracy.

Received September 26, 2002.

ACKNOWLEDGMENTS

This paper is a contribution to project Ref. PGIDT00PXI20904PR, financed by Secretaría Xeral de Investigación e Desenvolvemento da Xunta de Galicia and the Consellería de Medio Ambiente, and project Ref. PGIDT01MAM20902PR, financed by Secretaría Xeral de Investigación e Desenvolvemento da Xunta de Galicia. Paloma Herbello Hermelo wishes to thank Secretaría Xeral de Investigación e Desenvolvemento da Xunta de Galicia for a predoctoral grant.

REFERENCES

1. M.E. Losi, C. Amrhein, and W.T. Frankenger, *Environmental Biochemistry of Chromium Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 136, 91 (1994).
2. D.G. Barceloux, *Chromium Clinical Toxicology* 37(2), 173 (1999).
3. A.V. Pawlitz, R.A. Kent, U.A. Schneider, and C. Jefferson, *Canadian Water Quality Guidelines of Chromium*, *Environ. Toxicol. Water Qual.* 12(2), 123 (1997).
4. Y. Schmitt and J.D. Kruse-Jarres, *Trace Element Analytical Chemistry in Medicine and Biology*, Walter de Gruyter Co., Berlin, New York (1988).
5. M.J. Marques, A. Salvador, A. Morales-Rubio, and M. de la Guardia, *Fresenius' J. Anal. Chem.* 367, 601 (2000).
6. K.S. Subramanian, *Anal. Chem.* 60, 11 (1988).
7. J.L. Manzoori, M.H. Souroraddi, and F. Shemirani, *Talanta* 42, 1151 (1995).
9. K. Vercoutere, K. Cornelius, S. Dying, L. Mees, J.M. Christense, K. Byrialsen, B. Aaen, and P. Quevauviller, *Mikrochim. Acta* 123, 109 (1996).
9. M. Sperling, X. Yin, and B. Welz, *Analyst* 117, 629 (1992).
10. E. Beceiro-Gonzalez, J. Barciela-Garcia, P. Bermejo-Barrera, and A. Bermejo-Barrera, *Fresenius' J. Anal. Chem.* 344, 301 (1992).
11. J.R. Castillo, E. Garcia, J. Delfa, J.M. Mir, and C. Bendicho, *Microchim. J.* 42, 103 (1990).
12. J.R. Castillo, J.M. Mir, and C. Bendicho, *J. Anal. At. Spectrom.* 4, 105 (1989).
13. M.S. Black and R.F. Browner, *Anal. Chem.* 53, 249 (1981).
14. T. Fujinaga, T. Kuwamoto, K. Isshiki, K. Matsubara, and E. Nakayama, *Spectrochim. Acta, Part B*, 38(7), 1011 (1983).
15. R. Belcher, C.R. Jenkins, W.I. Stephen, and P.C. Uden, *Talanta* 17, 445 (1970).

16. R.E. Sievers, B.W. Ponder, M.L. Morris, and R.W. Moshier, *Inorg. Chem.* 2(4), 693 (1963).
17. Yung-Sing Fung, and Wing-Cheang Sham, *Analyst* 119(5), 1029 (1994).
18. S. Arpadjan and S.V. Krivan. *Anal. Chem.* 58, 2611 (1986).
19. K. Dungs, Ch. Lippmann, and B. Neidhart, *Trace Element, Analytical Chemistry in Medicine and Biology* 2, 981 (1983).
20. E.M. García, C. Cabrera, J. Sánchez, M.L. Lorenzo, and M.C. López. *The Science of Total Environment* 241, 143 (1999).
21. G. Benling and L. Yongming, *At. Spectrosc.* 11, 229 (1990).
22. J.Y. Cabon and A. Le Bihan. *Spectrochim. Acta, Part B*, 50, 1703 (1995).
23. R. Cela , *Avances en Quimiometría Práctica*, University of Santiago de Compostela (1994).
24. W. Yingliang, T. Bin, P. Tianyou, and J. Zucheng. *Fresenius' J. Anal. Chem.* 370, 904 (2001).
25. H.M Kingston, D. Huo, Y. Lu, and S. Chalk. *Spectrochim. Acta, Part B*, 53B, 299 (1998).
26. H. Groll, G. Schaldach, H. Berndt, and K. Niemax, *Spectrochim. Acta, Part B*, 50B,1293 (1995).
27. E. Beceiro-González, P. Bermejo-Barrera, A. Bermejo.Barrera, J. Barciela-García, and C. Barciela-Alonso. *J. Anal. At. Spectrom.* 8, 649 (1993).

Este trabajo pretende ser una pequeña contribución al estudio de metales traza en el agua de mar con el fin de poder evaluar su impacto ambiental ya que existe escasa información sobre el contenido de metales traza en agua de mar. Esta deficiencia se debe a la complejidad de esta matriz y los bajos niveles de concentración en los que se encuentran los metales.

La diferencia de toxicidad entre las distintas especies inorgánicas de As y Cr, ha sido el criterio tomado en la elección de los elementos objeto de estudio. Por una parte se ha propuesto un método para la determinación de Cr(VI) mediante ETAAS. La separación de Cr(III) es posible dada la elevada volatilidad del quelato que forma selectivamente con 1,1,1-trifluoro-2,4-pentadiona (TFA). Y por otra parte se ha desarrollado un método para la preconcentración y separación de As(III) y Cr(VI) en agua de mar, mediante la retención en un reactor anudado del complejo formado con el amonio pirrolidinditiocarbamato, APDC. Para ello se ha empleado una técnica de inyección en flujo acoplada a un equipo de Espectroscopía de Absorción Atómica con Atomización Electrotérmica, FI-ETAAS.

Finalmente, estos métodos han sido aplicados para el estudio de la distribución de estos metales en la Ría de Arousa.

