

Diseño y Optimización
de Nuevos Sistemas de Análisis
de Metales Pesados
en Aguas mediante Voltamperometría
de Redisolución Adsorptiva
y Sensores Ópticos

Estrella
Espada
Bellido

Tesis Doctoral

Tesis Doctoral



UCA

Universidad
de Cádiz



UCA

Universidad

Estrella Espada Bellido
Cádiz, 2010



FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

TESIS DOCTORAL

*DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE NUEVOS SISTEMAS DE
ANÁLISIS DE METALES PESADOS EN AGUAS MEDIANTE
VOLTAMPEROMETRÍA DE REDISOLUCIÓN ADSORTIVA
Y SENSORES ÓPTICOS*

ESTRELLA ESPADA BELLIDO

2010



***DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE NUEVOS SISTEMAS DE ANÁLISIS
DE METALES PESADOS EN AGUAS MEDIANTE
VOLTAMPEROMETRÍA DE REDISOLUCIÓN ADSORTIVA Y
SENSORES ÓPTICOS***

Memoria presentada por la Licenciada en Química
Dña. Estrella Espada Bellido
para optar al grado de Doctor Europeo por la Universidad de Cádiz

Fdo.: Estrella Espada Bellido

La presente Tesis Doctoral ha sido dirigida por los Doctores Dña. M^a Dolores Galindo Riaño, Profesora Titular de Universidad del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz y D. Manuel García Vargas, Catedrático de Universidad del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz, y cumple los requisitos exigidos por la legislación vigente.

Puerto Real a 14 de Mayo de 2010

Fdo.: Dña. M^a Dolores Galindo Riaño

Fdo.: D. Manuel García Vargas



Dr. D. MANUEL GARCÍA VARGAS, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA UNIVERSIDAD DE CÁDIZ

CERTIFICA: Que el presente trabajo, realizado íntegramente en los laboratorios de este Departamento bajo la dirección conjunta de los Profesores Dra. Dña. María Dolores Galindo Riaño y Dr. D. Manuel García Vargas, reúne las condiciones exigidas para optar al Grado de Doctor Europeo en Química.

Y para que conste, expido y firmo el presente certificado, en Puerto Real a 14 de Mayo de 2010.

Fdo: Manuel García Vargas

*“Nunca desistas de un sueño,
sólo trata de ver las señales que te llevan a él”*

Paulo Coelho

No ha sido un camino fácil, y los que me conocen lo saben, pero al final, aquí está. Por supuesto debo reconocer que no podría haber llegado sola, es por ello por lo que me gustaría aprovechar esta oportunidad para expresar mis más sinceros agradecimientos a todos los que de una forma u otra habéis contribuido a que este trabajo sea posible.

En primer lugar a mis directores de Tesis, D. Manuel García Vargas por su apoyo, orientación y ayuda siempre que la he necesitado así como por sus palabras de tranquilidad y muestras de afecto. Por otro lado, a D^a. María Dolores Galindo Riaño, por su gran dedicación y elevados conocimientos que me ha transmitido a lo largo de estos años y por haberme mostrado todos y cada uno de los pasos a seguir en la carrera investigadora.

Así mismo me gustaría expresar mi gratitud a la Junta de Andalucía por la Beca de Formación de Personal Docente e Investigador que he podido disfrutar así como a las ayudas a la investigación tanto de la Junta de Andalucía como del Plan Propio de la Universidad de Cádiz..

A todos mis compañeros del grupo de Geoquímica Marina, con los que tantos buenos momentos he pasado. A Mariló, Clara, Pilar, Carlos, Juan Pinto, Carolina, Juan, Gema, Cristina, Jose, Mustafa, por supuesto a mis compis y amigos siempre dispuestos a escuchar Abdellah, Hafida, M^a José y Marga, así como todos los que han pasado por el laboratorio aportando su granito de arena. A todos ellos no los meto en la categoría de compañeros de trabajo sino en la de amigos. Gracias por tenderme una mano siempre que me ha hecho falta.

Así mismo, tengo que agradecer a los profesores y personal del Departamento de Química Analítica que me han ofrecido su apoyo y colaboración siempre que lo he necesitado, así como a los compañeros de otros Departamentos, en especial a los "Orgánicos" e "Ingenieros" a los que les tengo mucho cariño. Me gustaría también expresar mis más sinceros agradecimientos a los profesores Manuel Pedro y Jesús Ayuso por la ayuda ofrecida.

Gracias a la Tesis he podido disfrutar de una de las mejores experiencias de mi vida, Manchester, ciudad maravillosa que me ha enamorado, pero todavía más maravillosa es la gente que he podido conocer allí.

I am indebted to all the members of the Optical Sensor Research Group for not only the unconditional help but also for the affection and friendship.

I owe my deepest gratitude and everlasting thanks to Dr. Ramaier Narayanaswamy for allowing me to join his research group. With his extensive knowledge, invaluable support and guidance, he helped me throughout my Thesis always providing encouragement, advice and kindness. It would have not been the same without him.

Special thanks goes to Hafiza, Sing-Muk, Konesh, Nasir, Pam, Phil and Raed, always ready to help me making me feel at home.

I would also wish to convey my intense gratitude to the University of Manchester for providing the laboratory and academic facilities allowing me to be one of them for the time I was there.

I would also like to thank Dr. Krishna Persaud from the University of Manchester and Dr. David Turner from the University of Gothenburg for the evaluation of my work with the favourable letters and for the recommendations before my PhD Thesis submission.

Así mismo, no puedo olvidarme de los nuevos amigos que he ido haciendo gracias a la Tesis, así como los que habéis estado siempre ahí: Roberto, Inma, Tania, Chema,... mi "profe" María. A mis grandes amigos Jacinto y Ana, que ni ellos se pueden imaginar todo lo que me han ayudado. A todos los que habéis estado ahí de una manera u otra. Gracias.

A mi madrina, por repetirme tantas veces lo orgullosa que se sentía. A mi padrino, por ser tan "manitas" y estar dispuesto a ayudarme en todo lo que me hiciese falta. A Pepi y Alejandro, por

sus palabras de ánimo y comprensión. A Jose por ser una de las personas que más se ha interesado por mi Tesis.

No puedo olvidarme tampoco de mis abuelos, sobre todo de mi abuelo Carlos, que desafortunadamente no ha podido ver este momento, pero estoy segura de que estaría muy orgulloso de su nieta.

A la artista de mi hermana, por su ayuda en toda la parte gráfica de la Tesis, y por supuesto por su cariño y comprensión.

A esos padres maravillosos, a los que tengo tanto que agradecer, que un par de líneas no es suficiente. A ellos les dedico este trabajo como regalo por haber estado ahí no sólo ya a la hora de realizar el mismo, sino a lo largo de toda mi vida.

TODO lo que he conseguido y lo que soy es gracias a vosotros.

Y por supuesto a tí, Alex, gracias por estar a mi lado, por tu cariño, comprensión y paciencia infinita, sin tí no hubiese sido posible. Gracias.

A mis padres

A mi hermana

A Alex

Índice

<i>Carta del Agua</i>	1
<i>Objetivos de la Tesis</i>	3
<i>Introducción general</i>	5
I.1. El agua: generalidades	7
I.1.1. Propiedades de importancia medioambiental	7
I.1.2. Abundancia.....	8
I.2. Contaminación del agua.....	9
I.2.1. Composición de las aguas naturales	10
I.2.2. Definición de contaminación del agua.....	12
I.2.3. Contaminantes del agua.....	13
I.3. Contaminación por metales pesados	15
I.3.1. Origen de los metales pesados en el medio acuático	16
I.3.2. Distribución de los metales pesados en el medio acuático.....	21
I.3.3. Sumideros de los metales pesados en el medio acuático.....	24
I.4. Episodios contaminantes por metales pesados.....	25
I.5. Toxicidad de los metales pesados	29
I.5.1. Plomo	34
I.5.2. Cadmio	37
I.5.3. Cobre y Zinc.....	39
I.5.4. Bismuto.....	41
I.6. Legislación medioambiental	42
I.6.1. Ley de Protección Ambiental y Consejo Andaluz del Agua.....	42
I.6.2. Directiva Marco de Aguas 2000/60/CE.....	43
I.6.2.1. Objeto de la Directiva	43
I.6.2.2. Otros aspectos de interés considerados en la Directiva	44
I.6.3. Agencia Andaluza del Agua	45
I.6.3.1. Funciones de la Agencia Andaluza del Agua	45
I.6.3.2. Estructura de la Agencia Andaluza del Agua.....	47
I.7. Análisis de metales pesados en muestras acuosas.....	49
I.7.1. Buscando técnicas de elevada sensibilidad	50
I.7.2. Buscando la simplicidad, rapidez y/o la miniaturización	54
Referencias	56

Parte A: Desarrollo de nuevos sistemas de análisis empleando voltamperometría de redisolución adsortiva..... 59

Capítulo 1: Voltamperometría de redisolución..... 61

1.1. Introducción 63

1.2. Principios generales..... 64

1.3. Aspectos instrumentales 67

1.4. Etapas 71

 1.4.1. Etapa de preconcentración 71

 1.4.2. Etapa de reposo 72

 1.4.3. Etapa de redisolución (stripping)..... 72

1.5. Clasificación..... 73

1.6. Cuantificación en AdCSV 78

1.7. Parámetros instrumentales..... 79

1.8. Voltamperometría de Redisolución Catódica Adsorptiva (AdCSV) 83

 1.8.1. Compuestos orgánicos quelatantes..... 84

 1.8.2. Aplicaciones de la Voltamperometría de Redisolución 88

Referencias 89

Capítulo 2: Desarrollo de una nueva metodología para análisis de Pb en agua de mar por AdCSV empleando el reactivo 2-APSH 93

Resumen..... 95

2.1. Introducción 96

2.2. Saliciloilhidrazona de la 2-acetilpiridina (2-APSH) 99

 2.2.1. Estudios previos..... 99

 2.2.2. Características de la 2-APSH 100

 2.2.3. Estequiometría del complejo Pb(II)-2-APSH mediante espectrofotometría de absorción molecular UV-Vis 106

2.3. Estrategia de diseño del método de análisis de Pb por AdCSV 109

 2.3.1. Estudios preliminares 110

 2.3.2. Diseño exploratorio Plackett-Burman 112

 2.3.3. Diseño secuencial Simplex Modificado 117

2.4. Influencia de la concentración de ligando 129

2.5. Control del pH óptimo en el procedimiento propuesto: empleo de la disolución reguladora acetato amónico-ácido clorhídrico 130

2.6. Método de análisis de Pb propuesto 131

2.6.1. Parámetros analíticos del método	133
2.6.1.1. Recta de calibrado.....	133
2.6.1.2. Límite de detección (LD) y cuantificación (LC).....	134
2.6.1.3. Reproducibilidad	135
2.6.2. Interferencias.....	136
2.6.2.1. Iones mayoritarios y minoritarios presentes en el agua de mar	137
2.6.2.2. Metales pesados	138
2.6.3. Validación del método y aplicación a muestras reales.....	140
2.7. Comparación del método	145
2.8. Conclusiones y perspectivas futuras.....	150
Referencias	151

Capítulo 3: Aplicabilidad del ligando 2-HBBH en la determinación simultánea de Cu, Pb, Cd y Bi por AdCSV.....

Resumen.....	157
3.1. Introducción	158
3.2. 2-Hidroxibenzaldehido benzoilhidrazona (2-HBBH).....	160
3.2.1. Características estructurales de la 2-HBBH	160
3.2.2. Características voltamperométricas de la 2-HBBH.....	161
3.3. Comportamiento electroquímico de diferentes metales en presencia de 2-HBBH	163
3.4. Optimización de las variables	166
3.4.1. Efecto del pH.....	167
3.4.2. Efecto del electrolito soporte.....	170
3.4.3. Efecto del potencial de deposición.....	173
3.4.4. Efecto del tiempo de deposición.....	175
3.5. Aplicabilidad de la 2-HBBH al análisis de muestras con Cu y Bi por AdCSV.....	176
3.6. Condiciones óptimas y mecanismo de redisolución.....	178
3.7. Parámetros analíticos	181
3.7.1. Análisis individuales.....	181
3.7.1.1. Rangos lineales y límites de detección.....	181
3.7.1.2. Reproducibilidad	184
3.7.2. Análisis simultáneos	185
3.7.2.1. Rangos lineales y límites de detección del análisis de Cd(II)-	
Pb(II)-Cu(II)	186
3.7.2.2. Rangos lineales y límites de detección del análisis de Cd(II)-	
Pb(II)-Bi(III)	187

3.8. Interferencias	189
3.9. Aplicabilidad del método	190
3.10. Comparación del método	192
3.11. Conclusiones y perspectivas futuras.....	196
Referencias	197
<i>Anexos Parte A</i>	201
<i>Parte B: Desarrollo de nuevos sistemas de análisis empleando sensores ópticos</i>	217
<i>Capítulo 4: Sensores químicos ópticos</i>	219
4.1. Introducción	221
4.2. Sensores químicos.....	222
4.2.1. Definición de sensor químico	223
4.2.2. Clasificación de los sensores químicos	223
4.2.3. Sensores químicos ópticos.....	224
4.3. Sensores químicos de fibra óptica	225
4.3.1. Componentes de un optodo.....	226
4.3.1.1. Fibras ópticas	227
4.3.1.2. Indicador óptico	228
4.3.1.3. Material soporte	229
4.3.2. Métodos de inmovilización.....	230
4.3.3. Ventajas e inconvenientes de un optodo	232
4.4. Principios ópticos en los optodos	234
4.4.1. Absorción/Reflectancia	235
4.4.2. Fluorescencia.....	237
4.4.2.1. Fluorescencia: Fundamento.....	237
4.4.2.2. Fluorescencia: Etapas	238
4.4.2.3. Métodos para la detección de fluorescencia.....	239
4.4.2.3.1. Atenuación de fluorescencia o “quenching”	240
4.5. Actualidad de los optodos y quimiosensores moleculares	242
Referencias	245

<i>Capítulo 5: Quimiosensor molecular fluorescente (indicador) selectivo para cobre basado en la atenuación de fluorescencia de una base de Schiff</i>	251
Resumen.....	253
5.1. Introducción	254
5.2. 2-Hidroxibenzaldehído benzoilhidrazona (2-HBBH).....	259
5.2.1. Características espectrales de la 2-HBBH y Cu-2-HBBH	260
5.2.2. Efecto del pH en la formación del complejo Cu-2-HBBH.....	265
5.2.3. Determinación de la estequiometría del complejo Cu-2-HBBH	266
5.2.4. Determinación de la constante de formación del complejo.....	270
5.2.5. Estudio de las características del complejo Zn-2-HBBH	274
5.2.6. Orden de estabilidad de los complejos.....	277
5.2.7. Estructura de los quelatos: Cu-2-HBBH y Zn-2-HBBH.....	278
5.3. Parámetros analíticos del quimiosensor molecular de cobre	279
5.3.1. Recta de calibrado	279
5.3.2. Límite de detección	282
5.3.3. Reproducibilidad.....	282
5.3.4. Efecto de diferentes metales en la intensidad de fluorescencia	283
5.3.5. Estudio de las interferencias	286
5.3.6. Estudio de la reversibilidad del sensor	287
5.4. Conclusiones y perspectivas futuras.....	288
Referencias	289
<i>Capítulo 6: Diseño de un sensor químico de fibra óptica para la determinación de cobre basado en la extracción en fase sólida colorimétrica y discos SDB modificados con 2-HBBH</i>	293
Resumen.....	295
6.1. Introducción	296
6.2. Extracción en fase sólida.....	299
6.2.1. Fundamento	300
6.2.2. Formatos	301
6.2.3. Tecnología de extracción en formato de disco	302
6.2.4. Tipos de sorbentes.....	303
6.2.5. Discos de extracción modificados	306
6.3. Sensor óptico basado en la extracción en fase sólida colorimétrica.....	307

6.3.1. Fundamento	309
6.3.2. Etapas	310
6.4. Desarrollo y optimización del método	311
6.4.1. Estudios preliminares	312
6.4.2. Estudios univariantes.....	315
6.4.2.1. Estudio del pH de la muestra.....	315
6.4.2.2. Estudio de la cantidad de reactivo inmovilizado	317
6.4.2.3. Estudio del tipo de reguladora	318
6.4.3. Estudio del sensor de Cu(II) por C-SPE	318
6.4.3.1. Procedimiento de aplicación del sensor de Cu(II) por extracción en fase sólida colorimétrica	318
6.4.3.2. Estudio inicial de la disolución reguladora.....	320
6.4.3.3. Diseño de experimento factorial fraccionario 3^{3-1}	320
6.5. Método de análisis del sensor de Cu(II) propuesto por C-SPE	325
6.5.1. Parámetros analíticos del sensor	326
6.5.1.1. Rango lineal de aplicación.....	326
6.5.1.2. Límite de detección (LD)	327
6.5.1.3. Reproducibilidad	327
6.5.2. Estabilidad del disco sensor.....	328
6.5.3. Estudio de las interferencias	328
6.6. Comparativa y tendencias futuras	329
Referencias	330
<i>Anexos Parte B</i>	335
<i>Conclusiones generales</i>	343
<i>English Summary</i>	347
<i>Artículos derivados de la Tesis</i>	403

Carta del Agua

- I. No hay vida sin agua. Es un bien preciado, indispensable para toda actividad humana.*
- II. Los recursos de agua dulce no son inagotables, por lo que hay que preservarlos, controlarlos y, siempre que sea posible, incrementarlos.*
- III. Al contaminar el agua nos perjudicamos a nosotros mismos y a todos los seres vivos que de ella dependen.*
- IV. La calidad del agua debe ser conservada según los diferentes usos previstos y sobretodo satisfacer las exigencias de la salud pública.*
- V. Cuando el agua es usada y devuelta a la Naturaleza, su estado no debe verse alterado para usos posteriores.*
- VI. Para la conservación de los recursos del agua, se hace necesario el cuidado de la cubierta vegetal que le rodea.*
- VII. Los recursos hídricos deben inventariarse.*
- VIII. El uso correcto de los recursos del agua debe ser planificado por las autoridades competentes.*
- IX. Para un mejor conocimiento de las aguas es esencial investigar acerca de la misma, formar especialistas y divulgar esa información al público.*
- X. El agua es un patrimonio común y su gran valor debe ser reconocido por todos.
TODOS tenemos el deber de utilizarla con cuidado y no desperdiciarla.*
- XI. La administración del agua debe fundamentarse en las cuencas naturales más que en las fronteras políticas y administrativas.*
- XII. El agua no tiene fronteras. Es un bien común que requiere la cooperación internacional.*

Consejo de Europa.

ESTRASBURGO, 6 de Mayo de 1968

Objetivos de la Tesis

Más de 40 años han transcurrido desde que se firmase aquella “*Carta del Agua*” en Estrasburgo. A fecha de hoy, deberíamos pararnos a pensar detenidamente si alguno de los doce artículos mencionados se ha cumplido.

En la actualidad y, cada vez más, las sustancias contaminantes conocidas por su toxicidad y alta persistencia, no dejan de acumularse en el medioambiente debido fundamentalmente a la actividad del hombre. Las áreas costeras al ser ecosistemas bastante sensibles, son los entornos que se ven más afectados por las actividades industriales y el desarrollo urbanístico. Diversos organismos internacionales, así como numerosos investigadores, advierten ya sobre las consecuencias negativas que la creciente presión demográfica ejercerá en un futuro no muy lejano sobre estos ecosistemas. En particular, la rápida difusión de metales pesados como contaminantes medioambientales ha despertado una gran preocupación, comprobándose en el alto interés que existe actualmente por su determinación, a pesar de que se suelen encontrar a niveles de concentración de trazas y ultratrazas. De hecho, tales elementos tienen tendencia a concentrarse en la mayoría de las matrices acuáticas del medioambiente (materia suspendida, sedimentos y biota), provocando por consiguiente la presencia de los mismos en la cadena alimentaria, como consecuencia de la consumición de productos marinos, llegando finalmente al hombre.

La presente Tesis Doctoral tiene como objetivo fundamental el desarrollo de nuevas metodologías analíticas de elevada sensibilidad, bajo coste, capaces de realizar análisis *in-situ*, así como rápidas y sencillas, entre otras muchas ventajas, para la cuantificación de metales pesados en aguas naturales mediante la formación de quelatos metálicos.

Para la consecución de dicho objetivo se han llevado a cabo dos líneas diferentes de investigación para el diseño y optimización de nuevos sistemas de análisis de metales pesados aplicables en aguas naturales, de mar, de río, etc. Por un lado, técnicas de elevada sensibilidad con bajos límites de detección, como es la voltamperometría de redisolución catódica adsortiva (AdCSV) y por otro, técnicas

rápidas y sencillas que requieran de pequeña instrumentación, permitiendo así el análisis *in-situ*, como es el desarrollo de sensores ópticos.

Para la formación de los quelatos, se han empleado ligandos orgánicos de la familia de las aroilhidrazonas, ampliamente estudiados y caracterizados como agentes complejantes de metales pesados.

La presente Tesis Doctoral comienza con una Introducción General y a continuación, se incluyen dos partes bien diferenciadas: **Parte A** y **Parte B**. La parte A consta de los capítulos 1, 2 y 3, y la parte B está formada por los capítulos 4, 5, y 6.

En la **parte A** se lleva a cabo el desarrollo de nuevas metodologías de análisis empleando la voltamperometría de redisolución adsorbtiva:

En el **capítulo 1** se hace una revisión general de los aspectos fundamentales tratados en esta primera parte.

En el **capítulo 2** se detalla una nueva y sensible metodología de análisis para plomo empleando 2-APSH como reactivo orgánico quelatante.

Y en el **capítulo 3** se describe la aplicabilidad de otra aroilhidrazona, la 2-HBBH en este caso, para la determinación simultánea de metales pesados.

Por otro lado, la **parte B** está dedicada al desarrollo de nuevas metodologías de análisis empleando los sensores ópticos:

En el **capítulo 4** se exponen los aspectos fundamentales de los sensores ópticos.

En el **capítulo 5** se estudia el ligando orgánico 2-HBBH como quimiosensor molecular fluorescente selectivo para cobre y se propone como un potencial indicador en el campo de los sensores ópticos.

Y, por último, en el **capítulo 6** se lleva a cabo el diseño de un sensor de fibra óptica para la determinación de cobre basado en la extracción en fase sólida colorimétrica.

Introducción general:

*Contaminación de las aguas por
metales pesados*

I.1. El agua: generalidades

El agua es el compuesto más importante que existe y uno de los principales constituyentes de nuestro planeta y de la materia viva.

Fijándonos en el aspecto puramente cualitativo, hay que indicar que el agua cubre aproximadamente el 72% de la superficie terrestre, y que la materia viva incluye en su composición altísimos porcentajes de esta sustancia, por ejemplo, el 98% de las medusas, >95% de los embriones humanos, el 70% de un recién nacido, el 60% de un hombre adulto y el 50% de los árboles, están formados por agua. La propia sangre humana y los fluidos corporales de muchos animales se asemejan notablemente al agua de mar. Además es de destacar como todas las formas de vida, aun en el desierto, requieren de una entrada importante de agua y casi todas las funciones de nutrición y excreción en los seres vivos se basan en la misma.

Por otro lado, cabe destacar los múltiples usos que se le dan al agua hoy en día, ya sean: urbanos, domésticos o de abastecimiento; industriales; agropecuarios; para la generación de energía eléctrica; como medio de vida acuático; para un uso recreativo y estético; así como en navegación, etc.

I.1.1. Propiedades de importancia medioambiental

Las propiedades fisicoquímicas del agua con mayor trascendencia desde el punto de vista medioambiental son:

- Su *alta capacidad calorífica* y elevados calores latentes de fusión y vaporización, lo que se traduce en que los mantos acuíferos tengan un gran efecto estabilizador del clima. Los pares agua líquida/agua sólida y agua líquida/vapor de agua van a actuar como auténticos reguladores térmicos, tanto del clima como de los seres vivos.

- Su *alta conductividad térmica*, la más alta de los líquidos no metálicos, llegando a ser casi el doble que la mayoría, permitiendo que en los intercambios caloríficos entre en juego toda la masa de agua disponible en poco tiempo, hecho que puede ser muy importante en los seres vivos para poder trasladar calor en caso de circulación impedida.

- *Altas temperaturas de fusión y ebullición*, en comparación con sus homólogos H₂S, H₂Se, H₂Te, debidas a la existencia de enlaces de hidrógeno intramoleculares. Si no fuera por este hecho, el agua “debería” fundir entre -100 y -150°C y hervir hacia -70 ó -80°C, con lo cual sería un gas que se habría evaporado hacia el espacio interestelar en las edades geológicas precedentes y no podría existir la vida tal y como la conocemos.

- *Variación anómala de la densidad*, siendo mayor el valor como líquido que como sólido, lo que da lugar a que el hielo flote en la superficie de las aguas y sirva como aislante contra el aire frío exterior, evitándose la congelación demasiado profunda del manto de agua, lo que significa un gran beneficio para la vida acuática e incluso para determinadas actividades humanas.

- El *gran valor de la tensión superficial*.

- Y, por último, su *gran capacidad disolvente* [Orozco-Barrenetxea, 2008].

I.1.2. Abundancia

Como ya se sabe, casi las tres cuartas partes de la superficie terrestre están cubiertas por agua. En la tabla I.1 se puede ver la distribución del total de agua que hay en nuestro planeta en los distintos tipos existentes.

Se puede observar como el porcentaje más elevado, más del 95%, es agua salada proveniente de mares y océanos, la cual en principio no es apta para consumo humano. El restante 5% está en hielo glaciar, subsuelo, ríos, lagos y en la atmósfera. Sin embargo, sólo poco menos del 0,7% es agua dulce, la cual es imprescindible y de gran importancia para el ser humano. Además, del total de ese agua dulce, menos del 0,01% es agua superficial, que es la que resulta más fácilmente accesible.

Aunque parezcan pequeñas, estas cantidades de agua dulce son suficientes para las actividades humanas incluso para un futuro todavía lejano. Pero, han de tenerse en cuenta dos hechos importantes, por un lado el gran problema de la distribución irregular de las aguas a nivel mundial y regional, y por otro, los problemas de contaminación grave localizada que hacen que el agua sea inutilizable por su baja calidad.

Tabla I. 1. Distribución del agua en nuestro planeta
[Orozco-Barrenetxea, 2008]

Compartimento	Volumen (10 ³ km ³)	Superficie (10 ³ km ³)	% del total
Océanos y mares	1.321.250	361.600	97,2
Aguas continentales superficiales:			
- lagos de agua dulce	230	1.520	0,017
- lagos de agua salada	125	850	0,009
- ríos	104	700	0,008
- ríos	1,2		0,0001
Casquetes polares y glaciares	29.176	17.870	2,15
Agua subterránea:	8.400		0,62
- zona de aireación	67		0,005
- otras hasta 800 m de profundidad	4.170		0,31
- bajo los 800 m	4.170		0,31
Atmósfera	12,9	510.250	0,001
Total (redondeado)	1.360.000		

I.2. Contaminación del agua

A partir de estos datos, resulta difícil entender como los océanos han llegado a convertirse en auténticos vertederos. Se ha pensado que los océanos eran lo suficientemente grandes como para acomodar nuestros residuos sin llegar a experimentar ningún cambio apreciable. Además se ha asumido que cualquier sustancia potencialmente tóxica sería diluida hasta niveles inocuos y llevada muy lejos de nuestras costas.

Aunque esto puede haber tenido algo de cierto en el pasado, la capacidad asimilativa de los océanos parece haber llegado a su límite. Esto probablemente se puede atribuir al gran desarrollo industrial que ha afectado al mundo en los últimos siglos, mejorando por supuesto la calidad de vida, pero provocando al mismo tiempo un profundo impacto en el medio ambiente. Además, el continuo aumento de la población y de su concentración en grandes núcleos urbanos, ha originado la presencia de sustancias extrañas de origen antropogénico en el medio responsables de perturbaciones en la calidad, composición y funcionamiento de los ecosistemas acuáticos [Libes, 1992].

En las áreas a lo largo de la costa se experimenta un crecimiento rápido de la población. Cerca de la mitad de la población mundial está localizada a menos de 60 kilómetros de la costa y podría llegar al 70% en el año 2020 (Naciones Unidas, 1992). En las zonas cercanas a las costas hay un activo crecimiento industrial. En 1998, la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO) de las Naciones Unidas ya pronosticó que la población urbana costera del mundo podría llegar a duplicarse en los próximos 20 a 30 años. A menos que los gobiernos y usuarios de los recursos costeros tomen medidas adecuadas, este rápido incremento en la población conllevaría a un aumento significativo en el desarrollo urbanístico, así como en los caudales de los efluentes urbanos e industriales y, en consecuencia, la degradación del medio ambiente del hábitat de zonas costeras. En este sentido, resultan particularmente preocupantes las previsiones para Europa, donde se encuentra el mayor porcentaje de zonas costeras con alto riesgo de degradación (fig. I.1).

I.2.1. Composición de las aguas naturales

Las aguas en su estado natural van a contener una amplia variedad de sustancias o especies químicas, debido fundamentalmente a su gran capacidad disolvente, reactividad y capacidad de transporte de sustancias en suspensión o en disolución coloidal. De ahí que resulte difícil definir la contaminación hídrica y determinar su grado si no se conocen las características físicas, químicas y biológicas de una determinada agua con carácter previo a que se produzca dicha contaminación.

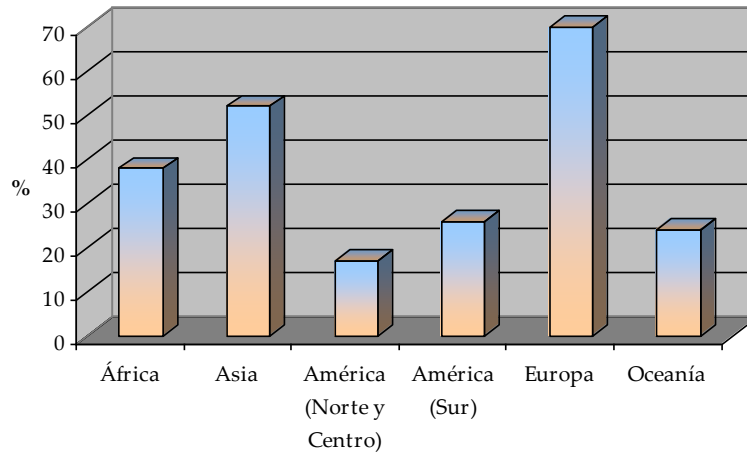


Figura I.1. Áreas costeras con alto riesgo de degradación a causa de actividades antropogénicas según la Organización para la Alimentación y la Agricultura de las Naciones Unidas (FAO, 1998)

La composición de las aguas naturales en ausencia de cualquier impacto humano va a depender del clima, de las condiciones geográficas, así como del tipo de agua de que se trate (marina, superficial, lluvia,...), tipo de terreno, temperatura y presión del medio, o bien según la época del año.

Los gases más abundantes son los provenientes de la disolución de gases atmosféricos como CO_2 , N_2 y O_2 principalmente, los producidos por la actividad de los seres vivos (CO_2 y O_2) y los originados por la descomposición aerobia o anaerobia de los mismos (CO_2 , CH_4 , H_2S , NH_3). También se pueden encontrar cationes como Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Fe^{2+} , etc., provenientes de la disolución de materiales de la corteza terrestre y aniones como HCO_3^- , Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , F^- , NO_3^- , etc. Merece ser señalada también la presencia de especies ácidas como el CO_2 o los ácidos orgánicos provenientes de la oxidación de la materia orgánica y de otras especies inorgánicas como las arenas (sílice) y las arcillas (aluminosilicatos) procedentes de la erosión y el ataque químico del agua sobre los materiales terrestres. Y en cuanto a la materia orgánica deben destacarse las especies provenientes de los seres vivos, tales como aminoácidos, hidratos de carbono, ácidos grasos, alcoholes, terpenos, pigmentos naturales, etc., así como otras macromoléculas orgánicas de origen natural como proteínas y polisacáridos.

Los componentes mayoritarios del agua de mar son los iones Na^+ y Cl^- , además de SO_4^{2-} y Mg^{2+} en menor proporción. En el agua de río, los constituyentes mayoritarios son Ca^{2+} y HCO_3^- (procedentes de la erosión del CaCO_3). Por otro lado, se encuentran las aguas subterráneas, las cuales debido a que transcurren por materiales geológicos que contienen minerales solubles, normalmente contienen mayores concentraciones de sales disueltas que las aguas superficiales. Así, las aguas subterráneas suelen contener altas concentraciones de iones tales como Ca^{2+} , HCO_3^- , Na^+ , Mg^{2+} , SO_4^{2-} , y Cl^- (de 1 a 1000 mg L^{-1}) y algunos elementos tóxicos como As y Se. En general, se puede decir que elementos traza como As, Ba, Cd, Cr, Co, Cu, Mn, Ni, Pb, Sr, y Zn, están presentes a más baja concentración en agua de mar que en aguas superficiales [Orozco-Barrenetxea, 2008; Namiesnik, 2010].

I.2.2. Definición de contaminación del agua

La palabra contaminación hace referencia a la alteración nociva de un medio por agentes físicos o químicos. Existen diferentes tipos de contaminación en función del medio afectado: contaminación del agua, contaminación atmosférica, contaminación del suelo, contaminación acústica, entre otras.

A continuación, se presentan algunas definiciones para la contaminación del agua encontradas en la bibliografía:

La definición legal de contaminación del agua aparece en el artículo 233.1 del Reglamento del Dominio Público Hidráulico, cuya redacción dice así: "...la acción y efecto de introducir materias o formas de energía, o inducir condiciones en el agua que, de modo directo o indirecto, impliquen una alteración perjudicial de su calidad en relación con los usos posteriores o con su función ecológica" [Ortega-Domínguez, 2000].

La Carta del agua firmada en el Consejo de Europa de 1968 dice que: "La contaminación consiste en una modificación, generalmente provocada por el hombre, de la calidad del agua, haciéndola impropia o peligrosa para el consumo humano, la industria, la agricultura, la pesca y las actividades recreativas, así como para los animales domésticos y la vida natural".

La C.E.E. (Comisión Económica para Europa) de las Naciones Unidas ya declaró en 1961 que: “Un agua está contaminada cuando se ve alterada en su composición o estado, directa o indirectamente, como consecuencia de la actividad humana, de tal modo que quede menos apta para uno o todos los usos a que va destinada, para los que sería apta en su calidad natural”.

La Directiva Marco de Aguas 2000/60/CE de 23 de Octubre de 2000 la define como: “La introducción directa o indirecta, como consecuencia de la actividad humana, de sustancias o calor en la atmósfera, el agua o el suelo, que puedan ser perjudiciales para la salud humana o para la calidad de los ecosistemas acuáticos, o de los ecosistemas terrestres que dependen directamente de ecosistemas acuáticos, y que causen daños a los bienes materiales o deterioren o dificulten el disfrute y otros usos legítimos del medio ambiente”.

Mientras que la contaminación y la polución han sido ampliamente usadas como sinónimas, se puede decir que la contaminación es la liberación medioambiental de sustancias en concentraciones medibles mientras que la polución tiene efectos perceptibles, ya sean medibles o detectables, en organismos vivos. Con el siguiente símil se puede aclarar todavía más estos dos conceptos, ya que si se considera al oxígeno liberado durante la fotosíntesis como un contaminante medioambiental, el aroma que desprende una rosa sería el polutante medioambiental. La contaminación puede entonces ser reconocida como la dispersión de una sustancia en el medio ambiente a una concentración tal que si se incrementase hasta un nivel suficientemente alto, podría causar efectos indeseables o incluso provocar polución medioambiental [Pérez-Bendito, 1999].

I.2.3. Contaminantes del agua

La contaminación acuática puede proceder tanto de fuentes identificables, como fábricas, refinerías o desagües de aguas residuales, como de otras que no pueden identificarse con precisión, como son las escorrentías de la agricultura o la minería, o las filtraciones de fosas sépticas o depuradoras.

De las muchas clasificaciones que existen de los diferentes tipos de contaminantes, podríamos citar aquella que atiende a su comportamiento una vez liberados al medio [Clark, 2001]:

a) *Residuos disipantes*: Existe un número de residuos que cuando llegan al mar o a los estuarios pierden rápidamente sus propiedades perjudiciales al contacto con el agua. Como es el caso del calor, ácidos y bases, o cianuros.

b) *Residuos degradables*: El mayor volumen de residuos que entra en las aguas costeras y de estuarios, está compuesto principalmente de materia orgánica, la cual está sujeta al ataque bacteriano, proceso oxidativo que descompone los compuestos orgánicos en compuestos inorgánicos estables tales como CO₂, H₂O y NH₃.

Dentro de los residuos de este tipo de contaminantes se encontraría:

- Una gran parte de las aguas residuales urbanas.
- Residuos procedentes de la agricultura.
- Residuos del procesado de alimentos.
- Residuos de las destilerías y de la elaboración de cervezas.
- Industrias papeleras
- Residuos procedentes de la industria química, incluyendo una gran variedad de moléculas.
- Así como vertidos de petróleo.

c) *Residuos conservativos*: Algunos materiales no están sujetos al ataque bacteriano ni son disipados, por lo que pueden permanecer durante mucho tiempo, y además suelen reaccionar de diferentes formas con plantas y animales, provocando efectos nocivos. Debido a su persistencia y efectos perjudiciales, son reconocidos como serias amenazas. Las principales categorías de este tipo de residuos son:

- Hidrocarburos halogenados, pesticidas, bifenilos policlorados (PCBs), etc.
- Elementos radiactivos.
- Y **metales pesados** (cadmio, mercurio, cobre, plomo, zinc, etc.)

Otra posible clasificación de los contaminantes podría ser: por un lado, aquellas sustancias que no se consideran tóxicas, sino que tan sólo producen mal

olor y dan color al agua, sin llegar a ser directamente peligrosas para el hombre y el medio; y por otro lado, aquellas sustancias que, sin embargo, sí son causantes de graves daños, entre las que se encuentran:

- De carácter inorgánico: Metales pesados (Pb, Cd, Hg...), compuestos de As, Be, Sb, Se, CN⁻, NO₂⁻,...
- Microcontaminantes orgánicos: Fenoles y clorofenoles, pesticidas, PCBs, HAPs.
- Elementos radiactivos: ²²⁶Ra, ⁹⁰Sr, ¹³⁷Cs, etc.
- Microorganismos patógenos: Bacterias, virus, hongos y algas.

I.3. Contaminación por metales pesados

El término metal pesado hace referencia a cualquier elemento químico metálico cuya densidad alcanza valores de más de 5 g/mL pudiendo ser tóxico a bajas concentraciones. Al menos 20 de ellos son conocidos por ser altamente tóxicos incluyendo al arsénico (As), cadmio (Cd), cromo (Cr), mercurio (Hg), plomo (Pb), cobre (Cu), níquel (Ni), zinc (Zn) y talio (Tl), los cuales son liberados al medio ambiente en cantidades suficientes como para constituir un riesgo para la salud humana. Los metales enlazan fácilmente con el material particulado o sedimentos, y en esta forma son relativamente no-tóxicos, pero cambios en el tiempo o en las condiciones del medio u otros factores medioambientales pueden provocar la movilización de los mismos, aumentando su disponibilidad y toxicidad [Berkowitz, 2008; Namiesnik, 2010].

Debido a su alto grado de persistencia en el medio, su tendencia a la bioacumulación en la cadena trófica y, en ciertos casos, a su elevada toxicidad incluso a bajas concentraciones, hacen que los metales pesados sean considerados uno de los contaminantes ambientales más peligrosos y por lo tanto, un riesgo importante para los seres vivos.

A determinadas concentraciones, algunos metales como Fe, Zn, Cu, Ni, Co, Cr(III), Se o Bi, son elementos necesarios para el desarrollo de la biota y esenciales para llevar a cabo funciones catalíticas específicas. No obstante, cuando la concentración de estos metales supera el aporte nutricional pueden conllevar

efectos tóxicos e incluso letales. Se dice que un metal es esencial cuando su ausencia puede llegar a afectar a determinados procesos biológicos, haciendo que no se desarrollen de manera correcta y provocando en situaciones límite daños importantes en los organismos, incluso la muerte. Sin embargo, otros metales como el Cd, Pb, Hg, Al, Cr(VI) o As, son considerados extremadamente peligrosos para la vida dada su elevada toxicidad incluso a bajas concentraciones.

Cuando se superan los niveles máximos permitidos todos los metales, tanto esenciales como no esenciales, pueden afectar al metabolismo normal de un organismo, bien porque se unan a biomoléculas no específicas o porque provoquen daños oxidativos debido a su habilidad para catalizar reacciones redox. Esto puede terminar en la desactivación de reacciones enzimáticas esenciales, dañar las estructuras celulares y modificar el ADN. En humanos, exposiciones cortas a altos niveles de metales puede causar síntomas de toxicidad aguda, mientras que exposiciones largas de ciertos metales a niveles más bajos puede acabar incluso en cáncer [Berkowitz, 2008].

Estos hechos se muestran gráficamente en la figura I.2 representando desde una deficiencia a un exceso de metales trazas esenciales (a) y no esenciales (b).

En el primero, la región lineal refleja las concentraciones para un óptimo crecimiento, salud y reproducción, e indica que tanto una deficiencia como un exceso tienen efectos dañinos. En el caso de un elemento no esencial, será tolerable a bajas concentraciones pero tóxico e incluso letal con el aumento excesivo de la concentración.

I.3.1. Origen de los metales pesados en el medio acuático

Los metales pesados son componentes naturales de la corteza terrestre, por lo que existen causas de origen natural que pueden contribuir a incrementar las concentraciones de los mismos en el medio acuático, como erupciones volcánicas, aportes fluviales y aguas subterráneas, erosión y lixiviación de rocas, así como deposición de partículas transportadas por el viento. Pero en las últimas décadas,

los aportes de origen humano han cobrado especial relevancia llegando a superar en orden de magnitud al primero.

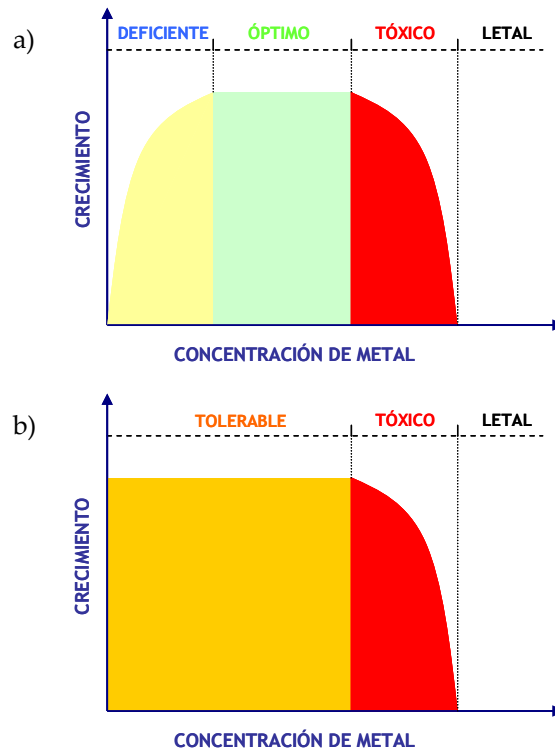


Figura 1.2. Respuesta de los organismos en función de la concentración de metales (a) esenciales y (b) no esenciales

Las fuentes antropogénicas principales son las actividades de minería, fundición y refinado, que implican extraer los metales de sus menas en los depósitos subterráneos, y posteriormente fundirlos y refinarlos hasta convertirlos en bienes de consumo que, después de usados, se desechan liberando metales al medio durante todas estas operaciones. También se emiten metales a la atmósfera por la emisión de materia particulada en automóviles y fábricas, que en un período más o menos largo acabarán depositándose en la superficie terrestre. El vertido de aguas residuales de determinadas industrias siderometalúrgicas, el tratamiento de superficies, curtidos, las actividades de dragado de fondos, las

pinturas empleadas en los barcos y estructuras, etc., son ejemplos clásicos de fuentes de metales pesados.

En la tabla I.2 se muestran los metales pesados empleados en algunas actividades industriales. Los residuos generados en este tipo de industrias, pueden contener restos de metales pesados utilizados en los procesos de producción, los cuales pueden acabar en el medio acuático.

*Tabla I.2. Metales pesados empleados en las principales industrias
[Djanarto, 1992]*

Industria:	Cd	Cr	Cu	Co	Hg	Pb	Ni	As	Zn
Pintura	X	X		X	X	X	X		X
Textil	X	X					X	X	X
Recubrimiento metálico		X	X			X	X		X
Papelera	X					X			X
Impresión	X					X			
Plástico		X					X	X	
Del cuero		X				X			X

Se puede comprobar como en algunas industrias aparecen involucrados sólo algunos metales en el proceso, como es el caso del Cd y Pb en la industria de la impresión. Sin embargo, la mayoría de los metales pesados son ampliamente usados en diversos campos tales como industrias dedicadas a la pintura. Esto puede provocar dificultades a la hora de conocer el origen de una contaminación, al estar involucrados numerosos metales pesados en las diferentes industrias.

Con independencia de que se trate de origen antropogénico o aporte natural (medio geológico), los metales pesados se pueden incorporar al medio acuático a través de los ríos, precipitaciones, y deposiciones a partir de la atmósfera, aguas y lodos residuales ricos en materiales de desecho, y vertidos de origen industrial o explotaciones mineras, llegando a contaminar las aguas de consumo.

En la tabla I.3 aparecen a modo de resumen las fuentes y efectos más importantes sobre la salud humana por exposición a algunos metales presentes en las aguas, según la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos EPA (Environmental Protection Agency).

Tabla I.3. Fuentes y efectos más importantes de algunos metales presentes en las aguas [<http://www.epa.gov/safewater/contaminants/index.html>] (2009)

Contaminante	Posibles efectos sobre la salud por exposición que supere el NMC*	Fuentes de contaminación comunes en agua potable
Antimonio (Sb)	Aumento de colesterol en sangre; descenso de azúcar en sangre.	Efluentes de refinerías de petróleo; retardadores de fuego; cerámicas; productos electrónicos; soldaduras.
Arsénico (As)	Lesiones en la piel; trastornos circulatorios; alto riesgo de cáncer.	Erosión de depósitos naturales; agua de escorrentía de huertos; aguas con residuos de fabricación de vidrio y productos electrónicos.
Bario (Ba)	Aumento de presión arterial.	Aguas con residuos de perforaciones; efluentes de refinerías de metales; erosión de depósitos naturales.
Berilio (Be)	Lesiones intestinales.	Efluentes de refinerías de metales y fábricas que emplean carbón; efluentes de industrias eléctricas, aeroespaciales y de defensa.
Cadmio (Cd)	Lesiones renales.	Corrosión de tubos galvanizados; erosión de depósitos naturales; efluentes de refinerías de metales; líquidos de escorrentía de baterías usadas y de pinturas.
Cromo total (Cr)	Dermatitis alérgica.	Efluentes de fábricas de acero y papel; erosión de depósitos naturales.

* NMC: Nivel Máximo del Contaminante (NMC): Es el máximo nivel permitido de un contaminante en agua potable.

Tabla I.3. cont. Fuentes y efectos más importantes de algunos metales presentes en las aguas [<http://www.epa.gov/safewater/contaminants/index.html>] (2009)

Contaminante	Posibles efectos sobre la salud por exposición que supere el NMC*	Fuentes de contaminación comunes en agua potable
Cobre (Cu)	Exposición a corto plazo: molestias gastrointestinales. Exposición a largo plazo: lesiones hepáticas o renales.	Corrosión de cañerías en el hogar; erosión de depósitos naturales; percolado de conservantes de madera.
Plomo (Pb)	Bebés y niños: retardo en desarrollo físico o mental; los niños podrían sufrir leve déficit de atención y de capacidad de aprendizaje. Adultos: trastornos renales; hipertensión.	Corrosión de cañerías en el hogar; erosión de depósitos naturales.
Mercurio Inorgánico (Hg)	Lesiones renales.	Erosión de depósitos naturales; efluentes de refinerías y fábricas; lixiviados de vertederos y tierras de cultivo.
Selenio (Se)	Caída del cabello o de las uñas; adormecimiento de dedos de manos y pies; problemas circulatorios.	Efluentes de refinerías de petróleo; erosión de depósitos naturales; efluentes de minas.
Talio (Tl)	Caída del cabello; alteración de la sangre; trastornos renales, intestinales o hepáticos.	Percolado de plantas procesadoras de minerales; efluentes de fábricas de vidrio, productos electrónicos y medicamentos.

* NMC: Nivel Máximo del Contaminante (NMC): Es el máximo nivel permitido de un contaminante en agua potable

I.3.2. Distribución de los metales pesados en el medio acuático

Los sistemas acuáticos naturales pueden ser considerados como una serie de compartimentos interrelacionados entre sí en los que se desarrollan procesos físicos, químicos, geológicos y biológicos. Aunque, el agua líquida es el constituyente característico del medio acuático, en estos sistemas han de considerarse otra serie de compartimentos, entre los que se incluyen materias sólidas (partículas en suspensión y fondos sedimentarios y rocosos) y biota, estableciéndose interacciones entre todos ellos mediante procesos de transporte de masas y transferencias de energía, lo cual puede conllevar cambios, ya sea a escala local o global, en la composición química de los mismos.

Dentro de un mismo sistema acuático existe una íntima relación entre el sedimento, la materia en suspensión, la biota y la columna de agua sobrenadante, de manera que los metales pueden pasar de uno a otro mediante distintos procesos. En la figura I.3 se presentan las principales vías de transferencia de los metales pesados entre los diferentes compartimentos del ecosistema acuático.

Entre los procesos más importantes, por sus implicaciones para la vida en los ríos y estuarios, cabe destacar aquellos que relacionan a los compartimentos abióticos con la biota presente. Estas múltiples interrelaciones configuran ciclos internos para los elementos, que se regulan de manera natural, aunque pueden verse alterados por desequilibrios entre los flujos de entrada y salida originados por factores externos, atribuibles tanto a fenómenos naturales como insumos antropogénicos. En ocasiones se entrelazan ambos orígenes, como son los casos de la contaminación de afluentes y escorrentías, que posteriormente descargan sus aguas en el río, emisión de partículas polutantes a la atmósfera que después se depositan sobre el agua, removilización de sedimentos mediante operaciones de dragado, etc.

Los metales pesados se encuentran habitualmente en concentraciones muy bajas en el agua, apareciendo disueltos o adsorbidos a otras partículas, esto se debe a la baja solubilidad de estos elementos, con independencia del tipo de metal y de la especie química en la que se encuentren. Por el contrario, en los sedimentos se

acumulan los metales pesados, de modo que se pueden encontrar en niveles elevados. Ambos hechos conducen a que se alcancen valores del factor de concentración en los sedimentos de $10^3 - 10^5$ respecto a la fase disuelta, por lo que dada la relación existente entre la columna de agua y el sedimento, es muy importante tenerlos en cuenta como sumideros de metales pesados.

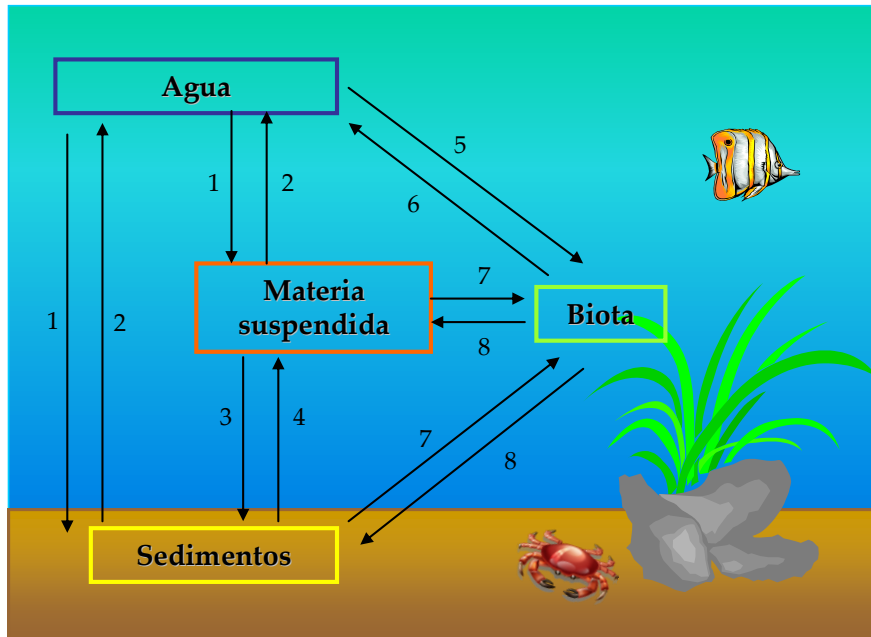


Figura I.3. Principales procesos de transferencia de metales pesados entre los diferentes compartimentos del medio acuático. 1: Adsorción, intercambio iónico o complejación; 2: Desorción; 3: Precipitación o floculación; 4: Resuspensión; 5: Ingestión o adsorción; 6: Desorción; 7: Ingestión; 8: Deposición

Existen numerosos factores que pueden alterar la concentración y distribución natural de los metales pesados en el medio acuático, siendo las modificaciones más relevantes las que tienen lugar en aquellas zonas que pueden considerarse interfases con el medio acuático: líquido-líquido (zonas de estuarios, en las que las aguas fluviales se encuentran con las aguas salinas procedentes del mar), sólido-líquido (cauces, sedimentos y materia suspendida), gas-líquido (atmósfera-agua). Sin embargo, también han de tenerse en cuenta otros factores como los movimientos de las masas de aguas, tanto en sentido vertical (circulación

vertical) como en sentido horizontal (corrientes marinas), así como las causas de origen biológico.

Es de destacar que las zonas costeras y de estuarios, son los medios más importantes de insumos de metales pesados, puesto que el agua de los ríos suele contener mayor concentración que el agua de mar oceánica, sobre todo si el río está sujeto a procesos de polución antropogénica. Así, los ríos junto con aportes derivados de actividades antropogénicas y otros aportes naturales en las áreas costeras, determinan un gradiente de concentración de metales que disminuye a medida que aumenta la distancia respecto a la costa.

La tabla I.4 muestra los intervalos de concentración de metales pesados en diferentes muestras acuosas naturales: aguas de río, aguas costeras, bahías y estuarios, y aguas oceánicas [Crompton, 1997].

Tabla I.4. Intervalos de concentración de metales en aguas de río, costeras y oceánicas [Crompton, 1997]

Metal	Agua de río ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Agua costera, bahía y estuario ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Agua de mar oceánica superficial ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
Al	73-3600	6,4-63	0,1-0,6
Bi	0,005	0,00005-0,68	<0,000003-<0,000005
Cd	0,03-5	0,015-5	0,01-0,126
Co	0,2-10	<0,01-0,25	0,003-0,16
Cr	0,05-23	0,095-3,3	0,005-1,26
Cu	0,11-200	0,069-20	0,0063-2,8
Fe	1-3925	1-250	0,2-320
Hg	0,009-1,3	0,00002-15,1	0,002-0,078
Mo	0,74-4,08	2,1-200	3,2-12
Ni	1,5-40	0,2-5,33	0,15-0,93
Pb	0,13-60	0,038-7,44	0,000041-9
V	0,1-24	0,01-5,1	0,45-2
Zn	0,86-630	0,007-200	0,05-10,9

Como se deduce de los datos mostrados en la tabla I.4, existe una gran diferencia entre los niveles de concentración presentados por los distintos metales,

comprobándose como, en general, las concentraciones máximas en las aguas de los ríos son superiores a las del agua de mar. Esto se debe a la intervención de agentes moduladores, bien sea actuando como fuentes o como sumideros, sobre la distribución de los metales pesados en los sistemas ambientales costeros. Este efecto se puede apreciar con mayor claridad si se comparan las concentraciones de estos metales en aguas costeras, bahías y estuarios con los valores encontrados en aguas oceánicas, donde la influencia de estos agentes es notablemente inferior.

I.3.3. Sumideros de los metales pesados en el medio acuático

Los principales procesos que contribuyen a disminuir la concentración de metales pesados en el medio acuático son la sorción sobre la superficie de partículas, precipitación, coprecipitación y la incorporación a la biota. No obstante, algunos de estos fenómenos pueden tener carácter reversible, produciendo una redisolución de los metales asociados a esas especies mediante desorción, disolución y procesos biológicos, como se representó en la figura I.3 [Greenaway, 1992].

Se va a describir detenidamente cada uno de ellos:

a) Procesos de adsorción: La mayor parte de la materia particulada en los medios acuáticos (arcillas, óxidos hidratados metálicos y materia orgánica particulada) posee una carga negativa neta, que le confiere carácter coloidal. Por tanto, los cationes metálicos son electrostáticamente atraídos hacia su superficie. Algunas de estas partículas, enriquecidas de metales pesados, se hunden hasta depositarse en el fondo. El grado en el que tiene lugar este fenómeno depende, entre otros factores, de la naturaleza del metal, la abundancia de materia particulada, la concentración de otros solutos y la profundidad de la columna de agua [Förstner, 1983].

b) Procesos de precipitación: En el agua natural predominan los cloruros, sulfatos y bicarbonatos. Aunque, en general, las formas químicas de los metales pesados asociados a estas especies son bastante solubles, las características del agua natural pueden producir la precipitación de éstas bajo determinadas

condiciones. En el caso de los hidróxidos por ejemplo, ésta solubilidad disminuye con el aumento del pH, lo que puede producir la precipitación de éstos compuestos en condiciones básicas. Por otro lado, los sulfuros de los metales pesados son prácticamente insolubles al pH de las aguas naturales, mientras que la solubilidad de los carbonatos es altamente dependiente de la presión parcial de CO₂, aumentando en su presencia. En el caso particular de las zonas de estuario se ha detectado la disminución de la concentración de metales procedentes del aporte fluvial y que se origina, entre otras razones, por la aparición de fenómenos de precipitación fundamentalmente debidos a los cambios de pH y fuerza iónica que tienen lugar en las zonas de mezcla de aguas dulces y marinas. Por otro lado, en las aguas porosas e intersticiales de los sedimentos, bajo condiciones anóxicas, generadas por la oxidación de la materia orgánica particulada, ciertas bacterias reducen el sulfato a sulfuro, el cual puede formar con los metales pesados sulfuros metálicos, que presentan muy baja solubilidad, favoreciendo la precipitación y coprecipitación [Greenaway, 1992].

c) Incorporación a la biota: Los organismos vivos también influyen en el contenido y distribución de los metales pesados [Vasconcelos, 2001; Öztürk, 2003]. En este sentido, por ejemplo, el fitoplancton incorpora metales pesados para emplearlos en determinados sistemas enzimáticos que catalizan procesos como la glicolisis, el ciclo del ácido tricarboxílico, la fotosíntesis y el metabolismo de las proteínas; y el zooplancton y la fauna bentónica, que se alimentan por filtración, acumulan metales pesados presentes en los sedimentos [Bruland, 1983]. A este tenor, se considera que la actividad biológica es responsable de más del 90% del transporte vertical de metales pesados en la columna de agua [Bryan, 1976].

I.4. Episodios contaminantes por metales pesados

En muchas ocasiones, la actitud irresponsable del hombre ha dado lugar a numerosos desastres ecológicos causados muchos de ellos mediante envenenamiento por metales pesados. Algunos de estos desastres se citan a continuación:

a) Envenenamiento por Hg: 1932-1956 [Fowler, 1990; Kudo, 1998].

La industria Chisso Corporation localizada en el pueblo pesquero de la Bahía de Minamata en Japón, desarrollaba plásticos, medicamentos y perfumes, usando Hg en su producción. Éste se liberaba al ambiente, ya que, según pensaban, el Hg^{2+} como tal, no podía ser absorbido por los seres vivos. El problema está en que el ambiente puede transformar los contaminantes, haciendo que lo que antes no era posible que pasara a los seres vivos, pueda acabar formando parte de la cadena trófica. Y así fue, el Hg^{2+} liberado pasaba a metilmercurio por la acción bacteriana. El metilmercurio es liposoluble y presenta una elevada toxicidad, puesto que puede atravesar fácilmente las membranas biológicas e incorporar el metal en la cadena trófica, afectando al sistema nervioso. Los síntomas que se percibían eran: ceguera, sordera, desmayos, comportamiento y discursos irracionales, movimientos involuntarios,...

Desde 1932 se liberó al ambiente cerca de 27 toneladas de compuestos de mercurio, viéndose afectadas cerca de 3000 personas, por la acción irresponsable de la empresa.

b) Envenenamiento por Cd: 1947-1965 [Nogawa, 1983; Förstner, 1979].

En 1947 una extraña y dolorosa enfermedad afectó a los habitantes de las aldeas cercanas al río Jintsu en Toyama (Japón), próxima a un área minera. Durante los siguientes años, esta enfermedad llegó a conocerse como "itai-itai" (literalmente "¡ay!, ¡ay!") haciendo referencia a los gritos de dolor provocados por una enfermedad crónica que afectaba principalmente al tejido óseo, produciendo deformaciones en los huesos. La causa fue un envenenamiento por Cd procedente de una mina la cual vertía directamente sus residuos al río. Posteriormente esa agua era empleada para regar los campos de arroz, por lo que este metal pasaba directamente a los habitantes de la zona.

c) Envenenamiento por Cr(VI): (1960) [Förstner, 1979].

Durante 1960 varios casos de cáncer de pulmón fueron localizados en los trabajadores de la fábrica Kiriyama de Nippon-Denko en la isla de Hokkaido (Japón). Advertencias médicas fueron proclamadas acerca de que la exposición por inhalación de polvo que contenía cromo con altos estados de oxidación (IV) y (VI) estaba asociada con daños en el aparato respiratorio y perforaciones del tabique nasal.

d) Envenenamiento por Pb: (1969) [Förstner, 1979].

La toxicidad del plomo, a diferencia de la del mercurio y cadmio, ha sido conocida desde hace mucho tiempo. El poeta griego Nicander describió la enfermedad conocida como plumbismo, la cual era producida por envenenamiento agudo de plomo, hace ya unos 2000 años.

Casos de envenenamiento por plomo no son muy frecuentes, pero ocasionalmente ocurren como el caso detallado a continuación. En 1969 una unidad militar británica estacionada en Hong Kong sufrió de vómitos severos, daños intestinales y desórdenes circulatorios. El origen fue cromato de plomo, el cual había sido empleado para mejorar la coloración en una especia de curry. Varios análisis revelaron un contenido en plomo del 1,08%. Dado que esta especia era importada a muchos países, se empezaron a llevar a cabo más controles gubernamentales.

e) Envenenamiento por Cu: (1972) [Förstner, 1979].

En 1972 un serio envenenamiento por cobre de peces dio lugar a un interesante caso de contaminación marina. Innumerables peces muertos de diferentes tamaños y especies fueron encontrados en la costa de Holanda. El origen de tal desastre fue descubierto accidentalmente al encontrar varios kilos de cristales de sulfato de cobre enterrados bajo la arena.

f) El Caso de Derwent (Tasmania, Australia): (1977) [Eustace, 1974].

Se encontraron mejillones con unas concentraciones de Hg, Zn, Pb y Cd tales que los hacían no sólo incomedibles, sino poderosos venenos. El origen de esta situación era la altísima contaminación del estuario, debido a la existencia de efluentes industriales, principalmente de una planta refinadora de Zn.

g) El accidente minero de Aznalcóllar (Sevilla, España): (1998) [Meharg, 1999; Drake, 1999].

Junto con la catástrofe del buque "Prestige" (2002), ha sido uno de los desastres ecológicos más importante y de mayor repercusión social que ha sufrido España en el último siglo.

El 25 de Abril de 1998, se produjo en Aznalcóllar la rotura de una presa procedente de una mina de pirita. El resultado fue un importante vertido de agua ácida y de lodos muy tóxicos, con altas concentraciones de metales pesados.

Aunque los lodos no llegaron a alcanzar el Parque Nacional de Doñana, considerado el santuario más grande de aves de Europa, las aguas sí invadieron la región externa del Parque Nacional desembocando en el río Guadalquivir y alcanzando finalmente el Océano Atlántico.

Las administraciones central y autonómica no escatimaron en medios para minimizar los impactos ambientales y socioeconómicos generados por la riada tóxica. El Plan de Medidas Urgentes permitió la retirada de la mayor parte de los lodos sedimentados y la vegetación contaminada así como la depuración de las aguas ácidas retenidas en la marisma. Posteriormente, la Junta de Andalucía, a través de su Consejería de Medio Ambiente, puso en marcha un proyecto de gestión integrada de cuenca denominado el Corredor Verde del Guadiamar, cuyos objetivos fundamentales eran, por un lado, evitar la dispersión y remediar la contaminación producida por el vertido minero sobre el río Guadiamar y la marisma afectada, y por otro, crear un corredor ecológico que permitiera recuperar el flujo de especies y procesos naturales que existía entre los ecosistemas de Sierra Morena y de los arenales del litoral de Doñana.

h) Accidente en Baia Mare (Rumanía): (2000) [BBC, 2000]

Los accidentes ocurridos han generado una creciente preocupación en los sitios donde existen explotaciones mineras. El desastre ocurrido en Baia Mare, Rumania, en enero de 2000, liberó enormes cantidades de cianuro y metales pesados, particularmente cobre, en los ríos Somes, Tisza y finalmente en el Danubio, antes de alcanzar el mar Negro. La contaminación de los ríos afectó al agua potable de 2,5 millones de personas, provocó la destrucción de muchas especies acuáticas, así como impactos negativos en los ecosistemas de la zona. Es considerado uno de los peores accidentes medioambientales ocurridos en Europa después del de Chernobil.

i) Contaminación por As en Bangladesh: (Desde 1970) [Ahuja, 2008; Smith, 2000; Alam, 2003].

La contaminación del agua subterránea por arsénico en Bangladesh es, hasta la fecha, el mayor caso de envenenamiento de una población registrado en la historia. A principios de los años setenta, se instalaron un gran número de pozos entubados para abastecer de “agua pura” a la población y prevenir de la mortalidad debida a enfermedades gastrointestinales. Sin embargo, no se tuvo en

cuenta la contaminación por As del agua de los millones de pozos entubados. Se ha estimado la existencia de unos 9 millones de pozos contaminados y que más de 29 millones de personas en Bangladesh están expuestas a concentraciones de As superiores a la concentración máxima de 10 $\mu\text{g/l}$ (10 ppb) recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Los efectos en la salud al ingerir agua contaminada con arsénico se manifiestan lentamente, pudiendo aparecer años más tarde de su consumo. Los síntomas incluyen dolores de estómago, serios problemas de piel en forma de hiperqueratosis en las palmas de las manos y en los pies, cáncer de piel, cáncer de vejiga y otros órganos, problemas de los vasos sanguíneos en los pies y las piernas. Otros síntomas posibles son diabetes, alta presión sanguínea y problemas reproductivos.

Se han organizado un gran número de reuniones a lo largo de estos años con el fin de dar posibles soluciones a este problema, sin embargo, todavía no se ha encontrado una solución real.

I.5. Toxicidad de los metales pesados

Los metales en el medio ambiente difieren de otras sustancias, como la materia orgánica, en que son permanentes, es decir, no son creados ni destruidos por el hombre. En la figura I.4 se muestran los tiempos de residencia de los elementos de la tabla periódica en el agua de mar oceánica. Se puede comprobar claramente como los tiempos de permanencia de los metales pesados en los océanos son bastante elevados.

Además, los organismos marinos tienden a concentrar estos contaminantes en sus tejidos mediante un proceso llamado **bioacumulación**. Este enriquecimiento hace referencia al balance entre la cantidad de metales incorporados a los seres vivos y los que éstos son capaces de eliminar de su propio organismo. El grado de enriquecimiento es variable y depende de factores tales como (1) la naturaleza química del contaminante, (2) el tipo de organismo, (3) su estado fisiológico, (4) la temperatura del agua, y (5) la salinidad. Aunque las concentraciones de metales pesados en la mayoría de los sistemas costeros y de estuario suelen encontrarse por debajo de los niveles tóxicos, se han comprobado

efectos a medio-largo plazo sobre los organismos vivos debido principalmente a fenómenos de bioacumulación.

El consumo de los tejidos contaminados provoca que los contaminantes pasen a la cadena alimenticia. Si la bioacumulación ocurre en cada transferencia a niveles tróficos superiores, la concentración del contaminante aumenta. A ese incremento en la concentración de un polutante en los organismos a medida que asciende en su posición dentro de la cadena trófica, se le conoce como **biomagnificación**. Así, la cantidad de metal retenida por un organismo es asimilada directamente por su depredador, que a su vez puede servir de alimento a otro organismo situado en un nivel superior de la cadena trófica, con el consiguiente incremento en la cantidad de metal acumulado por este último.

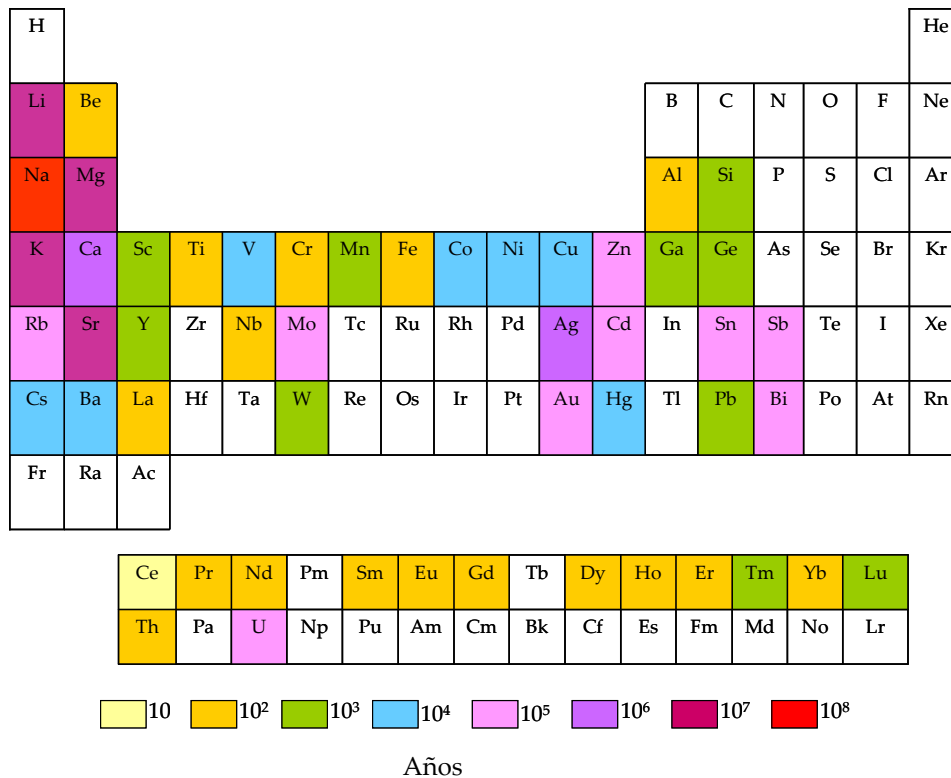


Figura I.4. Tiempos medios de residencia de los elementos en el agua de mar oceánica

En la figura I.5 se representa la bioacumulación de metales pesados a lo largo de la cadena trófica, observándose como a medida que se asciende, la concentración del contaminante va aumentando.

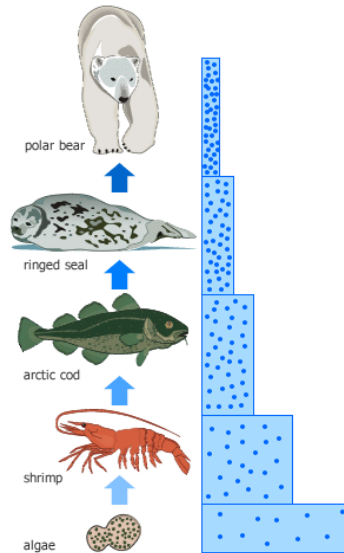


Figura I.5. Representación de la bioacumulación de metales a lo largo de la cadena trófica

Debido a que la biomagnificación y otros procesos de transporte requieren tiempo, el efecto nocivo de muchos compuestos no llega a ser evidente hasta el transcurso de décadas. Esto hace que sea difícil establecer una relación directa entre un contaminante específico y un cambio medioambiental [Libes, 1992].

Existen otros términos, además de la **bioacumulación** y de la **biomagnificación**, empleados frecuentemente para describir la conducta de los metales pesados en relación con los sistemas biológicos acuáticos:

La **biodisponibilidad** hace referencia al grado de accesibilidad de los metales pesados hacia los organismos vivos. Así, factores fisicoquímicos como la concentración del metal en el medio, su especiación química, la temperatura, la salinidad, la presencia o ausencia de agentes complejantes, la presencia o ausencia de otros metales y factores propios de los organismos como el grado de impermeabilidad superficial, la etapa nutricional en la que se encuentre, o la etapa

en el ciclo de muda, entre otros, determinan la biodisponibilidad de los metales hacia los organismos.

Por último, el término **bioconcentración** hace referencia a la relación existente entre la incorporación de metales al organismo vivo y el medio abiótico en el que habita. El grado en el cual un metal se concentra en un organismo marino viene dado por el factor de enriquecimiento (FE), que se define como el cociente entre la concentración de metal en el material biogénico y la concentración del metal en el agua [Campbell, 2002]. Es de destacar que el fitoplancton y zooplancton, base fundamental de la cadena trófica en los sistemas acuáticos, presentan unos factores de enriquecimiento notables para ciertos elementos. Otros organismos que sobresalen son los moluscos por sus altos niveles de enriquecimiento, mientras que los peces, también acumulan metales, aunque con factores de enriquecimiento notablemente menores a los anteriores organismos [Kennish, 1996]. Así, cada vez cobra más importancia la evaluación de la acumulación de metales pesados en organismos acuáticos a través del análisis químico del contenido metálico en sus tejidos, con la doble intención de investigar la distribución y comportamiento de los metales en relación con la biota acuática, además de preservar tanto las especies animales como la salud humana, puesto que muchos de estos organismos sirven de alimento al hombre.

Los metales pesados actúan sobre los organismos vivos no sólo en función de su concentración, sino también de otros factores tanto intrínsecos a la naturaleza del propio organismo (familia y especie a la que pertenece, mecanismos de regulación de metales, edad, estrés, etc.) como a las características del hábitat, además de depender del tiempo al que hayan estado expuestos al metal (efectos agudos o crónicos) y del grado de accesibilidad de éstos por parte de los organismos vivos.

En particular, se debe hacer una mención especial a la **especiación química**, ya que no todas las formas de un metal están igualmente disponibles y por lo tanto no son igualmente tóxicas. En general, las formas metiladas de un metal tienden a ser más tóxicas y a presentar más tendencia a la biomagnificación.

En la tabla I.5 se han recogido los factores más característicos que influyen en la toxicidad de metales pesados en sistemas acuáticos [Libes, 1992].

Tabla I.5. Factores que influyen en la toxicidad de metales en sistemas acuáticos
[Libes, 1992; Pastor, 1994]

Factores propios del metal	Naturaleza
	Concentración
	Estado de oxidación del metal
	Según el tipo de especies: orgánicas e inorgánicas
	Según la fase: Disuelto (iones, complejos iónicos, quelatos iónicos, etc.) o particulado (fase coloidal, precipitado, adsorbido, etc).
Presencia de otras especies químicas	Sinergia
	No interacción
	Antagonismo
Factores medioambientales	Temperatura
	pH
	Concentración de oxígeno disuelto
	Intensidad de luz
	Salinidad
Factores propios del organismo	Etapa de desarrollo (huevo, larva, etc.).
	Cambios en el ciclo de vida (muda, reproducción, etc.)
	Edad y tamaño
	Sexo
	Condiciones de alimentación
	Actividad
	Protección adicional (conchas, etc.)
	Tolerancia a metales

La figura I.6 recoge de manera general una clasificación de la toxicidad de los elementos para los organismos vivos, teniendo en cuenta no sólo su naturaleza, sino también sus posibilidades de bioacumulación en los organismos.

En general, los mecanismos de acción tóxica de los metales se pueden agrupar en:

- Agregación a centros donde los metales no se unen normalmente.
- Sustitución de elementos esenciales, particularmente en los sitios activos de las enzimas.
- Unión que cambia la conformación y reactividad de las enzimas.
- Reemplazo de unos grupos (fosfato) por otros (arsenato) con dimensiones similares.
- Precipitación por formación de compuestos insolubles (fosfatos, sulfuros).

- Alteración de la permeabilidad de las membranas por combinación de los metales con diversos grupos.
- Cambio de elementos con papel electroquímico, tales como potasio y talio.

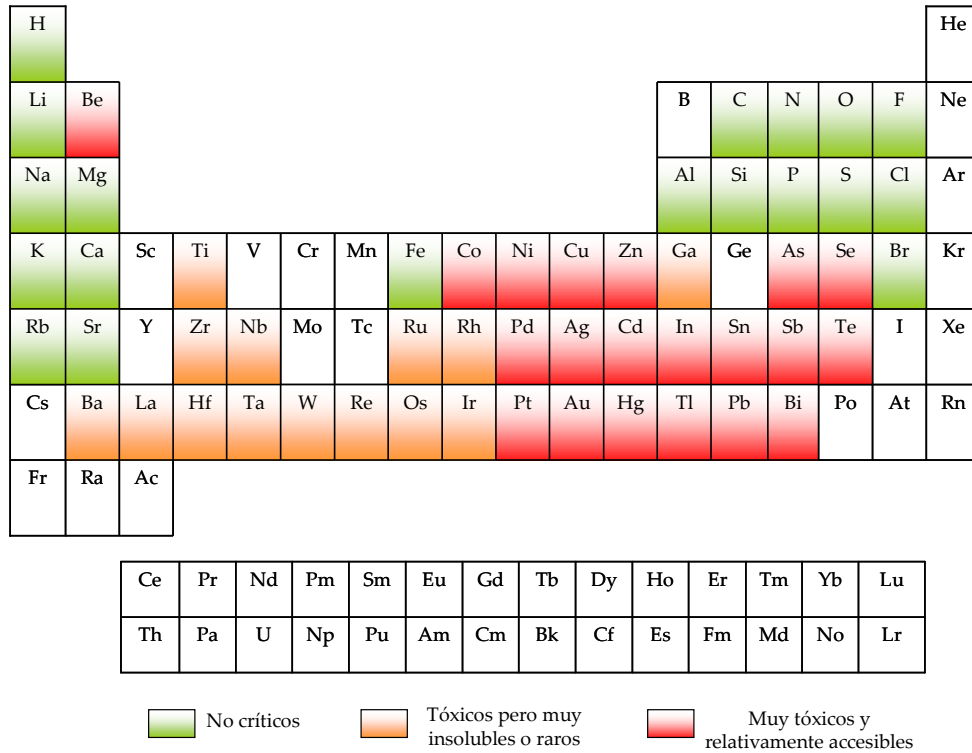


Figura I.6. Clasificación de los elementos según su biodisponibilidad y toxicidad

A continuación, se van a describir los perfiles ecotoxicológicos de los metales que han sido objeto de estudio en cada uno de los trabajos desarrollados en esta Tesis Doctoral.

I.5.1. Plomo

Se trata del metal tóxico más extendido, y es destacable por su presencia en casi todos los compartimentos ambientales, fundamentalmente como sulfuro y carbonato.

El envenenamiento subletal por plomo en vertebrados se caracteriza por la aparición de defectos neurológicos, disfunción del riñón y anemia. La anemia se produce como resultado de dos efectos básicos: disminución de la longevidad de los glóbulos rojos y la inhibición de numerosas enzimas que intervienen en la síntesis de la hemoglobina. También provoca la inhibición del metabolismo de los nucleótidos de pirimidina, que causa una acumulación de Pb en los glóbulos rojos. Igualmente se han descrito efectos en el metabolismo del triptófano, bloqueando una de sus vías metabólicas, y la inducción de la inhibición en la síntesis de proteínas, así como una reducción reversible del ADN y ARN en cultivos celulares. Además, se han descrito efectos sobre diversas enzimas, como la disminución de la actividad de la ATPasa a nivel de la membrana de los hematíes, riñón e hígado y se ha reseñado un marcado aumento de enzimas en el suero acompañado de lesiones hepáticas. Cabe destacar la gran afinidad del plomo por las mitocondrias, donde inhibe la fosforilación oxidativa [Ferrer, 2003].

En ecosistemas de agua dulce, se han señalado distintos efectos del plomo. Los peces presentan ennegrecimiento de las aletas y curvatura espinal, siendo ambos procesos normalmente reversibles, excepto en casos muy agudos. También se ha podido demostrar una disminución de la toxicidad del plomo al aumentar la dureza del agua. No obstante, el grupo más sensible de los invertebrados de agua dulce son los crustáceos, aunque no se ha podido demostrar el efecto de la dureza del agua. En ecosistemas marinos los datos son confusos debido a la relativa insolubilidad de los compuestos de plomo; esto ha dado lugar a la descripción de efectos adversos muy variados y en algunos casos opuestos, no obstante, los organismos marinos son más resistentes que los dulceacuícolas [Crompton, 1997].

En los mamíferos, la intoxicación depende del tipo de compuesto de Pb. El síntoma más usual de intoxicación aguda es el dolor de cólico gastrointestinal. Inicialmente, se produce un estado de anorexia, con síntomas de digestión imperfecta y estreñimiento, y después un ataque de dolor abdominal generalizado. Otros síntomas que se pueden presentar son diarrea, sabor metálico en la boca, náuseas, vómitos, agotamiento, insomnio, debilidad, etc. La intoxicación crónica se produce generalmente por la absorción de óxidos, carbonatos y otros compuestos solubles en agua a través del tracto digestivo.

La intoxicación por plomo orgánico se debe generalmente a la inhalación de tetraetilo de plomo, el cual es altamente volátil y liposoluble. Los efectos del plomo son más comunes sobre el sistema hematopoyético (formador de células sanguíneas), especialmente en personas expuestas laboralmente y se presentan principalmente como una intoxicación crónica. Uno de los síndromes más típicos de esta intoxicación es la anemia.

En el hombre, el riesgo principal ante una exposición al Pb se centra en su efecto sobre el sistema nervioso. El grupo de población más susceptible es el de los niños, especialmente los más pequeños. También, los fetos pueden sufrir lesiones severas por exposición al plomo. Los efectos sobre el sistema nervioso central se manifiestan como encefalopatías por exposición crónica o subcrónica, siendo los síntomas principales torpeza, irritabilidad, dolor de cabeza, temblor muscular, trastornos del movimiento y pérdida de memoria. Igualmente pueden darse trastornos sensoriales como el aumento de la sensación de dolor, calor, frío, etc.

En casos extremos puede llegarse al coma y sobrevenir la muerte. Además, se han asociado diversos trastornos renales con la intoxicación por plomo; las células del túbulo proximal del riñón son las más afectadas y se produce una alteración de la reabsorción de glucosa, aminoácidos y fosfato [Ferrer, 2003].

El plomo ha sido clasificado como carcinogénico, pero la evidencia está más contrastada en los animales que en el hombre. Una exposición severa a Pb causa esterilidad, abortos y un aumento de la mortalidad neonatal. Se han mostrado efectos gameto tóxicos tanto en machos como en hembras de animales, además de aberraciones cromosómicas y morfologías anormales de los espermatozoides en humanos debidas al efecto del plomo.

La U.E. estableció en 2001 (Reglamento (CE) N^o 466 / 2001 sobre el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios) que la absorción de plomo puede constituir un grave riesgo para la salud pública, pudiendo provocar un retraso del desarrollo mental e intelectual de los niños y causar hipertensión y enfermedades cardiovasculares en los adultos. En los últimos años, los contenidos de Pb de los productos alimenticios se redujeron sensiblemente, ya que aumentó la sensibilización ante este problema sanitario, y gracias a los esfuerzos realizados para reducir la emisión de plomo en su origen, así como los progresos en la garantía de calidad de los análisis químicos. Por otro

lado, se ha establecido que, aunque el contenido medio de plomo en los productos alimenticios no parece ser causa de alarma, debe proseguir la acción a largo plazo con el objetivo de continuar reduciendo los contenidos medios de Pb en éstos, procurando que los valores máximos sean lo más bajos posible.

Un hecho a destacar fue el adelanto por el Gobierno Español, consciente de la importancia de preservar el medio ambiente, de la fecha de prohibición de comercialización de gasolinas con plomo en todo el territorio nacional, fijada mediante el Real Decreto 403/2000, de 24 de marzo, para el día 1 de Enero de 2002, al día 1 de Agosto de 2001, por el Real Decreto 785/2001, de 6 de Julio de 2001.

Las gasolinas de sustitución pasaron a estar formadas por una mezcla de hidrocarburos de origen mineral y de compuestos oxigenados orgánicos, con las características adecuadas para ser utilizadas en los vehículos que anteriormente venían necesitando gasolina con plomo.

I.5.2. Cadmio

El cadmio es un metal muy persistente, una vez absorbido por el organismo, puede permanecer durante mucho tiempo en el mismo (con una vida media biológica de 10-30 años) aunque finalmente sea excretado [Berkowitz, 2008].

El modo de acción del cadmio se basa en la competición con otros metales, especialmente con el Zn, Fe, Cu y Ca. Así, desplaza al Zn como cofactor de ciertas reacciones enzimáticas, perturbando sus funciones normales; compite de forma activa con el Ca en los sistemas enzimáticos implicados en la contracción muscular, sobre todo a nivel de las fibras musculares lisas vasculares; ejerce una acción competitiva con el hierro y el cobre como cofactor del sistema enzimático de las monoaminooxidasas, disminuyendo su actividad. Además, presenta una gran afinidad por los grupos tiol, perturbando el metabolismo de los aminoácidos sulfurados y el funcionamiento de numerosas enzimas (ATPasas, deshidrogenasas, anhidrasa carbónica, etc.). El Cd inhibe la fosforilación oxidativa y fosforilación en las mitocondrias, desacoplando las reacciones redox; también, puede inhibir la ω -oxidación de los ácidos grasos, etc. Por otra parte, este metal aumenta el catabolismo de ciertas proteínas, como la seroalbúmina y disminuye el catabolismo de proteínas reabsorbidas por las células del túbulo proximal del

riñón, habiéndose comprobado la disminución de la síntesis de proteínas y anticuerpos *in vitro*. En consecuencia, el Cd produce alteraciones en diversos procesos metabólicos, perturbando la maquinaria energética celular.

En el hombre, la ingestión de alimentos o bebidas contaminadas con Cd puede causar trastornos agudos en el tracto gastrointestinal. Los síntomas incluyen náuseas, salivación, vómitos, dolores de abdomen y cabeza. En los casos más severos puede aparecer diarrea. Los síntomas que produce la inhalación de cadmio son dolor de cabeza, irritación del tracto respiratorio, escalofríos, debilidad general, insuficiencia respiratoria, fiebre, etc.; incluso puede conducir a un edema pulmonar en casos extremos [Nordberg, 2007]. La exposición crónica a cadmio da lugar a enfisema pulmonar y lesión renal con proteinuria. La gravedad relativa depende de la intensidad de exposición y de la susceptibilidad del individuo. También, pueden presentarse efectos sobre los sistemas cardiovascular y esquelético. Una característica siempre asociada a una intoxicación con cadmio es la lesión renal, ya que afecta a las funciones de reabsorción de los túbulos proximales. Generalmente, el primer signo es un aumento en la excreción de proteínas de bajo peso molecular. La excreción total de proteínas se puede elevar hasta 10 veces, persistiendo incluso aunque la exposición haya cesado. Asimismo, se pueden producir pérdidas de diversos nutrientes por excreción urinaria. Relacionados con estos efectos aparecen alteraciones en el sistema óseo, ya que el cadmio interfiere en el metabolismo del Ca, como se dijo anteriormente; estos trastornos se acompañan por un ablandamiento de los huesos, fracturas y deformaciones del esqueleto, incluso, puede haber una disminución de la estatura corporal.

El tabaco es una importante fuente de exposición para la población en general. Un cigarro generalmente contiene 1-2 μg Cd, lo que da lugar a la inhalación de aproximadamente 0,1-0,2 μg de metal [Nordberg, 2007].

La UE indicó en 2002 que el cadmio puede acumularse en el cuerpo humano y provocar afecciones renales, alteraciones óseas y fallos del aparato reproductor. Los compuestos de cadmio se clasifican como carcinógenos humanos asociándose la exposición a cadmio con cáncer de pulmón [Berkowitz, 2008]. Así, se ha recomendado que se realicen mayores esfuerzos para reducir la exposición a

este metal en la dieta, puesto que los productos alimenticios son la principal fuente de ingestión humana de cadmio [World Health Organization, 2008].

I.5.3. Cobre y Zinc

Estos dos elementos son oligoelementos esenciales de la Biosfera. En consecuencia, la mayoría de los datos demuestran que su deficiencia es mucho más crucial para los animales que las situaciones tóxicas. Sin embargo, hay suficientes evidencias para soportar la hipótesis de que la sobreexposición puede dar lugar a efectos negativos para la salud humana.

La esencialidad del cobre se manifiesta en que es un grupo prostético de numerosas enzimas y puede servir como cofactor para la activación enzimática (participa en la formación de más de 30 enzimas), sobre todo de las enzimas asociadas con el metabolismo oxidativo. Puede unirse también a proteínas, tales como la citocromoxidasa [Chang, 1996]. La deficiencia de Cu se asocia con la hemoglobina y elastina reducidas y la teratogénesis y actividad anormal de la aminoxidasa; y, afecta al metabolismo de los hidratos de carbono y a la biosíntesis de la catecolamina.

La sobrecarga de Cu afecta a una amplia variedad de funciones de las membranas, proteínas citosólicas y orgánulos subcelulares. Sin embargo, algunas plantas como *Viscaria alpina*, *Melandrium dioecum* y *Thlaspi calaminare* pueden tolerar y acumular el metal en cantidades apreciables (pueden vivir en las cercanías de minas de Cu). Algunos animales marinos filtradores, como las ostras, pueden llegar a tener una riqueza excepcional en los tejidos (hasta 60 mg/kg peso fresco). La ingestión por los humanos de cobre iónico en proporciones relativamente elevadas, da lugar a que se fije en los sitios fuertemente negativos de diversas enzimas, bloqueando la actividad de estos lugares. La sintomatología aguda típica del envenenamiento por este metal comprende desde perturbaciones gastrointestinales, dolor de cabeza, vértigo y gusto metálico en la boca hasta la muerte; también, se ha descrito la existencia de colapso respiratorio, anemia hemolítica, hemoglobinemia, fallos hepáticos y renales y perturbaciones gastrointestinales sangrantes. Los niños pueden ser particularmente sensibles a la

toxicidad aguda del Cu. Sus compuestos organometálicos no tienen siempre el mismo umbral de toxicidad que el acuocación. La toxicidad crónica se ha estudiado en individuos con el síndrome de Wilson, un error innato del metabolismo que se encuentra en 1 de cada 200000 individuos, que proviene de la acumulación de cobre en el hígado, cerebro, riñón y córnea.

No hay datos concluyentes sobre la carcinogénesis del Cu en el hombre, ya que la evidencia experimental obtenida con animales de laboratorio no es apropiada. Además, los estudios de mutagénesis que se han publicado son contradictorios por lo que tampoco se ha hecho una evaluación de la mutagenesidad de este elemento.

En cuanto al zinc, la esencialidad de este metal se muestra en su actuación en un gran número de funciones fisiológicas, derivadas de su presencia como cofactor en más 200 enzimas, esto provoca que sus niveles en los tejidos animales sean muy similares [Chang, 1996]. La deficiencia severa de Zn durante la gestación provoca un efecto teratogénico en diversas especies animales (ratas, ovejas, pollos,...), que se manifiesta en anomalías fetales y neonatales en forma tanto de malformaciones estructurales en cerebro, ojos, pulmón y corazón, así como funcionales en páncreas, pulmón y sistema inmunitario. El origen de estos efectos es atribuible a la alteración del metabolismo de los ácidos nucleicos, a daños oxidativos en proteínas y ADN y a un aumento en la peroxidación lipídica en tejidos fetales. Además, las carencias de este metal durante espacios de tiempo relativamente cortos, también puede dar lugar a efectos adversos como, por ejemplo, problemas de fertilidad durante períodos reproductivos. Asimismo, se han descrito lesiones bioquímicas y morfológicas como consecuencia de la deficiencia de este metal esencial para el funcionamiento de más de 150 factores de transcripción.

Se ha indicado que la toxicidad aguda del Zn, que se da a partir de altas entradas en el organismo, produce en los humanos dolor epigástrico, diarreas, náuseas y vómitos. En los animales superiores no se ha asociado con ningún modelo de desarrollo de anomalías. No obstante, cuando los linfocitos humanos se tratan con sales de Zn se observan aberraciones cromosómicas estructurales en los mismos.

Asimismo, se ha demostrado que incluso a niveles bajos de este elemento que pueden introducirse inadvertidamente desde medios contaminados en el cultivo de células embrionarias de pollo y de *Drosophila*, se induce una respuesta de tipo estresante en las células. También se ha demostrado que el Zn es clastogénico, *in vivo* e *in vitro*, tanto por inyección como por inhalación. La toxicidad crónica se ha estudiado en animales por medio del consumo a largo plazo de suplementos de Zn superiores a 150 mg/día, dando como resultado principal la deficiencia de Cu.

I.5.4. Bismuto

No es considerado un elemento esencial para animales ni para hombres. Aunque industrialmente es considerado como uno de los metales pesados menos tóxicos, puede provocar envenenamientos graves e incluso mortales por inyección de grandes dosis [Fowler, 2007].

El Bi se encuentra en los alimentos, en el aire, agua, suelo y rocas, además de en productos farmacéuticos y cosméticos. Para la población en general, la cantidad diaria consumida a través de los alimentos es aproximadamente de 5–20 µg, con una cantidad mucho más pequeña a través del aire y el agua [Fowler, 2007].

Los compuestos de bismuto se caracterizan por ser débilmente o moderadamente absorbidos después de su inhalación e ingestión. El bismuto absorbido es distribuido por tejidos y huesos, encontrándose las concentraciones más altas en riñones e hígado, siendo posteriormente excretado a través de la orina. El tiempo medio biológico para la retención en el cuerpo es de 5 días aproximadamente, pero inclusiones intranucleares pueden permanecer durante años en riñones de pacientes tratados con compuestos de bismuto.

El bismuto y sus sales pueden causar daños en el hígado, páncreas, glándula biliar y corazón. Exposiciones altas pueden provocar fallos renales asociados con degeneración y necrosis del epitelio de los túbulos proximales del riñón, cambios y necrosis en el hígado, disfunción reversible del sistema nervioso así como erupciones en la piel. Se ha declarado que la administración de bismuto

debe ser detenida cuando aparezca gingivitis, ya que de no hacerlo es probable que resulte en estomatitis ulcerosa. Se pueden desarrollar otros resultados tóxicos, tales como sensación indefinida de malestar corporal, presencia de albúmina u otra sustancia proteica en la orina, diarrea, reacciones cutáneas y a veces exodermatitis grave. Puede causar tetania por hipocalcemia, inmunodeficiencia circulatoria opuesta, y en raros casos hasta dolor de cabeza. Afortunadamente y a diferencia de otros metales pesados no es un carcinogénico reconocido.

Estudios recientes de la absorción gastrointestinal de bismuto administrado a ratones [Larsen, 2003] mostraron la rápida difusión del Bi hacia las células del tracto gastrointestinal y los riñones en pocas horas de exposición, observándose como con el paso del tiempo, el Bi se podía encontrar en otros órganos del cuerpo. Estudios de distribución subcelular mostraron como los lisosomas eran los principales lugares de deposición intracelular.

I.6. Legislación medioambiental

Una vez considerados los riesgos que presentan este tipo de contaminantes en el medio natural acuoso, no es de extrañar que los sitios contaminados por este tipo de metales pesados deban ser monitorizados regularmente. Actualmente en Andalucía, existe una completa legislación regulada en materia de aguas en el marco que establece la **Directiva Marco de Aguas 2000/60/CE**, así como órganos competentes como la **Agencia Andaluza del Agua**, encargados del control y seguimiento de su correcta aplicación.

I.6.1. Ley de Protección Ambiental y Consejo Andaluz del Agua

Antes de la elaboración de la actual Directiva, la **Ley 7/1994, de 18 de mayo, de Protección Ambiental**, marcó un antes y un después en el control de las actividades industriales en Andalucía provocando un gran cambio en la política medioambiental.

La gestación de la ley fue larga y penosa, pues de ser concebida inicialmente como una simple ley de regulación de impactos ambientales fue ampliando cada vez más su ámbito de intervención a otras materias

insuficientemente legisladas, relacionadas con la protección contra la contaminación de aguas, suelos y atmósfera. Así, pasó a convertirse prácticamente en lo que podría considerarse como una ley general de medio ambiente en el ámbito de Andalucía.

La calidad de las aguas litorales constituyó uno de los ámbitos regulados por esta ley (Decretos 14/1996 y 14/1997), la cual enfoca este problema desde dos puntos de vista diferentes pero estrechamente relacionados, en cuanto al objeto que regula (vertidos) y la finalidad que persigue (la protección del medio ambiente costero) [Alamitos-Ternero, 2001].

En 1995, se crea el **Consejo Andaluz del Agua** (Decreto 202/1995) órgano colegiado de carácter consultivo del Consejo de Gobierno de la Junta de Andalucía en materia de aguas, cuyas principales funciones son:

- Actuar como órgano de información, consulta y asesoramiento.
- Informar los anteproyectos de leyes y proyectos de decretos que en materia de aguas sean sometidos a la aprobación del Consejo de Gobierno.
- Formular iniciativas y proponer cuantas medidas se consideren oportunas para la mejor gestión, uso y aprovechamiento del recurso.

I.6.2. Directiva Marco de Aguas 2000/60/CE

Actualmente la normativa por la que se rige Andalucía en materia de aguas es la **Directiva Marco de Aguas 2000/60/CE** del Parlamento Europeo y del Consejo de la Unión Europea de 23 de Octubre de 2000, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. Los destinatarios de la presente Directiva son los Estados miembros, los cuales deben poner en vigor las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas necesarias para dar cumplimiento a todo lo dispuesto en la Directiva Marco de Aguas.

I.6.2.1. Objeto de la Directiva

La presente directiva tiene por objeto establecer un marco para la protección y mejora de la calidad del medio acuático de la Comunidad, incluyendo

las aguas superficiales continentales, las aguas de transición, las aguas costeras y las aguas subterráneas. El objetivo último de esta directiva es lograr la eliminación de todas las sustancias peligrosas prioritarias y contribuir a conseguir concentraciones en el medio marino cercanas a los valores básicos para las sustancias de origen natural.

Otros de los objetivos incluidos en esta ley son:

- Promover un uso sostenible del agua basado en la protección a largo plazo de los recursos hídricos disponibles.
- Garantizar la reducción progresiva de la contaminación del agua subterránea y evitar nuevas contaminaciones.
- Contribuir a paliar los efectos de las inundaciones y sequías.

De esta forma, se pretende contribuir a:

- Garantizar el suministro suficiente de agua superficial o subterránea en buen estado, tal como requiere un uso del agua sostenible, equilibrado y equitativo.
- Reducir de forma significativa la contaminación de las aguas subterráneas.
- Proteger las aguas territoriales y marinas.
- Conseguir concentraciones en el medio marino cercanas a los valores básicos por lo que se refiere a las sustancias de origen natural, y próximas a cero por lo que respecta a las sustancias sintéticas artificiales.

Probablemente, se trata de la ley internacional de mayor relevancia elaborada en el campo de aguas. Se puede decir que el objetivo general de esta Directiva Marco de Aguas es alcanzar un buen estado de la calidad de las aguas. Para ello, se hace necesario el desarrollo y validación de herramientas analíticas de bajo coste y metodologías para el análisis de rutina de aguas superficiales para conseguir datos comparables, consistentes y fiables [Allan, 2006].

I.6.2.2. Otros aspectos de interés considerados en la Directiva

La Directiva Marco considera 33 sustancias químicas como prioritarias, entre las cuales se encuentran el cadmio y sus compuestos, el mercurio y sus compuestos, el plomo y sus compuestos, y el níquel y sus compuestos.

Bajo esta ley, se pueden encontrar las definiciones de los diferentes tipos de aguas:

- río: una masa de agua continental que fluye en su mayor parte sobre la superficie del suelo, pero que puede fluir bajo tierra en parte de su curso;
- lago: una masa de agua continental superficial quieta;
- aguas de transición: masas de agua superficial próximas a la desembocadura de los ríos que son parcialmente salinas como consecuencia de su proximidad a las aguas costeras, pero que reciben una notable influencia de flujos de agua dulce;
- etc.

Así como la definición de contaminación y sustancias prioritarias, peligrosas, contaminante, y otros términos relacionados dentro de este campo. Además, dentro de esta directiva, se puede encontrar las estrategias para combatir la contaminación de las aguas, las diferentes sanciones por incumplimiento de la normativa, etc.

En definitiva, el gran reto que persigue la Directiva Marco de Aguas es alcanzar el buen estado de todas las masas de aguas para el año 2015, lo que incluye los estados ecológico, químico y, para el caso de las subterráneas, también cuantitativo. En la tabla I.6 se muestran las obligaciones establecidas en la Directiva Marco de Aguas para los próximos años.

I.6.3. Agencia Andaluza del Agua

Para garantizar el cumplimiento de la normativa a nivel de Andalucía, en enero de 2005 se constituyó la **Agencia Andaluza del Agua**, organismo autónomo dependiente de la Consejería de Medio Ambiente, destinada a coordinar y ejercer las competencias de la Junta de Andalucía en materia de aguas. Años más tarde, en enero de 2009, se aprobaron los estatutos de la Agencia Andaluza del Agua comenzando a abordar en ese momento sus competencias.

I.6.3.1. Funciones de la Agencia Andaluza del Agua

En el Decreto 2/2009, de 7 de enero (BOJA num. 6 de 12 de Enero de 2009), se recogen las funciones de la Agencia Andaluza del Agua. Le corresponde a la

Agencia el ejercicio de las competencias de la Comunidad Autónoma de Andalucía en materia de aguas y obras hidráulicas, y en particular:

-La elaboración, seguimiento y revisión de la planificación hidrológica, así como de los proyectos derivados de la misma.

-La administración, protección y control de los aprovechamientos hidráulicos y del dominio público hidráulico en general, incluyendo el otorgamiento de autorizaciones y concesiones.

-La planificación, programación, construcción, y en su caso, la explotación y mantenimiento de las obras hidráulicas de competencia de la Comunidad Autónoma de Andalucía.

-La distribución de agua potable, alcantarillado y saneamiento de las aguas residuales urbanas y prevención de inundaciones.

-Los trabajos de elaboración y desarrollo de la información sobre la materia hidráulica, así como la difusión y divulgación de la misma.

-La colaboración en la investigación, desarrollo tecnológico e innovación en materia de aguas, con las Administraciones y entidades públicas y privadas.

-etc.

*Tabla I.6. Obligaciones de la Directiva Marco de Aguas 2000/60/CE
[Castroviejo-Bolíbar, 2008]*

Año	Obligación
2000	Entrada en vigor
2003	- Transposición al derecho interno - Identificación de las demarcaciones hidrográficas - Designación de las autoridades de cuenca
2004	Análisis de las cuencas: presiones, impactos y análisis económicos
2006	- Red de seguimiento y control - Inicio de la participación pública
2008	Presentación al público de los proyectos de planes de cuenca
2009	Finalización de los planes de cuenca, incluidos los programas de medidas
2010	Aplicación de las políticas de precios
2012	Plena aplicación de los programas de medidas
2015	Logro de los objetivos ambientales, fin del primer ciclo de gestión
2021	Fin del segundo ciclo de gestión
2027	Tercer ciclo de gestión y final de las excepciones

I.6.3.2. Estructura de la Agencia Andaluza del Agua

A continuación se muestra el organigrama de los distintos órganos de gobierno y gestión en los que se estructura la Agencia:

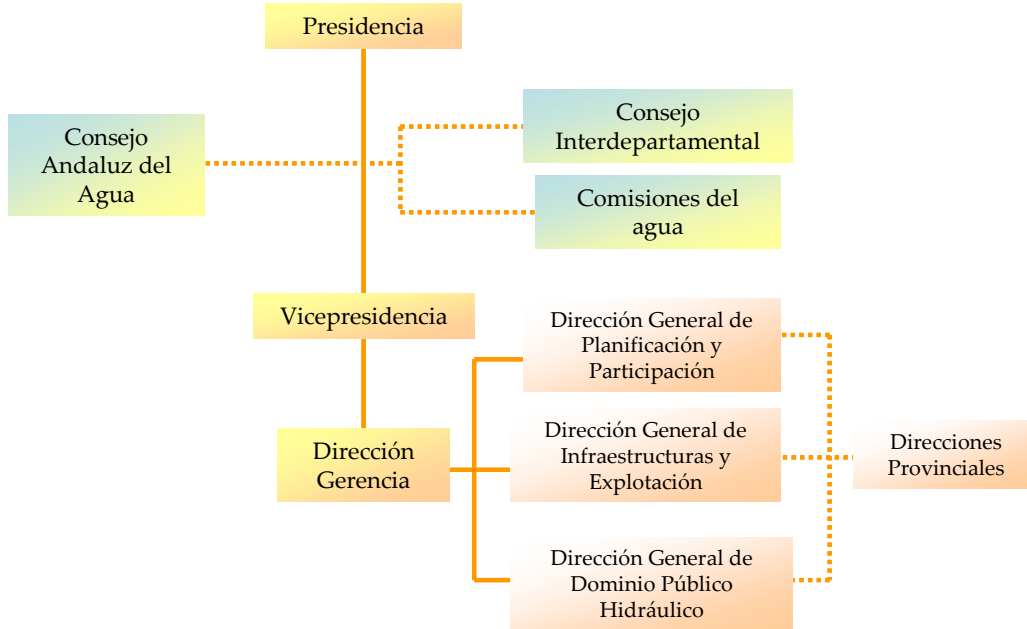


Figura I.7. Organigrama de la Agencia Andaluza del Agua

El **Consejo Andaluz del Agua** creado en 1995, máximo órgano de información, consulta y asesoramiento en todos los aspectos relacionados con el agua, es uno de los órganos de participación que constituyen la **Agencia Andaluza del Agua**. En su reunión celebrada el pasado 5 de diciembre de 2008, aprobó las **Bases del Acuerdo Andaluz por el Agua**.

Este acuerdo considera al agua como un patrimonio común fundamental para la vida, y a su vez como un recurso finito y vulnerable al que hay que cuidar para poder garantizar el abastecimiento de la población. Esta nueva ética del agua tiene en cuenta la fragilidad del recurso y sabe hacer compatible la garantía de las demandas de todos los usos con el cuidado del medio ambiente, pues la calidad de vida de los andaluces depende en gran parte de la buena gestión del agua.

El presente acuerdo tendrá vigencia hasta 2015, año en el que se llevará a cabo una valoración del cumplimiento de sus objetivos, con un seguimiento anual y una evaluación intermedia en 2012.

A estas disposiciones legales vigentes en la Comunidad Autónoma de Andalucía hay que sumarle otras correspondientes al Estado Español, como la convención de Barcelona que protege el mar Mediterráneo, así como otras leyes de la Unión Europea, tales como OSPAR, para la protección del noreste Atlántico, la convención de protección del río Danubio o la Comisión Internacional para la protección del Rin, demostrando así la enorme preocupación actual que existe por la fragilidad de este recurso, así como el interés por controlar y evitar su posible contaminación.

Centrándonos en el tipo de contaminantes de esta Tesis, se puede decir que los niveles máximos permitidos para cada metal y las leyes derivadas varían ampliamente entre países. En la tabla I.7 aparecen recogidos los niveles de fondo y concentraciones naturales de metales tanto en agua de mar como en aguas continentales [Förstner, 1983; Azcue, 1993]. Se recogen además, datos definidos por la Oficina Norteamericana para la Administración Nacional del Océano y la Atmósfera (NOAA) en base a los criterios de la Agencia de Protección Medioambiental norteamericana (EPA), para establecer los valores de concentraciones a partir de los cuales es posible que las sustancias contaminantes puedan dar lugar a efectos perjudiciales sobre la vida acuática [US EPA, 2002]. Los parámetros descritos son: el Criterio de Máxima Concentración (CMC) definido como la estimación de la máxima concentración de una sustancia en el agua a la cual puede ser expuesta una comunidad acuática “puntualmente” sin que se produzca ningún efecto no recomendable. Y, el Criterio de Concentración Continua (CCC) definido como la estimación de la máxima concentración de una sustancia en el agua a la cual puede ser expuesta una comunidad acuática “indefinidamente” sin que se produzca ningún efecto no recomendable. Ambos parámetros se establecen respectivamente para prevenir la toxicidad aguda y crónica en los organismos acuáticos [Vicente-Martorell, 2009]. Se muestran también las demandas establecidas para Cu, Zn, Cd y Pb, por la Organización Mundial de la Salud (WHO) en las aguas de consumo [WHO, 2008].

Tabla I.7. Valores de fondo, naturales y valores guía de concentración de metales en aguas descritos en la bibliografía

Referencia			Cu ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Zn ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Cd ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Pb ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Valores de fondo	[Förstner, 1983]	Agua de mar	0,04-0,1	0,01	0,01	0,005-0,015
		Agua continental	1,8	10	0,07	0,2
Concentraciones naturales	[Azcue, 1993]	Agua de mar	0,01	<0,6	<0,025	<0,02
		Agua continental	3	10	0,1	3
Criterio NOAA-EPA de calidad de aguas: CMC ^a CCC ^b	[US EPA, 2002]	Agua de mar	4,8 3,1	90 81	40 8,8	210 8,1
		Agua dulce	13	120	2	65
			9	120	0,25	2,5
Niveles máximos permitidos por WHO	[WHO, 2008]	Agua de bebida	2000	3000	3	10

a: CMC: Criterio de máxima concentración

b: CCC: Criterio de concentración continua

I.7. Análisis de metales pesados en muestras acuosas

Los metales pesados se suelen encontrar en las aguas medioambientales a niveles muy bajos y las matrices de las muestras acuosas suelen ser complejas. Estas concentraciones tan bajas eran indetectables con los primeros métodos analíticos instrumentales desarrollados en el siglo XIX siendo la complejidad de las muestras otro inconveniente.

Existen muchas áreas de la ciencia y la industria donde la presencia de estos elementos incluso a niveles muy bajos puede tener un impacto significativo en la salud humana, el medio ambiente y la industria [Brown, 2005]. Es por ello por lo que la legislación nacional, Europea e Internacional, están reduciendo cada vez más, la concentración permitida de este tipo de contaminantes en el medio ambiente. Esto explica el gran interés actual por desarrollar nuevas técnicas

analíticas para llevar a cabo este tipo de medidas en las matrices acuáticas, con el fin de evaluarlas y detectar los valores que sobrepasen los límites legislativos.

Dependiendo de las necesidades analíticas, en otras ocasiones se puede estar más interesado en aspectos tales como sencillez de la instrumentación, mínimo mantenimiento, facilidad de uso, rapidez de los análisis, respuesta inmediata, simplicidad y/o bajo coste. Además, los laboratorios dedicados a analizar el estado de la contaminación medioambiental a veces eliminan de manera incontrolada, reactivos, disolventes, así como residuos químicos, que irónicamente pueden ser origen de contaminación. Los métodos tradicionales de análisis requieren de considerables cantidades de compuestos químicos y la preparación de las muestras implica frecuentemente la formación de grandes cantidades de contaminantes, ya sean vapores o residuos líquidos de reactivos y disolventes. Por lo que, los químicos analíticos además de buscar las características mencionadas, también desean aplicar reglas de química verde en el laboratorio [Namiesnik, 2010].

Es por ello, por lo que esta Tesis se ha orientado claramente en la búsqueda de nuevas metodologías analíticas dirigidas por un lado a la detección de metales pesados a niveles extremadamente pequeños, empleando técnicas de elevada sensibilidad, y por otro lado, a la determinación de metales mediante el empleo de técnicas que cumplan requisitos tales como simplicidad, bajo coste, fáciles de usar, y que permitan realizar análisis sencillos y rápidos. Así como dispositivos de pequeño tamaño, portátiles, respetuosos con el medio ambiente y con la capacidad de análisis *in-situ*.

I.7.1. Buscando técnicas de elevada sensibilidad

Las técnicas analíticas para el análisis de metales traza han avanzado muchísimo en los últimos años, en respuesta a la creciente necesidad por realizar medidas precisas de cantidades extremadamente bajas de estos elementos en muestras acuáticas. Las técnicas más comúnmente empleadas para el análisis de metales a nivel de trazas son: las electroquímicas como la potenciometría y la voltamperometría; técnicas espectroscópicas como la espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito (GFAAS) y la espectrometría de masas con plasma de

acoplamiento inductivo (ICP-MS); métodos por Rayos-X; y métodos nucleares [Brown, 2005; Buffle, 2005].

Las técnicas de espectroscopía atómica son particularmente sensibles, especialmente el ICP-MS que proporciona los límites de detección más bajos actualmente disponibles en Química Analítica de rutina. Pero estas técnicas, si no se acoplan con procesos cromatográficos, no hay especiación, por lo que sólo pueden ser usadas para medir el contenido total de un elemento dentro de una muestra, no aportando así suficiente información sobre el impacto ecotoxicológico. Por otro lado, la exactitud de estas técnicas puede verse afectada por la matriz de la muestra.

A su vez, las técnicas de rayos-X y nucleares proporcionan bajos límites de detección, no le afecta el tipo de matriz y son útiles para estudios comparativos de métodos, ya que están basados en principios totalmente diferentes al de otras técnicas comunes. Sin embargo, son muy caros, presentan una velocidad baja y además son difíciles de calibrar [Brown, 2005].

Por otro lado, los métodos electroquímicos son muy útiles, ya que pueden medir tanto iones libres en disolución (potenciometría) como iones libres e iones enlazados en complejos lábiles (voltamperometría). También pueden proporcionar análisis del estado de oxidación de un rango limitado de elementos.

En la tabla I.8 se muestra un resumen de las características generales de las técnicas comentadas.

Como se puede observar, en un análisis más exhaustivo de las mismas, las técnicas nucleares pueden medir todo tipo de analitos aportando además límites de detección extremadamente bajos, pero el alto coste de este tipo de técnicas hace que no pueda disponerse de las mismas en cualquier laboratorio.

Por otro lado, la mayoría de los métodos analíticos usuales para la evaluación de metales pesados en muestras de aguas naturales están basados en el empleo de técnicas de Espectroscopia Atómica. No obstante, como ya se ha comentado, determinan concentraciones totales, a menos que se acople con algún tipo de método cromatográfico, y no distinguen entre fracciones químicas; además presentan interferencias de matriz, sobre todo en el caso del agua de mar, por lo que requieren de etapas previas de preconcentración y/o separación que demoran los análisis y pueden incrementar el riesgo de contaminación de la muestra por excesiva manipulación. Ésta es la gran barrera que presentan para su aplicación en las medidas de rutina de un gran número de muestras.

Tabla I.8. Resumen de las propiedades generales de las técnicas analíticas empleadas para el análisis de trazas [Brown, 2005]

Técnica	Potenciometría	Voltamperometría	Espectroscopía atómica	Técnicas de rayos-X	Técnicas nucleares	
Analitos medidos directamente	Elementos libres	✓	✓	x	x	✓
	Elementos en complejos lábiles	x	✓	x	x	✓
	Concentración total	x	x	✓	✓	✓
Posibles interferencias/dificultades	Los iones compiten en la muestra	Solapamiento de picos / Competición de iones	Efectos de matriz /Interferencias isobáricas	Comportamiento no ideal / Dificultad de calibración	Comportamiento no ideal	
Límite de detección	$10^{-8} - 10^{-11}$	$10^{-10} - 10^{-12}$	$10^{-10} - 10^{-13}$	$10^{-10} - 10^{-12}$	$10^{-12} - 10^{-15}$	
Velocidad	Moderado	Moderado	Alto	Bajo	Bajo	
Coste	Bajo	De bajo a moderado	Alto	Alto	Muy alto	
✓	Puede ser medido usando esta técnica		x	no puede ser medido usando esta técnica		

En contraposición, los métodos electroanalíticos tienen ciertas ventajas de carácter general con respecto a los métodos espectroscópicos. En primer lugar, las medidas electroquímicas son a menudo específicas para un estado de oxidación particular de un elemento. Por ejemplo, los métodos electroquímicos hacen posible la determinación de la concentración de cada una de las especies en una mezcla de cerio (III) y cerio (IV), mientras que la mayor parte del resto de métodos analíticos sólo pueden proporcionar la concentración total de cerio. Algunos métodos electroquímicos hacen posible la determinación de especies metálicas así como la concentración de iones metálicos libres, los cuales son de fundamental interés para la determinación de la calidad de un agua, ya que la toxicidad se debe principalmente a la permeabilidad del ion metálico libre a través de las membranas biológicas [Pesavento, 2009]. Por otro lado, otra ventaja importante de los métodos electroquímicos es que la instrumentación es relativamente económica, siendo asequible para cualquier laboratorio de investigación.

Dentro de las técnicas electroanalíticas, los dos principales métodos empleados para la detección de trazas son los electrodos selectivos de iones y la voltamperometría de redisolución empleando técnicas polarográficas. Los electrodos selectivos de iones tienen una alta selectividad pero son muy poco sensibles e imprecisos para el análisis de trazas [Pérez-Bendito, 1999]. Por otro lado, la voltamperometría de redisolución es una de las herramientas más potentes que ofrece la Química Electroanalítica para el análisis de trazas. La alta sensibilidad, los bajos límites de detección y el bajo coste de esta técnica hacen que su aplicación a problemas analíticos sea muy extensa: muestras ambientales, aguas, muestras clínicas, drogas, alimentos, se aplica también en agricultura, explosivos, industrias galvánicas, metalurgia, formulaciones farmacéuticas,...

En análisis medioambiental de ecosistemas acuáticos normalmente se realiza la toma de muestras de agua en embarcaciones y éstas son llevadas al laboratorio para su análisis. Sin embargo, dadas las bajas concentraciones metálicas presentes en las aguas, se pueden dar procesos de contaminación de las muestras o modificaciones en la especiación debidas a alteraciones en los equilibrios químicos después de la toma de muestra. Esto ha llevado a que en años recientes se haya producido un movimiento hacia el análisis de los metales en el propio barco, es decir, *in-situ*. Con ello, no sólo se reduce el riesgo de

contaminación de la muestra sino también se incrementa la cantidad de datos medioambientales, por la facilidad de realizar los análisis en el mismo barco, y además se consiguen mejoras en los análisis de las especies químicas. La instrumentación analítica debe ser de pequeño tamaño y bajo peso, es decir, fácil de transportar. Esto excluye a técnicas como la espectroscopía atómica con horno de grafito (GFAAS) e ICP-MS, debido a que la instrumentación es demasiado voluminosa. Además, se trata de técnicas bastante sensibles que pueden verse afectadas por las constantes vibraciones del motor del barco. En contraposición, las técnicas electroquímicas que a menudo hacen uso de instrumentación portátil con costes mucho más bajos que los de GFAAS e ICP-MS, hacen que estas técnicas sean más adecuadas para el análisis de metales pesados. Más concretamente, las técnicas voltamperométricas de redisolución presentan la ventaja de permitir la determinación directa de metales en agua de mar, sin una etapa externa previa de preconcentración [Varney, 2000].

I.7.2. Buscando la simplicidad, rapidez y/o la miniaturización

En el campo del medio ambiente, especialmente en los metales, el disponer de técnicas sencillas, rápidas, de bajo coste y que proporcionen una respuesta inmediata, ha despertado un gran interés en los últimos años. En particular, el desarrollo de técnicas analíticas alternativas de bajo coste se hace necesario en el caso de países en desarrollo que normalmente no disponen de los suficientes medios económicos para trabajar con equipos de análisis avanzados [Mahendra, 2003].

En 1991 se introdujo el concepto de Química Verde presentado a través de 12 Principios por Anastas y colaboradores [Anastas, 2000] cuyo principal objetivo es generar una menor cantidad de residuos tóxicos y que su uso sea más seguro y más respetuoso con el medio ambiente [Curylo, 2007]. Esto se puede conseguir desarrollando nuevas metodologías analíticas o bien modificando las ya existentes. La estrategia general requiere no sólo cambiar o modificar reactivos y disolventes, o reducir las cantidades de sustancias químicas empleadas, sino también, la miniaturización e incluso la eliminación del muestreo midiendo los analitos de interés *in-situ*, a tiempo real y en línea.

Técnicas como FAAS, GFAAS, ICP-MS, o voltamperometría de redisolución, no son fáciles de adaptar al análisis en línea. Así pues, existe un creciente interés en diferentes laboratorios por desarrollar sensores químicos para la determinación de metales pesados. Dentro de los sensores químicos, los basados en señales ópticas, presentan más ventajas debido a su posibilidad de miniaturización y bajo coste.

Por ello, el campo de los sensores ópticos ha abierto muchas puertas en el análisis medioambiental, constituyendo una herramienta muy útil para el estudio y control de la contaminación, ya que permiten realizar análisis rápidos, empleando instrumentación sencilla, fáciles de usar y de bajo coste, con una elevada sensibilidad y simplicidad.

Por otro lado, el empleo de fibras ópticas en los sensores ópticos, les aporta otras características adicionales como la miniaturización, proporcionando así dispositivos portátiles de pequeño tamaño, que requieren de cantidades muy bajas de reactivos químicos y disolventes, siendo de esa forma respetuosos con el medio ambiente. Además el empleo de fibra óptica permite realizar análisis rápidos, *in-situ* y a tiempo real de un determinado analito, basados en métodos espectroscópicos como la espectrofotometría directa, colorimetría, y fotoluminiscencia. Las numerosas aplicaciones en la industria, medicina y medio ambiente, han provocado un aumento de las investigaciones sobre estos sensores químicos de fibra óptica, conocidos como optodos [Varney, 2000].

Por todo lo comentado, y dentro del interés general surgido en las últimas décadas por conseguir limitar el progresivo deterioro medioambiental, se pretende con esta Tesis Doctoral contribuir de alguna manera a ese esfuerzo por evaluar y controlar el grado de contaminación en el que se encuentran los sistemas acuáticos, así como la determinación de las causas que lo provocan, permitiendo contemplar medidas de prevención para minimizar su deterioro. Para ello, se estudian y se ponen a punto nuevas metodologías empleando dos líneas diferentes de investigación, por un lado, una técnica de elevada sensibilidad como es la voltamperometría de redisolución adsortiva, y por otro, los sensores químicos ópticos, dispositivos sencillos, portátiles, fáciles de usar y de bajo coste, para el análisis de uno de los tipos de contaminantes más peligrosos que existen, los **metales pesados**.

Referencias

- Ahuja, S., **2008**. Arsenic Contamination of Groundwater: Mechanism, Analysis, and Remediation. New Jersey. John Wiley & Sons, Inc.
- Alam, M.G.M., Snow, E.T., Tanaka, A., **2003**. Arsenic and heavy metal contamination of vegetables grown in Samta village, Bangladesh. *The Science of the Total Environment* 308, 83-96.
- Alamitos-Ternero, F.J., **2001**. El medio ambiente en Andalucía en el umbral del siglo XXI. Consejería de Medio Ambiente.
- Allan I.J., Vrana B., Greenwood R., Mills G.A., Roig B., Gonzalez C., **2006**. A “toolbox” for biological and chemical monitoring requirements for the European Union's Water Framework Directive. *Talanta* 69, 302–322.
- Anastas, P.T., Warner, J.C., **2000**. Green Chemistry: Theory and Practice. New York. Oxford University Press.
- Azcue, J.M., **1993**. Metales en Sistemas Biológicos: Metales en el medio Ambiente. Barcelona. Ed. PPU.
- Berkowitz, B., Dror, I., Yaron, B., **2008**. Contaminant Geochemistry. Interactions and transport in the subsurface environment. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Brown, R.J.C., Milton, M.J.T., **2005**. Analytical techniques for trace element analysis: an overview. *Trends in Analytical Chemistry* 24, 266-274.
- Bruland, K.W., **1983**. Trace elements in seawater, en *Chemical Oceanography*, Ed. J.P. Riley, R. Chester (London) Academic Press.
- Bryan, G.W., **1976**. Heavy metal contamination in the sea, en *Marine Pollution*, Ed. R. Johnston London (England) Academic Press.
- Buffle, J., Tercier-Waeber, M.L., **2005**. Voltammetric environmental trace- metal analysis and speciation: from laboratory to in situ measurements. *Trends in Analytical Chemistry* 24, 172-191.
- Campbell, P.G.C., Errécalde, O., Fortín, C., Hiriart-Baer, V.P., Vigneult, B., **2002**. Metal bioavailability to phytoplankton. Aplicability of the biotic ligand model. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 133, 189 – 206.
- Castroviejo-Bolíbar, M., Consejero de Medio Ambiente de la REPER (Representación Permanente de España ante la Unión Europea), **2008**. La aplicación de la Directiva Marco de Aguas en la Unión Europea. *Revista Ambienta*. p. 63.
- Chang, L.W, **1996**. Toxicology of metals. CRC. Florida, USA. Boca Ratón.
- Clark, R.B., **2001**. Marine Pollution. 5ª Edition. New York. Oxford University Press Inc.
- Crompton, T.R., **1997**. Toxicants in aqueous ecosystems. Chichester (England). John Wiley & Sons.

- Curylo, J., Wardencki, W., Namiesnik, J., **2007**. Green aspects of sample preparation- a need for solvent reduction. *Polish Journal of Environmental Studies* 16, 5-16.
- Djanarto, **1992**. Monitoring Exposure B3 Angkatan II, Bapedal & Ppsdal en Roosmini, D., Rachmatiah, I., Suharyanto; Soedomo, A., Hadisantosa, F., **2006**. Biomarker as an Indicator of River Water Quality Degradation. *PROC. ITB Engineering Science* 38 B, 114-122.
- Drake, P., Baldó, F., Cuesta, J.A., García-González, D., Silva-García, A., Arias, A.M., Rodríguez, A., Sobrino, I., Fernández-Delgado, C. **1999**. Initial effects of the toxic waste spill (Aznalcóllar mine accident) on the aquatic macrofauna of the Guadalquivir Estuary. *The Science of the Total Environment* 242 (1-3) 271-280.
- Eustace, I.J., **1974**. Zinc, cadmium, copper and manganese in species of finfish and shellfish caught in the Derwent estuary, Tasmania. *Australian Journal of Marine & Freshwater Research* 25, 209-220.
- Ferrer, A., **2003**. Intoxicación por metales.. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* 26, 141-153.
- Förstner, U., Wittmann, G.T.W., **1979**. Metal pollution in the aquatic environment. New York. Springer-Verlag, Berlín Heidelberg.
- Förstner, U., Wittmann, G.T.W., **1983**. Metal Pollution in the Aquatic Environment, Second revised Edition. Alemania. Springer- Verlag, Berlín Heidelberg.
- Fowler, S.W., **1990**. Critical review of selected heavy metal and chlorinated hydrocarbon concentrations in the marine environment. *Marine Environmental Research* 29, 1-64.
- Fowler, B.A., Sexton, M.J., **2007**. Bismuth, en *Handbook of the Toxicology of Metals*. Third Edition. Elsevier. p. 433. Academic Press.
- Greenaway, A.M., Rankine Jones, A.I., **1992**. Elemental concentrations in coastal sediments from Hellshire, Jamaica. *Marine Pollution Bulletin* 24, 390-397.
- Kennish, M.J., **1996**. *Practical Handbook of Estuarine and Marine Pollution*. New York. Ed. CRC Press.
- Kudo, A., Fujikawa, Y., Miyahara, S., Zheng, J., Takigami, H., Sugahara, M., Muramatsu, T., **1998**. Lessons from Minamata mercury pollution, Japan-after a continuous 22 years of observation. *Water Science and Technology* 38 (7) 187-193.
- Larsen, A., Martiny, N., Stoltenberg, M., **2003**. *Pharmacology and Toxicology* 93(2) 82-90.
- Libes, S.M., **1992**. *An introduction to Marine Biogeochemistry*. John Wiley & Sons, Inc.
- Mahendra, N., Gangaiya, P., Sotheeswaran, S., Narayanaswamy, R., **2003**. Investigation of a fibre optic copper sensor based on immobilised α -benzoinoxime (cupron). *Sensors and Actuators B* 90, 118-123.
- Meharg, A.A., Osborn, D., Pain, D.J., Sánchez, A., Naveso, M.A., **1999**. Contamination of Doñana food-chains after the Aznalcóllar mine disaster. *Environmental Pollution* 105(3) 387-390.
- Namiesnik, J., Szefer, P., **2010**. *Analytical Measurements in Aquatic Environments*. Taylor & Francis Group.

Introducción general

Nogawa, K., Yamada, Y., Honda, R., Ishizaki, M., Tsuritani, I., Kawano, S., Kato, T., **1983**. The relationship between itai-itai disease among inhabitants of the Jinzu river basin and cadmium in rice. *Toxicology Letters* 17 (3-4), 263-266.

Nordberg, G.F., Nogawa, K., Nordberg, M., Friberg, L.T., **2007**. Cadmium, en *Handbook of the Toxicology of Metals*. Third Edition. Elsevier. p. 445. Academic Press.

Orozco-Barrenetxea, C., Pérez-Serrano, A., González-Delgado, M.N., Rodríguez-Vidal, F.J., Alfayate-Blanco, J.M., **2008**. Contaminación ambiental, Una visión desde la Química, 1ª Edición, 5ª reimpresión. International Thomson Editores, Paraninfo.

Ortega-Domínguez, R., Rodríguez-Muñoz, I., **2000**. Manual de Gestión del Medio Ambiente, Fundación MAPFRE. Editorial MAPFRE.

Öztürk, M., Bizsel, N., Steinnes, E., **2003**. Iron speciation in eutrophic and oligotrophic Mediterranean coastal waters; impact of phytoplankton and protozoan blooms on iron distribution. *Marine Chemistry* 81, 19-36.

Pastor, A., Hernández, F., Peris, M.A., Beltrán, J., Sancho, J.V., Castillo, M.T., **1994**. Levels of heavy metals in some marine organisms from the western Mediterranean area (Spain). *Marine Pollution Bulletin* 28, 50-53.

Pérez-Bendito, D., Rubio, S., **1999**. *Comprehensive Analytical Chemistry*. Volume XXXII Environmental Analytical Chemistry. Edited by S.G. Weber.

Pesavento, M., Alberti, G., Biesuz, R., **2009**. Analytical methods for determination of free metal ion concentration, labile species fraction and metal complexation capacity of environmental waters: A review. *Analytica Chimica Acta* 631, 129-141.

Smith, A.H., Lingas, E.O., Rahman, M., **2000**. Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh: a public health emergency. *Bulletin of the World Health Organization* 78 (9) 1093-1103.

US EPA (United States Environmental Protection Agency), **2002**. National Recommended Water Quality Criteria. EPA-822-R-02-047, Office of Science and Technology.

Varney, M.S., **2000**. *Chemical Sensors in Oceanography*. Ocean Science and Technology. Volume 1. Amsterdam. Gordon and Breach Science Publishers.

Vasconcelos, M.T.S.D., Leal, M.F.C., **2001**. Antagonist interactions of Pb and Cd on Cu uptake, growth inhibition and chelator release in the marine algae *Emiliana huxleyi*. *Marine Chemistry* 75, 123-139.

Vicente-Martorell, J.J., Galindo-Riaño, M.D., García-Vargas, M., Granado-Castro, M.D., **2009**. Bioavailability of heavy metals monitoring water, sediments and fish species from a polluted estuary. *Journal of Hazardous Materials* 162, 823-836.

World Health Organization, Geneva **2008**. Guidelines for drinking-water quality [http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/fulltext.pdf]: incorporating 1st and 2nd addenda, Vol.1, Recommendations. – 3rd ed.

Parte A

*Desarrollo de nuevos sistemas
de análisis empleando
voltamperometría de
redisolución adsorbtiva*

Capítulo 1:

Voltamperometría de redisolución:

Capítulo 1:

Voltamperometría de Redisolución

1.1. Introducción

La cuantificación de componentes traza y ultratrazas en muestras complejas de origen medioambiental, clínico e industrial representa una importante tarea de la Química Analítica moderna. Para el análisis de tales muestras, a menudo se hace necesario emplear algún tipo de preconcentración previa a la cuantificación ya que la concentración del analito se puede encontrar por debajo del límite de detección de la técnica instrumental empleada. Además, el paso de preconcentración puede servir para separar el analito de la matriz compleja, y por lo tanto, mejorar la selectividad y reproducibilidad de la medida. La deposición electrolítica representa un camino efectivo para conseguir el enriquecimiento y aislamiento de componentes traza [Sioda, 1986]. Por un lado, tiene la ventaja de que se requiere poca o ninguna cantidad de reactivo, por lo que se minimizan los riesgos de contaminación, y por otro lado, la preconcentración electroquímica puede ser acoplada a un amplio número de técnicas instrumentales.

En el presente capítulo se ofrece una revisión general resumida de los aspectos más importantes de la voltamperometría, exponiendo sus fundamentos teóricos, tipos, instrumentación analítica y aplicaciones más destacadas en el campo del análisis de metales pesados.

Se ha destacado especialmente la modalidad de Voltamperometría de Redisolución Catódica Adsorbtiva (AdCSV) la cual muestra una excelente sensibilidad para el análisis de metales a nivel de trazas en aguas naturales. Entre sus ventajas cabe destacar la rapidez de los análisis, buena sensibilidad, bajo coste instrumental, capacidad para el análisis multielemental y buen comportamiento en

el análisis de muestras con matriz salina, como en el caso de agua de mar [Helmers, 1990].

1.2. Principios generales

Las técnicas voltamperométricas de redisolución tienen elevada sensibilidad y presentan una gran variedad de aplicaciones, lo que las convierte en una de las herramientas más potentes que ofrece la Química Electroanalítica para el análisis de trazas [Pingarrón, 1999].

La alta sensibilidad y el bajo coste de estas técnicas hacen que su aplicación a problemas analíticos sea muy extensa: muestras ambientales, aguas, muestras clínicas, drogas, alimentos, productos agrícolas, explosivos, industrias galvánicas, metalurgia, formulaciones farmacéuticas,...

Históricamente, la Voltamperometría tuvo su origen en los estudios del químico checoslovaco Jaroslav Heyrovsky, quien publicó en la segunda década del siglo XX [Heyrovsky, 1922] los resultados de sus investigaciones sobre un tipo particular de Voltamperometría, la **Polarografía**, la cual se caracteriza por utilizar un sistema de goteo de mercurio como electrodo de trabajo. En 1959 fue galardonado con el Premio Nobel de Química por el descubrimiento y desarrollo de este método analítico de polarografía. También en la década de los 50, otros investigadores como Barker [Barker, 1952] y Kemula [Kemula, 1956] postularon la posibilidad de concentrar especies químicas disueltas desde la disolución en la que se encuentran hasta un electrodo de considerable menor volumen.

Las técnicas voltamperométricas de redisolución estudian la composición de las disoluciones a través de la relación entre el potencial aplicado a un electrodo y la corriente que fluye. El análisis requiere de dos etapas: la primera consiste en la preconcentración del analito presente en la disolución en el pequeño volumen o en la superficie de un electrodo; y en la segunda etapa, se produce su redisolución electroquímicamente.

En general, la concentración tiene lugar como consecuencia de la capacidad de asociación entre las especies químicas en disolución y el electrodo, mediante

procesos electroquímicos y/o físicos entre ambos. Si esta asociación tiene lugar de manera acumulativa en el tiempo, da como resultado un efecto de preconcentración, puesto que las especies químicas pasan de la disolución al electrodo, el cual posee un volumen considerablemente menor.

Si las condiciones experimentales se mantienen constantes durante la etapa de preconcentración, a partir de los calibrados adecuados, la respuesta voltamperométrica medida (por ejemplo, la corriente de pico) puede emplearse para determinar la concentración en disolución de la especie preconcentrada. Como es evidente, la mayor ventaja de la técnica, radica precisamente en dicha preconcentración de la especie objeto del análisis sobre el electrodo en factores que oscilan entre 100 y más de 1000, haciendo la Voltamperometría de Redisolución especialmente adecuada para el análisis de trazas, consiguiendo límites de detección de hasta 10^{-10} - 10^{-11} M [Pingarrón, 1999].

Estudios comparativos con otras técnicas analíticas, Espectroscopía de absorción atómica con llama (FAAS), Plasma de Emisión, Espectroscopía de Fluorescencia de Rayos X, Activación Neutrónica, conducen a que el análisis por redisolución tiene varias ventajas. A continuación, en la tabla 1.1 se muestra un estudio comparativo de los límites de detección para metales de relevancia medioambiental, entre las distintas variantes de espectroscopía de absorción atómica (FAAS: Espectroscopía de absorción atómica con llama; GFAAS: Espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito y espectroscopía de absorción con generación de hidruros), la espectroscopía de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) y la Voltamperometría de Redisolución, donde se pueden observar los bajísimos límites de detección de esta última en comparación con las demás [Carvajal, 1991; Pingarrón, 1999].

Además de los bajos límites de detección, esta técnica aporta otras muchas ventajas, como la posibilidad de análisis multielementales así como estudios de especiación química, un amplio espectro de aplicación (tanto analitos orgánicos como inorgánicos), bajo grado de interferencia de la matriz, relativa simplicidad, bajo coste de la instrumentación y mantenimiento, y buena capacidad para análisis *in-situ* y on-line [Brainina, 2000].

Tabla 1.1. Límites de detección para metales a nivel de trazas con interés toxicológico (Valores dados en $\mu\text{g/L}$) [Carvajal, 1991; Pingarrón, 1999]

Ion	FAAS	GFAAS	Hidruros	ICP-MS	ASV
Al	45	0,15	-	0,16	0,03*
As	30	0,3	0,03	-	-
Ba	15	1,5	-	-	-
Be	3	0,1	-	-	-
Cd	3	0,003	-	0,03	<0,0002
Co	15	0,15	-	0,01	<0,005*
Cr	4,5	0,3	-	0,01	0,02
Cu	1,5	0,06	-	0,02	0,002
Fe	15	0,1	-	(0,2)	<0,04
Hg	300	-	0,015	0,02	0,005
Mn	3	0,01	-	0,03	40
Mo	30	0,1	-	-	-
Ni	3	0,08	-	0,04	0,001*
Pb	15	0,06	-	0,01	0,001
Se	150	1,5	0,03	-	-
Sn	30	0,3	-	0,06	<0,03*
Te	75	0,3	-	-	-
Ti	75	1,2	-	0,32	100
Tl	30	0,3	-	-	-
V	75	3,0	-	(0,03)	100
Zn	1,5	0,03	-	0,01	0,02

FAAS: Espectroscopía de absorción atómica con llama; GFAAS: Espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito; Hidruros: Espectroscopía de absorción atómica con generación de hidruros; ICP-MS: Espectroscopía de masas con plasma de acoplamiento inductivo; ASV: Voltamperometría de Redisolución Anódica; * Medido mediante Voltamperometría de Redisolución Adsorbtiva

1.3. Aspectos instrumentales

Una de las características más destacables de estas técnicas es el reducido tamaño y la simplicidad de los equipos instrumentales empleados.

Las células electroquímicas convencionales donde tiene lugar el proceso constan de tres electrodos (trabajo, auxiliar y referencia), además de un sistema de agitación y otro de burbujeo de nitrógeno (figura 1.1).



Figura 1.1. Módulo de electrodos del equipo de electroanálisis Metrohm 757 VA Computrace

Estas técnicas voltamperométricas se basan en el registro de la intensidad, I , la cual fluye entre el electrodo de trabajo y el electrodo auxiliar debido a la reducción u oxidación del analito en cuestión, en función del potencial, E , impuesto en el electrodo de trabajo y expresado con respecto al electrodo de referencia [Buffle, 2005].

Generalmente, los electrodos de trabajo empleados son microelectrodos que tienen áreas superficiales de unos pocos micrómetros cuadrados o incluso menos. Éstos deben poseer una elevada reproducibilidad de su superficie y mostrar una pequeña corriente de fondo.

Se elaboran a partir de diversos materiales entre los que se encuentran el mercurio, metales nobles como el oro, la plata o el platino y el carbón en diversas formas. Tal como se muestra en la figura 1.2, el intervalo de potenciales en el que

estos electrodos pueden ser utilizados en disoluciones acuosas varía y depende no sólo del material del electrodo, sino también de la composición del electrolito soporte.

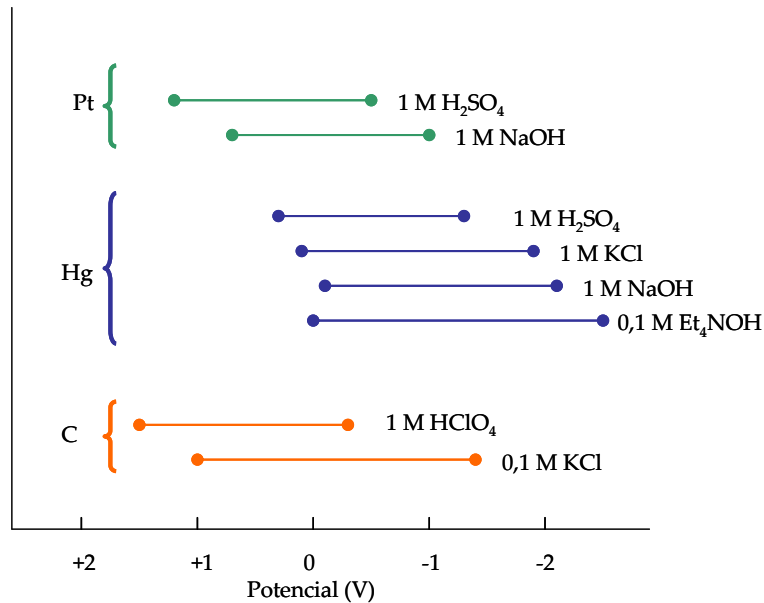


Figura 1.2. Intervalos de potencial para tres tipos de electrodos en diversos electrolitos soporte [Wang, 2006]

Generalmente, las limitaciones de los potenciales positivos están provocadas por las elevadas intensidades de corriente que se desarrollan debido a la oxidación del agua para dar oxígeno molecular. Los límites negativos son debidos a la reducción del agua dando hidrógeno. En el caso de los electrodos de mercurio, pueden tolerarse potenciales negativos relativamente elevados debido al elevado sobrepotencial del hidrógeno en este metal.

Los electrodos empleados con mayor asiduidad son los de mercurio, por las razones que se comentan a continuación [Brown, 2005]:

- En primer lugar el mercurio puede ser intercambiado muy fácilmente entre experimentos (para los electrodos de gota de mercurio) y por lo tanto, proporcionar una superficie limpia y reproducible para cada determinación.

- En segundo lugar, el electrodo de mercurio permite trabajar en un amplio rango de potenciales (especialmente potenciales negativos) a diferencia de otro tipo de electrodos.

- Finalmente, el elemento a analizar puede ser absorbido y difundir dentro del mercurio (dependiendo del elemento en cuestión) formando una amalgama en lugar de sólo ser adsorbido en la superficie.

Una limitación que presenta este tipo de electrodos es la facilidad con la que el mercurio es oxidado, limitando el uso del electrodo como ánodo. A potenciales mayores de +0,4 V, tiene lugar la formación de Hg(I), dando una onda que enmascara las curvas de otras especies oxidables. En presencia de iones que formen precipitados o complejos con Hg(I), este comportamiento tiene lugar incluso a potenciales más bajos.

Dentro de los electrodos de mercurio, los más utilizados son el de gota colgante, el de gota estática y el de película [Skoog, 2001; Wang, 2006]:

- El *electrodo de gota colgante de mercurio* (HMDE o electrodo de Kemula-Kublik, en honor de sus descubridores) es el diseño más clásico, el cual permite la renovación reproducible y sencilla de la gota de mercurio y el uso de períodos largos de acumulación. El electrodo consiste en un tubo capilar muy delgado (comprendido entre 0,15 y 0,5 mm de diámetro interno) conectado a un depósito que contiene mercurio. El metal es forzado a salir del capilar mediante un émbolo movido por un tornillo micrométrico. El tornillo micrométrico permite el control exacto del tamaño de la gota cuya área superficial es muy reproducible. Tras la etapa de redisolución, la gota se hace caer y se procede a la formación de una nueva y, por tanto, de un nuevo electrodo.

- Por otro lado, el *electrodo de gotas de mercurio típico* (DME) consiste en un tubo capilar fino de aproximadamente 0,05 mm a través del cual se fuerza a salir al mercurio por gravedad mediante una columna de mercurio de unos 50 cm de altura. El diámetro del capilar es tal que se forma una nueva gota cada 2 a 6 s. El diámetro de la gota es de 0,5 a 1 mm y es muy reproducible. En algunas aplicaciones, el tiempo de gota se controla con un martillo mecánico que desprende la gota a un tiempo determinado después de que empieza a formarse.

- Finalmente, el *electrodo de película de mercurio* (MFE) está prácticamente restringido al trabajo en redisolución. Consiste en una fina capa de mercurio que se deposita sobre un soporte inerte. Estos soportes deben poseer una alta conductividad eléctrica, ser electroquímicamente inertes y no reaccionar con el mercurio ni con los componentes de la muestra. El carbono es el elemento químico más empleado para la formación de dichas películas. Los sustratos de carbono se emplean en varias modalidades, principalmente en forma de carbono vitrificado, grafito pirolítico, fibra de carbono, polvo de grafito impregnado con ceras o materiales poliméricos, grafito unido a resinas epoxi, etc. También pueden emplearse otro tipo de soporte inerte como oro e iridio [Achterberg, 1999a]. Debido a que no están formados de una superficie pura de mercurio, tales electrodos de película presentan sobrepotenciales de hidrógeno más bajos y elevadas corrientes de fondo [Weng, 2006].

Este tipo de electrodo se suele emplear en ASV en lugar del HMDE cuando se trabaja con concentraciones muy pequeñas de los metales, ya que minimiza los fenómenos de difusión provocados en el electrodo de gota a bajas concentraciones.

La elección entre electrodo de gota colgante y de película debe hacerse en función del problema analítico a resolver. Ambos métodos proporcionan la posibilidad de formar amalgama pero el electrodo de gota colgante es más simple, con la formación de cada nueva gota se produce un nuevo electrodo, y es menos propenso a la contaminación que el electrodo de película [Achterberg, 1999a].

Naturalmente, para aquellos analitos que presenten un potencial de redisolución positivo o bien no se depositen sobre el mercurio, se hacen necesarios otros tipos de electrodos que puedan ser utilizados en regiones de potenciales positivos donde los electrodos de mercurio no son aplicables. Fundamentalmente pertenecen a este grupo, los electrodos sólidos de carbono, aunque también se ha utilizado metales nobles, como oro y platino [Pingarrón, 1999; Wang, 2006]. Tales electrodos son adecuados para la determinación de Cu, Hg y Pb, y elementos que tengan un potencial de oxidación más positivo que el de Hg, como por ejemplo, Ag, Au, Se y Te. Sin embargo, la superficie de estos electrodos no es siempre la misma y la intensidad de capacitancia es más alta que la de los electrodos de mercurio, por lo que los análisis se hacen menos sensibles y menos reproducibles al compararlos con los electrodos HMDE o MFE.

También se encuentran presentes en la celda de medida un electrodo auxiliar (normalmente de alambre de platino), que permite la conducción de electricidad a través de la disolución desde la fuente de la señal (generador de corriente) hasta el electrodo de trabajo, y un electrodo de referencia cuyo potencial permanece constante durante la medida, por lo que permite referir los valores de potencial de la celda al potencial característico de dicho electrodo.

Los electrodos auxiliares, pueden ser de:

- Pt
- Carbono Vitrificado

Mientras que los electrodos de referencia más usados son de:

- Ag/AgCl, KCl (3 mol/L)
- Calomelanos Saturado (SCE)

El electrodo de trabajo empleado en la presente Tesis ha sido el **electrodo de gota colgante de mercurio (HMDE)** ya que con éste, cada nueva superficie es fácilmente reproducida mediante la formación de una nueva gota. Además, para muchos de los procedimientos por AdCSV (modalidad empleada en esta Tesis) es esencial que se use una nueva superficie ya que el electrodo empieza a saturarse con el ligando libre o con el complejo si los productos de la reacción permanecen adsorbidos o difunden hacia el mercurio [Van den Berg, 1991].

Aunque el mercurio sea un metal tóxico, los microelectrodos HMDE generan gotas muy pequeñas, por lo que la realización de una adecuada manipulación y reciclaje del Hg usado, permite aprovechar, de una forma segura y respetuosa con el medioambiente, las ventajas manifiestas que en el análisis medioambiental ofrecen estos electrodos.

1.4. Etapas

La Voltamperometría de Redisolución se caracteriza por la combinación de tres etapas:

1.4.1. Etapa de preconcentración

El analito que se encuentra en la disolución de la muestra, se acumula en la superficie o en el interior del electrodo de trabajo mediante un proceso de oxidación, reducción o adsorción, formándose en cada uno de los casos:

- Una capa de sales poco solubles, en Voltamperometría de Redisolución Catódica (CSV).
- Una amalgama, en Voltamperometría de Redisolución Anódica (ASV).
- Una adsorción de compuestos orgánicos, en Voltamperometría de Redisolución Catódica Adsorptiva (AdCSV).

En esta etapa la disolución se agita para garantizar la aportación de analito a las proximidades del electrodo, y se aplica un determinado potencial de preconcentración o deposición, cuyo valor está en función del potencial redox del analito y del procedimiento de deposición del mismo.

El tiempo de preconcentración, agitación, temperatura, reproducibilidad del área del electrodo y potencial inicial aplicados, deberán estar perfectamente tabulados, para que los resultados sean repetitivos.

1.4.2. Etapa de reposo

Es el periodo en el que cesa la agitación, pero el potencial inicial se mantiene constante. En esta fase se consigue homogeneizar la sustancia sobre el electrodo, y asegurar además que la siguiente etapa se desarrolle en condiciones de reposo de la disolución.

1.4.3. Etapa de redisolución (stripping)

Las sustancias que han sido acumuladas sobre el electrodo, son redisueltas al ser sometidas a un proceso electroquímico (oxidación o reducción) que le devuelve hasta una forma química que favorece su redisolución, registrándose en ese momento la intensidad de corriente del analito durante una variación secuencial del potencial. Este proceso define una señal analítica proporcional a la concentración del analito dentro o en la superficie del electrodo y, por consiguiente, en la disolución de la muestra. El registro de la intensidad frente al barrido de potenciales se conoce con el nombre de voltamperograma, equivalente a los espectros obtenidos en espectroscopía. El potencial de pico es característico de la sustancia que lo produce, por lo que se puede utilizar también como técnica de análisis cualitativo.

El proceso para el análisis por **Voltamperometría de Redisolución Catódica Adsorptiva**, modalidad empleada para el desarrollo de las metodologías de la primera parte de esta Tesis, se puede esquematizar como se muestra en la figura 1.3:

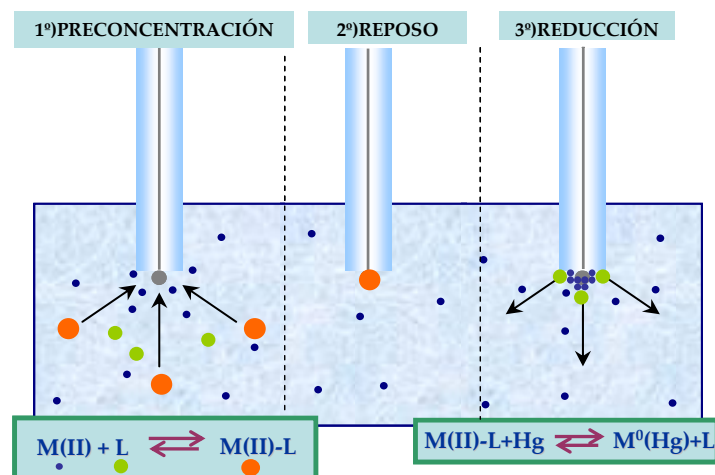


Figura 1.3. Etapas del análisis por Voltamperometría de Redisolución Catódica Adsorptiva

1.5. Clasificación

Los métodos de Voltamperometría de Redisolución se basan fundamentalmente en una etapa de acumulación o preconcentración y otra de determinación con redisolución. La acumulación puede ser catódica, anódica o adsorptiva y la determinación puede ser catódica o anódica. En la etapa de preconcentración, el analito de interés es acumulado en/sobre el electrodo de trabajo mientras que en la etapa de redisolución, el material acumulado es oxidado o reducido de vuelta a la disolución. La respuesta electroquímica, registrada durante esta etapa, es proporcional a la concentración del analito en el electrodo, y por lo tanto, en la muestra [Kissinger, 1996]. Existen diversas modalidades de las técnicas voltamperométricas de redisolución dependiendo fundamentalmente de los procesos redox de las etapas de preconcentración y redisolución:

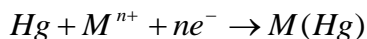
- La más clásica es la *Voltamperometría de Redisolución Anódica* (Anodic Stripping Voltammetry: ASV) que se usa generalmente para la determinación de iones metálicos. En ella la preconcentración se lleva a cabo mediante una

electrodeposición catódica, es decir, los iones metálicos en disolución (M^{n+}) son reducidos hacia su forma metálica (M) y concentrados en un electrodo (normalmente de mercurio) mediante la formación de una amalgama.

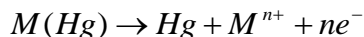
Durante la etapa de preconcentración se aplica un potencial más negativo, frecuentemente alrededor de -1,0 V, que el potencial de reducción de los iones metálicos. Para facilitar la etapa de preconcentración y favorecer la difusión de las especies hacia el electrodo, se suele emplear un sistema de agitación. En la etapa de redisolución los metales electrodepositados son redisueltos aplicando un barrido anódico (de ahí el nombre de la técnica) de potencial hacia valores más positivos que el de deposición. Así, cuando el barrido de potencial alcanza el valor característico del potencial estándar de oxidación del metal, éste se redisuelve pasando de la forma metálica amalgamada en la que se encontraba en el electrodo a una forma iónica en disolución.

Estas etapas de preconcentración y redisolución pueden representarse de la siguiente manera [Fogg, 1994]:

1) Acumulación (Catódica):



2) Redisolución (Anódica):



(siendo una medida directa de M^{n+})

Para que la primera etapa tenga lugar de manera satisfactoria, los iones metálicos deben cumplir unos requisitos: 1) Deben ser solubles en mercurio (ya que por el contrario, la siguiente etapa de reoxidación sería electroquímicamente irreversible) y 2) el potencial de reducción del metal debe encontrarse dentro del intervalo de potenciales en el que el electrodo puede ser empleado. El intervalo de potencial de trabajo depende no sólo del material del electrodo sino también de la composición de la disolución en la que está sumergido (Ver figura 1.2). Por ello, para el electrodo de mercurio, el límite positivo se encuentra alrededor de +0,4 V mientras que el límite negativo se localiza alrededor de -1,0 V ó -2,0 V dependiendo del electrolito soporte [Van den Berg, 1991; Skoog, 2001; Pingarrón, 1999].

En la figura 1.4 se han representado los potenciales estándar de reducción de algunos metales de interés, observándose como la mayoría cae dentro del

amplio intervalo de potenciales de trabajo que presenta el electrodo de mercurio (marcado con un recuadro).

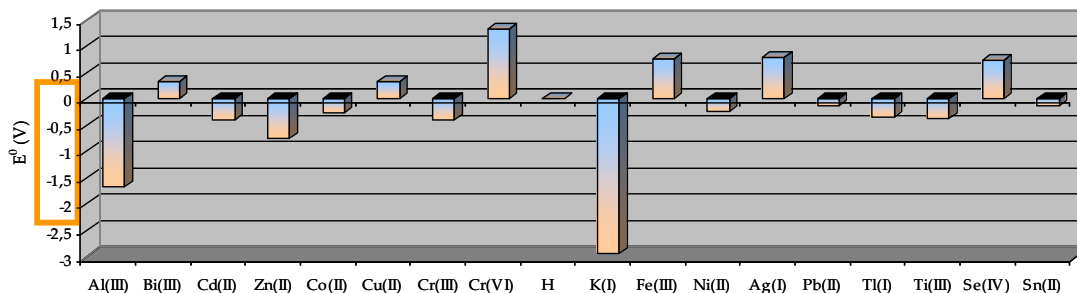


Figura 1.4. Potenciales estándar de reducción al estado metálico de algunos metales de interés. Datos seleccionados de [Skoog, 2001]

Sin embargo, algunos de los metales que están incluidos dentro del intervalo, no pueden ser determinados por ASV, ya que se trata de una técnica muy efectiva pero al mismo tiempo está limitada a aquellos metales solubles en mercurio y que por lo tanto formen amalgama con el mismo. De ahí que metales como Fe, Si, Ni, Mo, Ti y Te, no puedan ser determinados debido a su baja solubilidad en mercurio. Además, metales que sean reducidos al estado metálico a potenciales muy negativos, fuera del intervalo de potenciales de trabajo del mercurio, tampoco pueden ser determinados por esta técnica.

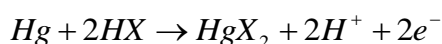
Por otro lado, algunos metales presentan potenciales de reducción muy similares, como le ocurre al grupo de Sn, Pb, Tl, In y Cd, provocando interferencias si se encuentran en concentraciones similares. Sin embargo, las concentraciones de Pb y Cd suelen ser mayores que las de los otros elementos, por lo que pueden ser analizados por esta técnica. Además, hay que añadir Cu y Zn a la lista de posibles metales determinados por ASV, ya que aparecen a niveles detectables incluso en aguas no contaminadas. En resumen se puede decir que este método tan sencillo puede ser usado para la determinación simultánea de Cu, Pb, Cd y Zn [Van den Berg, 1991].

- La Voltamperometría de Redisolución Catódica (Cathodic Stripping Voltammetry: CSV) es utilizada para determinar compuestos orgánicos e inorgánicos (usualmente aniones y complejos de cationes) que formen sales poco solubles con el electrodo. En esta modalidad se produce en primer lugar una etapa

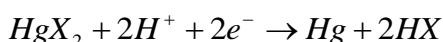
de oxidación para llevar a cabo la preconcentración del analito en forma de una película insoluble sobre el electrodo. Y, a continuación, dicho analito se redissuelve y monitoriza mediante un barrido catódico de potencial (hacia valores más negativos que el de electrodeposición). En los casos en los que el material del electrodo participe en la reacción, el voltaje aplicado para la preconcentración, oxida primeramente al electrodo de trabajo.

Un ejemplo de las posibles etapas se muestra a continuación:

1) Acumulación (Anódica):



2) Redisolución (Catódica):



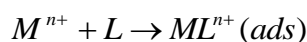
(siendo una medida indirecta de HX)

La aplicación de la CSV está mucho más limitada siendo aplicable a compuestos que formen sales o complejos de mercurio insolubles.

- Finalmente, una última modalidad la constituye el *análisis por redisolución basado en procesos de preconcentración no electrolíticos*. A este grupo pertenece la **Voltamperometría de Redisolución Catódica Adsorptiva (AdCSV)**, donde se utiliza una etapa de preconcentración del analito basada en su adsorción sobre la superficie electródica. El analito preconcentrado puede cuantificarse a continuación empleando un programa de potencial apropiado que permita la reducción del mismo. Esta modalidad suele requerir de la introducción de un ligando externo para dar lugar a la formación de un quelato con el metal, el cual se adsorbe sobre el electrodo en la primera etapa. Al igual que en ASV, se dispone de un sistema de agitación para favorecer la difusión del complejo hacia la gota. En la segunda etapa este complejo se destruye, permitiendo que el ligando vuelva a la disolución y el metal reducido, se libere quedando retenido bien en la gota de mercurio o bien en las proximidades de la misma, dependiendo del metal en cuestión.

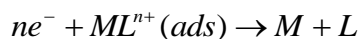
Se pueden esquematizar las reacciones que ocurren en cada una de las etapas de la siguiente manera:

1) Acumulación (Adsorción):



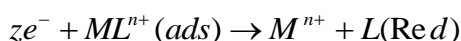
En la redisolución puede que se reduzca el metal o bien que se reduzca el ligando:

2a) Redisolución (Catódica):



(siendo una medida directa de M^{n+} e indirecta de L)

2b) Redisolución (Catódica):



(siendo una medida indirecta de M^{n+} y directa de L)

Como se puede observar, en la primera etapa se produce la adsorción del complejo sobre el electrodo de trabajo, sin cambio alguno en el estado de oxidación. Durante esta etapa se aplica un potencial de deposición constante para favorecer la adsorción del complejo sobre la gota de Hg. A continuación, mediante el barrido hacia potenciales negativos, se puede determinar el metal directa o indirectamente por la reducción bien del metal o del ligando, respectivamente. Se prefiere la reducción del metal a la reducción del ligando ya que el potencial del pico de reducción es específico del metal minimizándose así las interferencias de otros metales. Sin embargo, es preferible la reducción del ligando cuando el metal es reducido únicamente a potenciales muy negativos, como le ocurre al Th y algunos otros metales de las tierras raras.

Esta modalidad presenta dos importantes ventajas con respecto a la anódica. En primer lugar, cualquier estado de oxidación puede ser depositado en la gota sin necesidad de ser solamente el estado metálico. Y, por otro lado, el material es depositado como una capa monomolecular en la superficie del electrodo, haciéndolo más accesible a la reducción siendo independiente de los fenómenos de difusión en la gota.

Para un gran número de elementos, la sensibilidad de AdCSV es muy alta, alcanzando límites de detección del orden de pM y nM, permitiendo medidas directas (sin una preconcentración previa) de por ejemplo, disoluciones salinas como agua de mar. Es en este área donde la voltametría presenta una importante ventaja sobre otras técnicas tales como ICP-MS la cual tiene la capacidad de realizar análisis muy rápidos de un gran número de elementos en disoluciones acuosas, pero no puede trabajar con disoluciones salinas sin una dilución o extracción previa del analito [Van den Berg, 1991].

Por sus múltiples ventajas, esta última modalidad ha sido la empleada en el desarrollo de las metodologías de esta primera parte de la Tesis Doctoral.

Hay que destacar que no sólo existen estas tres modalidades de técnicas de redisolución, ya que las diferentes combinaciones de las etapas de preconcentración y redisolución, dan lugar a muchas otras variantes. Se pueden citar algunas modalidades, como por ejemplo, aquellas en las que se produce una oxidación tras la adsorción del complejo, otras en las que tanto la etapa de acumulación como la de redisolución se basan en reducciones o bien en oxidaciones. Existen también métodos que incluyen una etapa intermedia entre la de acumulación y la de redisolución (la cual se explicará más detenidamente en el capítulo 3). Y procesos catalíticos los cuales presentan interesantes perspectivas debido a la amplificación de la señal y la disminución de los límites de detección [Fogg, 1994; Van den Berg, 1991].

1.6. Cuantificación en AdCSV

Para la cuantificación de la concentración de analito se suele emplear el método de las adiciones patrón. Ya que la sensibilidad de los métodos de redisolución puede variar en función de la composición de la matriz de la disolución, lo que resulta especialmente importante en el agua de mar, realizando adiciones sobre la muestra se garantiza la realización de todas las medidas en similares condiciones. En la figura 1.5 se muestra un voltamperograma obtenido por el método de adiciones patrón con sucesivas adiciones de 4,7 nM de Cu(II).

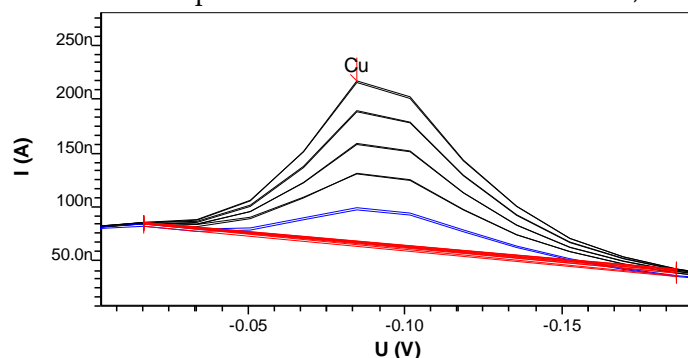


Figura 1.5. Ejemplo de voltamperograma obtenido para sucesivas adiciones de 4,7 nM de Cu(II) mediante AdCSV utilizando 2-hidroxibenzaldehído benzoilhidrazona como reactivo

1.7. Parámetros instrumentales

Durante la etapa de redisolución, se aplica una señal de excitación en forma de potencial variable, la cual provoca una intensidad de corriente que se registra con el voltamperograma correspondiente.

Este potencial variable puede adquirir diversas configuraciones en función de su variación con el tiempo, siendo el barrido lineal (LS), impulso diferencial (DP) y onda cuadrada (SW), las configuraciones que se emplean más comúnmente (fig. 1.6 y 1.7).

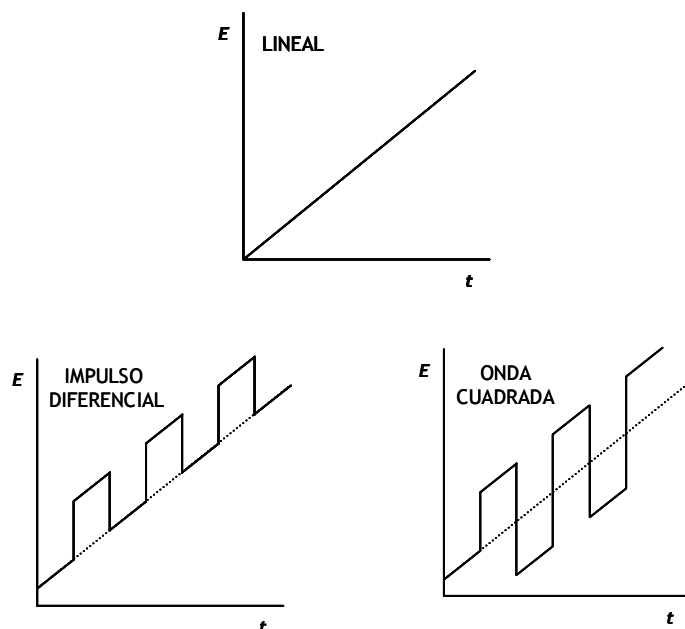


Figura 1.6. Formas de las señales de potencial de excitación lineal, impulso diferencial y onda cuadrada, utilizadas en Voltamperometría de Redisolución en los equipos analógicos

En el *barrido lineal* (LS), la modalidad más simple, el potencial de corriente continua aplicado en la celda aumenta linealmente en función del tiempo. La intensidad de corriente, que se desarrolla en la celda, se registra en función del potencial aplicado y, por tanto, del tiempo. El modo de excitación *impulso diferencial* (DP) se aplica tanto a sistemas reversibles como irreversibles, lo que lo

hace independiente de la naturaleza reversible o no del proceso electroquímico empleado para la obtención de la señal voltamperométrica. El modo *onda cuadrada* (SW) suele emplearse en sistemas reversibles. Los modos DP y SW presentan como ventaja frente al LS la compensación de la contribución de la corriente de capacitancia, una reducción de la interferencia por el oxígeno disuelto y una mayor velocidad de análisis [Achterberg, 1999b]. El LS suele realizarse cuando se ha depositado el analito sobre un electrodo MFE, mientras que los modos DP y SW se aplican mayoritariamente con el electrodo HMDE.

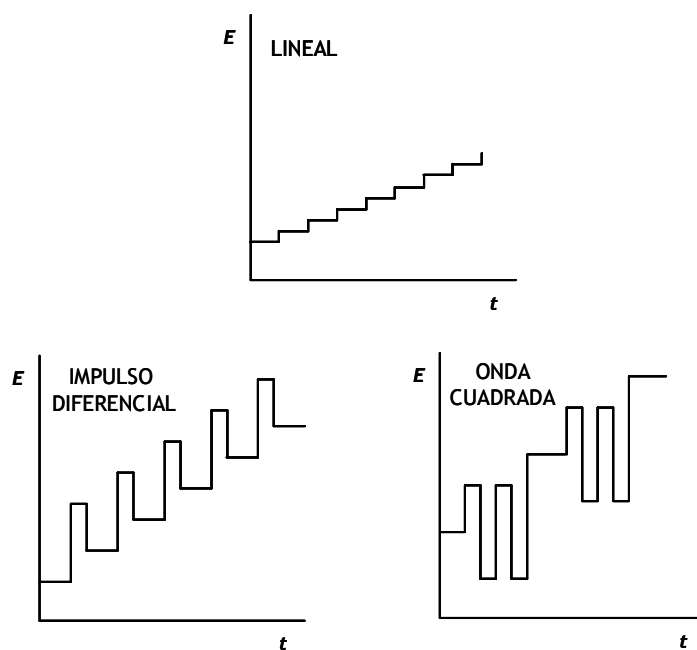


Figura 1.7. Formas de las señales de potencial de excitación lineal, impulso diferencial y onda cuadrada, utilizadas en Voltamperometría de Redisolución en los equipos digitales

En esta Tesis se ha hecho uso de la variación del potencial mediante excitación **diferencial de impulso (DP)** ya que ofrece un mayor efecto diferenciador con la intensidad de fondo y por lo tanto una sensibilidad aumentada. Esta modalidad es la considerada más adecuada para el análisis de metales disueltos en agua de mar por Voltamperometría de Redisolución, la cual aplica en determinados momentos una subida de potencial que se mantiene constante durante un tiempo fijo. Los saltos se producirán a modo de escalera,

como se muestra en la figura 1.8. La altura del impulso de potencial es constante con respecto al potencial base y suele estar comprendida entre 10 y 100 mV.

En este modo se llevan a cabo dos medidas de la corriente durante la vida de cada impulso: una se realiza al tiempo marcado en la figura 1.8 como $t_m(i_1)$, es decir, inmediatamente antes de que se aplique el impulso, mientras la segunda se toma al tiempo $t_m(i_2)$, es decir, al final del período de aplicación del impulso. El registro del experimento será entonces una representación de la diferencia de corriente medida i_2-i_1 , frente al potencial base.

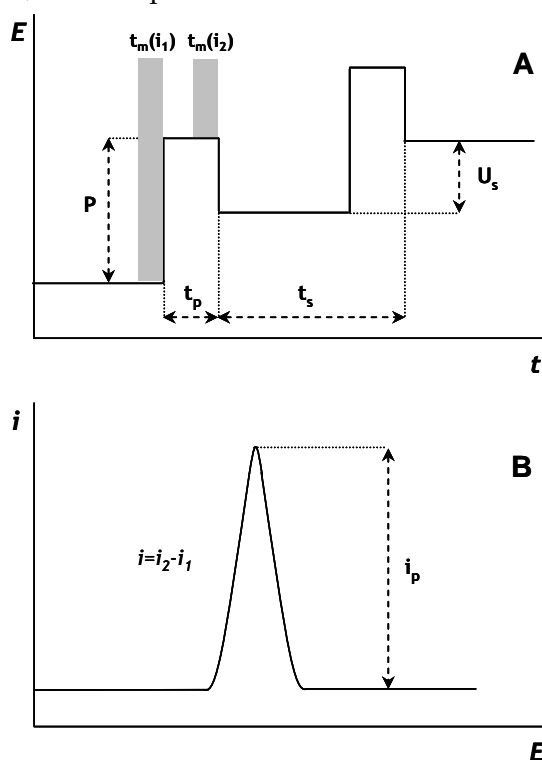


Figura 1.8. Modo de impulso diferencial: A. Variación del potencial aplicado durante la etapa de redisolución respecto al tiempo; B. Voltamperograma (i vs E)

En la tabla 1.2 se muestran los parámetros instrumentales más característicos en Voltamperometría de Redisolución Diferencial de Impulsos.

Tabla 1.2. *Parámetros instrumentales característicos en equipos de Voltamperometría de Redisolución con electrodo HMDE y señal de potencial DP*

Parámetro	Significado
t_d (Tiempo de deposición o de preconcentración)	Tiempo de la etapa de deposición/preconcentración
E_d (Potencial de deposición)	Potencial al cual se realiza la deposición/preconcentración
d_s (Tamaño de gota)	Tamaño de la gota del electrodo HMDE*
V_{ag} (Velocidad de agitación)	Velocidad de rotación del cilindro de agitación durante la etapa de deposición/preconcentración
P (Amplitud de impulso)	Amplitud del impulso de potencial superpuesto
U_s (Salto de potencial)	Incremento de potencial en la rampa
t_s (Intervalo de tiempo para el salto de potencial)	Intervalo de tiempo tras el cual el potencial del barrido se incrementa en la cantidad U _s
t_m (Tiempo de medida)	Tiempo en el cual se mide la intensidad de corriente
t_p (Tiempo de impulso)	Intervalo de tiempo en el que el impulso se superpone al voltaje directo

* Existen tres modalidades principalmente para el electrodo de mercurio: el electrodo de gota de mercurio (DME), el electrodo de película de mercurio (MFE) y el electrodo de gota colgante de mercurio (HMDE) empleado en esta Tesis

La interferencia más ampliamente encontrada en Voltamperometría de Redisolución es el solapamiento entre los picos correspondientes al elemento de interés y otros analitos presentes en la muestra. Sin embargo, la elección adecuada del potencial de deposición, el iniciar el barrido desde un potencial distinto, la velocidad del barrido de redisolución, el pH o electrolito soporte empleado, así como el empleo de agentes enmascarantes o precipitantes, pueden eliminar alguno de estos problemas [Brown, 2005].

En el análisis por redisolución, el oxígeno disuelto puede también interferir bien oxidando al metal amalgamado o bien formando iones hidroxilo que precipitan en las proximidades del electrodo influyendo en la formación de sales poco solubles en CSV [Carvajal, 1991]. Además, una disolución acuosa saturada de aire presenta dos ondas inconfundibles en el voltamperograma. La primera debida a la reducción del O_2 a H_2O_2 , y la segunda debida a la posterior reducción del H_2O_2 a H_2O . Por ello, la eliminación del oxígeno es generalmente la primera etapa en los procedimientos voltamperométricos, burbujeando la disolución con un gas inerte (N_2 , Ar) [Skoog, 2001].

1.8. Voltamperometría de Redisolución Catódica Adsorbtiva (AdCSV)

Los métodos voltamperométricos de redisolución catódica adsorbtiva tienen unas excelentes características, sobre todo en cuanto a sensibilidad se refiere. Hasta el momento han sido desarrollados varios métodos para la determinación de metales pesados empleando este tipo de voltamperometría. Sin embargo, dada la versatilidad de esta técnica, la búsqueda de nuevos agentes complejantes que mejoren las prestaciones electroanalíticas se justifica, no sólo en relación con el desarrollo de nuevos métodos de mayor sensibilidad para su determinación a nivel de trazas en aguas naturales, sino por sus potenciales aplicaciones en los estudios de especiación por competición de ligandos.

Es un método muy sensible para la determinación de ciertos metales traza, cuya cuantificación mediante otros métodos de redisolución sería complicada o no factible.

Este método está basado en la formación de un complejo metálico entre un ligando normalmente de naturaleza orgánica, que se adiciona a la disolución de muestra, y el metal que se pretende determinar. Tradicionalmente, la adsorción de compuestos orgánicos sobre superficies electrónicas ha sido considerada como un problema que limitaba las medidas voltamperométricas. Sin embargo, esta adsorción, debidamente controlada, puede ser utilizada como proceso de acumulación del compuesto a analizar, lo que puede dar lugar a importantes mejoras en la sensibilidad y selectividad de su determinación.

Estos compuestos orgánicos deben cumplir dos requisitos principales:

- 1) Tener capacidad para formar complejos con el elemento de interés. Estos ligandos suelen caracterizarse por la presencia en su molécula de grupos donadores (O, N, S) y anillos aromáticos.
- 2) El complejo producido debe poder adsorberse sobre la superficie del electrodo de mercurio.

Durante la etapa de deposición, el complejo metálico se acumula mediante adsorción en la superficie del electrodo, aplicando para ello un potencial de deposición, cuyo valor suele ser ligeramente mayor (aproximadamente 0,1 V) que el potencial de redisolución del complejo metal-ligando. La adsorción de los complejos podría expresarse por la existencia de interacciones electrostáticas, así como interacciones de electrones π .

En la etapa de redisolución se realiza un barrido de potencial hacia valores más negativos. Esto puede provocar la reducción de un grupo oxidante del ligando o bien del propio metal en el complejo adsorbido, generando una corriente cuya intensidad se registra.

El procedimiento de acumulación adsortiva da lugar a una preconcentración muy efectiva, que permite la realización de medidas ultrasensibles, por debajo de 10^{-10} M, empleando tiempos de preconcentración cortos. Sin embargo, para alcanzar altas sensibilidades, es esencial optimizar las variables operacionales (pH, potencial de acumulación,...) que favorecen la adsorción.

1.8.1. Compuestos orgánicos quelatantes

Se han empleado diversos reactivos orgánicos quelatantes para su aplicación en la determinación de metales pesados mediante AdCSV y HMDE como electrodo de trabajo.

Tras una revisión bibliográfica se ha constatado como los ligandos orgánicos más comúnmente empleados como agentes complejantes han sido la *2,3,4,5,7-pentahidroflavona (morina)*, *rojo de pirogallol (PGR)*, *8-hidroxiquinolina (oxina)*, *dimetilglioxima (DMG)* y *naranja de xilenol (XO)*, entre otros.

La *morina* ha sido empleada en los últimos años para la determinación simultánea de Cu, Zn y Pb en agua de grifo [Shams, 2004] y para el análisis de Cu y Bi, los cuales presentan dificultades a la hora de determinarse de manera simultánea [Hajian, 2003].

El *rojo de pirogalol* ha sido ampliamente usado como agente complejante en AdCSV, bien haciendo uso del mismo de manera individual o bien empleando otro tipo de reactivo adicional. Arancibia y col., propusieron un método para la determinación de Al en muestras de agua de mar mediante la adición de rojo de pirogalol y sal de amonio cuaternaria [Arancibia, 2007]. Por otro lado, Ensafi y col., [Ensafi, 2004; Ensafi, 2003] propusieron por un lado, un método para la determinación simultánea de Cu y Mo en agua de grifo y agua de río solventando la dificultad que presentan ambos metales a la hora de medirse a la vez debido al solapamiento de las señales, y por otro lado, un método para el análisis individual de Pb en agua de río y de grifo.

A su vez, la *oxina* ha sido empleada como ligando orgánico en AdCSV para la determinación simultánea de Cu, Pb y Cd en agua de mar [Van den Berg, 1986]. También ha sido empleada junto a *dimetilglioxima (DMG)* para la determinación de un grupo de elementos como el Cu, Pb, Cd y Ni en agua de mar [Colombo, 1997], así como para la determinación simultánea de Cu, Cd, Fe, Ni y Zn [Abollino, 1995]. Ma y col., publicaron un interesante trabajo para la determinación de complejos de níquel y cobalto con la *DMG* [Ma, 1997].

El *naranja de xilenol* también ha sido muy empleado, pudiendo citar el análisis simultáneo de Cu, Pb y Cd en agua de río y de grifo por Ensafi y col., [Ensafi, 2006] o el análisis individual de Cu por AdCSV empleando este mismo ligando [Khayamian, 2006].

Sin embargo, también se ha hecho uso a lo largo de estos años de otros reactivos menos conocidos pero con excelentes propiedades como agentes complejantes de iones metálicos. Suciú y col., en el año 2000 propusieron un método para Cd empleando *2-mercapto-5-fenil-amino-1,3,4-tiadiazol (MPATD)* [Suciú, 2000]. Khodari en el año 1998 propuso un nuevo método de análisis de Cd para muestras de agua de mar empleando como reactivo *5-fluorouracilo* [Khodari,

1998]. Ensafi en el 2002 publicó un método por AdCSV para la determinación de Cu y Mo en agua de río y de grifo mediante el uso de *cupferron* (*N-Hidroxi-N-Nitrobenzenamina*) [Ensafi, 2002]. Otro de los reactivos orgánicos quelatantes empleados han sido *morina-5'-ácido sulfónico* junto con *dodecilsulfato sódico*, empleado recientemente para la determinación de Pb en agua de grifo y agua de mar [Arancibia, 2009].

Los compuestos orgánicos de tipo “imino” presentan una gran aplicabilidad en el análisis inorgánico, tanto como reactivos fotométricos como fluorimétricos [Weltz, 1999]. Estos compuestos presentan interesantes propiedades que los hacen apropiados para su aplicación como ligandos complejantes en la determinación de metales mediante AdCSV. El grupo “imino” se caracteriza por la presencia de un doble enlace C=N como se muestra en la tabla 1.3. La naturaleza de la sustitución en el nitrógeno del grupo imino determina distintos grupos de compuestos orgánicos: *oximas*, *acinas*, *semicarbazonas*, *tiosemicarbazonas* e *hidrazonas*.

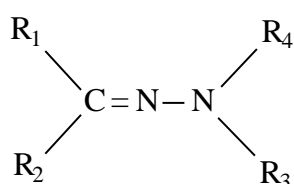
Tabla 1.3 Grupo imino y sustituciones más características

$\text{R}-\text{N}=\text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{R}_1 \\ \diagdown \text{R}_2 \end{array}$	Sustitución R	Grupo de compuestos
	-OH	Oximas
-N=CR ₁ R ₂	Acinas	
-NH-CO-NH ₂	Semicarbazonas	
-NH-CS-NH ₂	Tiosemicarbazonas	
-N-R ₃ R ₄	Hidrazonas	

Se puede citar algunos reactivos orgánicos tipo “imino” como *oximas* o *tiosemicarbazonas*, empleadas en AdCSV para la determinación de metales de interés medioambiental. Lucia y col., en 1994 emplearon la *salicilaldoxima* como ligando quelatante para la determinación de Cu, presentando mejor sensibilidad que otros ligandos usados con el mismo fin [Lucia, 1994]. Por otro lado, Mahajan y col., propusieron un método para la determinación de Cu empleando *salicilaldehído tiosemicarbazona* como ligando orgánico complejante [Mahajan, 2005]. Este reactivo

había presentado interesantes propiedades en la determinación de Cu en otras técnicas, por lo que se decidió extender las aplicaciones analíticas del mismo en AdCSV aplicándolo a muestras de sangre con muy buenos resultados.

Un grupo importante de ligandos orgánicos tipo imino son las *hidrazonas*, las cuales se caracterizan por la presencia de la agrupación triatómica C=N-N, donde el nitrógeno imínico se une a otro átomo de nitrógeno (amínico), el cual a su vez puede presentar sustituciones de diversa naturaleza [Libes, 1992]. Se representan de forma general:



donde R₁, R₂, R₃ y R₄ representa la existencia de hasta cuatro radicales.

Los sustituyentes pueden ser: protones, radicales alquilo, radicales arilo, radicales acilo, radicales O-alquilo, radicales O-arilo, así como grupos nitrilo o halógenos. En aquellos casos en los que la sustitución R₃ y/o R₄ es por grupos aromáticos, reciben el nombre de *aroidhidrazonas*.

Estos compuestos se suelen comportar como ligandos polidentados en la formación de quelatos neutros con los iones bivalentes de los metales de transición, que se pueden extraer con disolventes orgánicos y, cuya formación depende del pH. Así, se encuentra descrito su uso para la determinación espectrofotométrica de metales, tanto en disolución acuoetanólica [Gallego, 1978; Gallego, 1979a; Gallego, 1979b; García-Vargas, 1980; Silva, 1980a; Silva, 1980b; García-Vargas, 1981], como en medios orgánicos inmiscibles con el agua, mediante la extracción líquido-líquido [García-Vargas, 1984].

El hecho de que sean compuestos fáciles de sintetizar (por condensación) y que posean alta reactividad hace posible su aplicación en numerosos campos de la Química Analítica, como es el caso de la técnica voltamperométrica AdCSV.

En esta Tesis Doctoral se han empleado dos tipos diferentes de aroilhidrazonas para el análisis de metales pesados de interés medioambiental empleando AdCSV.

1.8.2. Aplicaciones de la Voltamperometría de Redisolución

Como ha quedado de manifiesto en este capítulo, la elevada sensibilidad, su sencillez, tanto en el procedimiento experimental como en la instrumentación requerida, y el bajo coste del análisis, hacen que el análisis por redisolución se aplique a la determinación de multitud de metales como: Pb, Hg, Cd, As, Tl, Se, Cu, Zn, Ni, Co, Sb, Ag, Cr, Fe, Bi, Al, V, U, Mn, Sn, Au, Pt, entre los más destacados. Así como para compuestos con no metales del tipo: tioles, sulfuros, haluros,...tanto en muestras ambientales (aguas, aire, rocas, minerales y suelos) y clínicas (sangre, orina, dientes, pelo y tejido ocular), como en el análisis de alimentos, de fármacos, y de residuos industriales.

Aunque el rango de sustancias orgánicas e inorgánicas que pueden ser monitorizadas mediante voltamperometría en muestras medioambientales es muy amplio, el análisis de metales es la mayor aplicación.

En algunos países como Suiza y Alemania, la Voltamperometría de Redisolución es un método oficial en el análisis de aguas. Estos análisis se aplican a aguas de río, potables y residuales y también en el control de calidad de alimentos. Por otro lado, en EE.UU. se trata de un método oficial para productos farmacéuticos siendo considerada en otros países como un método alternativo en el análisis de trazas.

Por tanto, puede decirse que se trata de una técnica muy empleada actualmente como método oficial de análisis para ciertas muestras, además de ser de gran aplicabilidad tanto para metales como para no metales. Es por ello por lo que la **Voltamperometría de Redisolución Catódica Adsorptiva** ha sido la técnica seleccionada en la primera parte de los trabajos de investigación de esta Tesis.

Referencias

- Abollino, O., Aceto, M., Sacchero, G., Sarzanini, C., Mentasti, E., **1995**. Determination of copper, cadmium, iron, manganese, nickel and zinc in Antarctic sea water. Comparison of electrochemical and spectroscopic procedures. *Analytica Chimica Acta* 305, 200-206.
- Achterberg, E.P., Braungardt, C., **1999a**. Stripping voltammetry for the determination of trace metal speciation and in-situ measurements of trace metal distributions in marine waters. *Analytica Chimica Acta* 400, 381-397.
- Achterberg, E.P., Braungardt, C., Morley, N.H., Elbaz-Poulichet, F., Leblanc, M., **1999b**. Impact of Los Frailes mine spill on riverine, estuarine and coastal waters in southwest Spain. *Water Research* 33, 3387-3394.
- Arancibia, V., Muñoz, C., **2007**. Determination of aluminium in water samples by adsorptive cathodic stripping voltammetry in the presence of pyrogallol red and a quaternary ammonium salt. *Talanta* 73, 546-552.
- Arancibia, V., Nagles, E., Cornejo, S., **2009**. Determination of lead in the presence of morin-5'-sulfonic acid and sodium dodecyl sulfate by adsorptive stripping voltammetry. *Talanta* 80, 184-188.
- Barker G.C., Jenkins I.L., **1952**. Square-wave polarography. *Analyst* 77, 685-696.
- Brainina, K.Z., Malakhova, N.A., Stojko, N.Y., **2000**. Stripping voltammetry in environmental and food analysis. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 368, 307-325.
- Brown, R.J.C., Milton, M.J.T., **2005**. Analytical techniques for trace element analysis: an overview. *Trends in Analytical Chemistry* 24, 266-274.
- Buffle, J., Tercier-Waeber, M.L., **2005**. Voltammetric environmental trace- metal analysis and speciation: from laboratory to in situ measurements. *Trends in Analytical Chemistry* 24, 172-191.
- Carvajal, A., Úbeda, V., Maestre, M.A., **1991**. Polarografía: Voltamperometría de Redisolución, Fundamentos y Aplicaciones, Monografía, Editorial Metrohm.
- Colombo, C., van der Berg, C. M. G., **1997**. Simultaneous determination of several trace metals in seawater using cathodic stripping voltammetry with mixed ligands. *Analytica Chimica Acta* 337, 29-40.
- Ensafi, A.A., Khayamian, T., Atabati, M., **2002**. Simultaneous voltammetric determination of molybdenum and copper by adsorption cathodic differential pulse stripping method using a principal component artificial neural network. *Talanta* 57, 785-793.
- Ensafi, A.A., Khayamian, T., Atabati, M., **2003**. Differential pulse cathodic stripping adsorption voltammetric determination of trace amounts of lead using factorial design for optimization. *Talanta* 59, 727-733.
- Ensafi, A.A., Khayamian, T., Khaloo, S.S., **2004**. Application of adsorptive cathodic differential pulse stripping method for simultaneous determination of copper and molybdenum using pyrogallol red. *Analytica Chimica Acta* 505, 201-207.

Ensafi, A.A., Khayamian, T., Benvidi, A., Mirmomtaz, E., **2006**. Simultaneous determination of copper, lead and cadmium by cathodic adsorptive stripping voltammetry using artificial neural network. *Analytica Chimica Acta* 561, 225–232.

Fogg, A.G., **1994**. Adsorptive stripping voltammetry or Cathodic Stripping Voltammetry? Methods of accumulation and determination in stripping voltammetry. *Analytical Proceedings including Analytical Communications* 31, 313-317.

Gallego, M., García-Vargas, M., Pino, F., Valcárcel, M., **1978**. Analytical applications of picolinealdehyde salicyloylhydrazone - spectrophotometric determination of nickel and zinc. *Microchemical Journal* 23, 353-359.

Gallego, M., García-Vargas, M., Valcárcel, M., **1979a**. Analytical applications of picolinealdehyde salicyloylhydrazone. 2. Extraction and spectrophotometric determination of vanadium(V). *Microchemical Journal* 24, 143-149.

Gallego, M., García-Vargas, M., Valcárcel, M., **1979b**. Pyridine-2-carbaldehyde 2-hydroxybenzoylhydrazone as a selective reagent for the extraction and spectrophotometric determination of iron(II). *Analyst* 104, 613-619.

García Vargas, M., Gallego, M., de la Guardia, M., **1980**. Pyridine-2-acetaldehyde salicyloylhydrazone as an analytical reagent and its application to the determination of vanadium. *Analyst* 105, 965-973.

García-Vargas, M., Bautista, J.M., de Toro, P., **1981**. Analytical possibilities of pyridine-2-acetaldehyde benzoylhydrazone as a chromogenic reagent. *Microchemical Journal* 26, 557-568.

García-Vargas, M., Hernandez-Artiga, M.P., Pérez-Bustamente, J.A., **1984**. Liquid-liquid extraction with 2-acetylpyridinebenzoylhydrazone in the determination of traces of copper, nickel, cobalt and zinc by atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 157, 363-367

Hajian, R., Shams, E., **2003**. Application of adsorptive stripping voltammetry to the determination of bismuth and copper in the presence of morin. *Analytica Chimica Acta* 491, 63–69.

Helmers, E., Mart, L., Schulz-Baldes, M., Ernst, W., **1990**. Temporal and spatial variations of lead concentration in Atlantic surface waters. *Marine Pollution Bulletin* 21, 515-518.

Heyrovsky, J., **1922**. Electrolysis with the dropping mercury electrode. *Chemicke Listy* 16, 256-304.

Kemula, W., Kublik, Z., **1956**. Applications on Steady Hanging Mercury Electrode to the Oscillopolarographic Investigations. *Roczn Chem* 30, 1005 – 1008.

Khayamian, T., Ensafi, A.A., Benvidi, A., **2006**. Extending the dynamic range of copper determination in differential pulse adsorption cathodic stripping voltammetry using wavelet neural network. *Talanta* 69, 1176-1181.

Khodari, M., **1998**. Determination of cadmium in seawater by cathodic stripping voltammetry of complexes with 5-fluorouracil. *Electroanalysis* 10, 1061-1063.

Kissinger, P.T., Heineman, W.R., **1996**. *Laboratory techniques in electroanalytical chemistry*. Second edition, revised and expanded. New York. Marcel Dekker, Inc. 719.

- Libes, S.M., **1992**. An introduction to Marine Biogeochemistry analyst. New York. Ed. John Wiley & Sons.
- Lucia, M., Campos, A.M., Van den Berg, C.M.G., **1994**. Determination of copper complexation in seawater by cathodic stripping voltammetry and ligand competition with salicylaldehyde. *Analytica Chimica Acta* 284, 481-496.
- Ma, F., Jagner, D., Renman, L., **1997**. Mechanism for the electrochemical stripping reduction of the nickel and cobalt dimethylglyoxime complexes. *Analytical Chemistry* 69, 1782-1784.
- Mahajan, R.K., Walia, T.P.S., Sumanjit, Lobana, T.S., **2005**. The versatility of salicylaldehyde thiosemicarbazone in the determination of copper in blood using adsorptive stripping voltammetry. *Talanta* 67, 755-759.
- Pingarrón-Carrazón, J.M., Sánchez-Batanero, P., **1999**. *Química Electroanalítica Fundamentos y aplicaciones*. Madrid. Editorial Síntesis.
- Shams, E., Babaei, A., Soltaninezhad, M., **2004**. Simultaneous determination of copper, zinc and lead by adsorptive stripping voltammetry in the presence of Morin. *Analytica Chimica Acta* 501, 119-124.
- Silva, M., Valcárcel, M., **1980a**. Spectrophotometric determination of microgram amounts of calcium in waters and foods using diphenylglyoxal bis-(2-hydroxybenzoyl hydrazone). *Analyst* 105, 193-202.
- Silva, M., Valcárcel, M., **1980b**. Spectrophotometric determination of indium(III) traces with diphenyl bis-salicyloylhydrazone and dipyritydylglyoxal bis-salicyloylhydrazone. *An. Quim.* 76, 129-134.
- Sioda, R., Batley, G., Lund, W., Wang, J., Leach, S., **1986**. *Talanta* 33, 421.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., **2001**. *Principios de Análisis Instrumental*. 5ª Edición. Madrid. McGraw-Hill.
- Suciu, P., Vega, M., Roman, L., **2000**. Determination of cadmium by differential pulse adsorptive stripping voltammetry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 23, 99-106.
- Van den Berg, C.M.G., **1986**. Determination of copper, cadmium and lead in seawater by cathodic stripping voltammetry of complexes with 8-hydroxyquinoline. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 215, 111-121.
- Van den Berg, C.M.G., **1991**. Potentials and potentialities of cathodic stripping voltammetry of trace elements in natural waters. *Analytica Chimica Acta* 250, 265-276.
- Wang, J., 2006. *Analytical Electrochemistry 3th Edition*. New Jersey. Wiley-VCH. A John Wiley & Sons, Inc., Publication.
- Weltz, B., **1999**. Atomic absorption spectrometry — pregnant again after 45 years. *Spectrochimica Acta: Part. B: Atomic spectroscopy* 54 (14), 2081-2094.

Capítulo 2:

Desarrollo de una nueva metodología para análisis de Pb en agua de mar por AdCSV empleando el reactivo 2-APSH

Capítulo 2: Desarrollo de una nueva metodología para análisis de Pb en agua de mar por AdCSV empleando el reactivo 2-APSH

Resumen

En este capítulo se presenta un método de Voltamperometría de Redisolución Catódica Adsorptiva muy sensible para la determinación de Pb(II) a nivel nanomolar en aguas basado en la complejación con 2-acetilpiridina saliciloilhidrazona (2-APSH) seguido de la deposición adsorptiva sobre un electrodo de gota colgante de mercurio (HMDE). Los factores instrumentales y químicos fueron optimizados usando diseños exploratorios (Plackett–Burman) y secuenciales (Simplex). Bajo las condiciones óptimas (pH 5,6; $-0,552$ V como potencial de deposición; $0,0083$ V para el salto de potencial y $0,87$ s para el intervalo de tiempo del salto de potencial) se obtuvo un límite de detección de $0,17$ nM y una desviación estándar relativa de $1,20$ % para cinco medidas de una muestra con $17,3$ nM de plomo. La respuesta voltamétrica crece linealmente con la concentración de metal desde $2,4$ hasta 145 nM. El método no presenta interferencias ni de sales inorgánicas ni de trazas de otros metales normalmente presentes en agua de mar. El método propuesto se validó satisfactoriamente empleando una muestra de referencia certificada de agua de estuario (LGC 6016), obteniendo un error relativo de $-2,15$ % y se aplicó a muestras reales de agua de mar con errores relativos de $-4,40$ % y $+1,84$ %.

2.1. Introducción

Como se ha comentado anteriormente, el plomo se encuentra dentro de los metales considerados como extremadamente peligrosos para la vida tratándose del metal tóxico más extendido, por su presencia en casi todos los compartimentos ambientales. Las principales fuentes de ingreso del plomo al organismo son el aire inhalado, los alimentos y el agua de bebida [Moore, 1985]. Una intoxicación crónica de plomo y sus derivados produce el saturnismo, cuyos efectos son aliento fétido, anemia intensa, alteraciones digestivas y la aparición característica del ribete de Burton, de color gris azulado en el borde de las encías [Moore, 1986]. Es de destacar que este metal afecta tanto al desarrollo físico como mental en niños.

En los últimos años se han realizado numerosas investigaciones dirigidas al desarrollo de nuevos métodos analíticos para la determinación de plomo mediante AdCSV con electrodo HMDE empleando diferentes ligandos, siendo los más destacados los que se detallan a continuación y en la comparativa de métodos al final de este capítulo (tabla 2.29).

Constant M.G. Van den Berg, ya en 1986 [Van den Berg, 1986] presentó uno de los primeros métodos para la determinación simultánea de Pb y otros metales empleando voltamperometría de redisolución catódica diferencial de impulso, aportando ventajas con respecto a la ASV en cuanto a sensibilidad se refiere al incluir la etapa de deposición del complejo en la gota. El ligando orgánico empleado en este método fue la 8-hidroxiquinolina (oxina), reactivo común ampliamente usado como agente quelatante. Cabe destacar su aplicabilidad a muestras de agua de mar y la posibilidad de análisis simultáneos de Pb, Cd y Cu.

Años más tarde, Wang y col., emplearon o-cresolftalexón como ligando orgánico para la formación del complejo con Pb [Wang, 1993]. Este método ofrecía una atractiva alternativa a los métodos convencionales de redisolución para la determinación de Pb de una manera muy selectiva, ya que no se veía afectado por la presencia de grandes cantidades de Tl, Sn o Cu. El tipo de muestras de agua al que fue aplicado era agua de bebida.

Qingguo Wu y col., en 1995 [Wu, 1995] estudiaron la aplicación de otro reactivo común como naranja de xilenol en la determinación de Pb por AdCSV. Estos investigadores desarrollaron así un nuevo método para la determinación de Pb en agua de mar a niveles nanomolares.

En ese mismo año, Yokoi y colaboradores determinaron Pb mediante AdCSV mediante la complejación entre este metal y calceína azul [Yokoi, 1995]. En este caso, la aplicación del método se evaluó de manera satisfactoria empleando aguas de río, agua mineral y agua potable.

Colombo y col., [Colombo, 1997] presentaron entre otros, un método para la determinación simultánea de metales pesados como el Cu, Cd, Ni y Pb en agua de mar, empleando la mezcla de ligandos dimetilglioxima y oxina. Con este método se empezaron a reducir los tiempos de análisis y los volúmenes de muestra, además aportaron la ventaja adicional de realizar análisis simultáneos.

En 2001, Fischer y col., [Fischer, 2001] estudiaron la competición de ligandos usando calceína azul para la determinación de Pb en agua de lago mediante AdCSV. Parámetros analíticos como el rango lineal de calibración y el límite de detección fueron calculados, los cuales se presentan en la tabla 2.29.

Ensafi y col., describieron un método simple, sensible y selectivo para la determinación de Pb a niveles de concentración muy bajos empleando electrodo HMDE [Ensafi, 2003]. El ligando orgánico usado en este caso fue rojo de pirogalol (PGR) y su aplicación fue estudiada en aguas de río y potable. El efecto de parámetros instrumentales como el potencial de deposición y parámetros químicos como el pH, concentración de PGR y la interacción de estos parámetros fue estudiado mediante diseño factorial.

Con el fin de desarrollar un método alternativo para el análisis simultáneo de Cu, Zn y Pb, Shams y col., presentaron en 2004 un método por AdCSV y electrodo HMDE empleando morina como ligando orgánico quelatante [Shams, 2004]. El método propuesto fue aplicado de manera satisfactoria para la determinación simultánea de estos tres metales en muestras de agua de potable.

En el 2006 Ensafi y col., [Ensafi, 2006] desarrollaron un método para la determinación de Pb junto con Cd y Cu empleando naranja de xilenol como ligando orgánico para la acumulación del complejo en la etapa de deposición. Debido a efectos intermetálicos entre dichos metales, la optimización de las variables químicas e instrumentales se realizó mediante el uso de redes neuronales (ANN) ya que se trata de un modelo capaz de trabajar con sistemas no lineales. Fue aplicado de manera satisfactoria en muestras de agua de río y potable.

El método para la determinación de Pb por AdCSV más reciente que se ha encontrado es el publicado por Arancibia y col., en 2009 [Arancibia, 2009] que emplea morina-5'-ácido sulfónico como ligando quelatante. Este método propone el uso de un tensioactivo, el dodecil sulfato sódico, para la mejora de la sensibilidad del método. El grupo sulfónico lo que hace es contribuir a la carga negativa del complejo favoreciendo así la adsorción del mismo sobre el electrodo. Este sistema fue aplicado a muestras de agua de mar y agua potable.

Sin embargo, tras un estudio exhaustivo de estos métodos, cabe destacar la necesidad de métodos que aporten ventajas de una manera simultánea, es decir, en la mayoría de los casos existe alguna limitación en el método, bien la sensibilidad, bien el intervalo de aplicación o bien el que no se haya demostrado su aplicabilidad al análisis en agua de mar. Se hace por tanto necesario buscar nuevos reactivos orgánicos con una alta capacidad complejante que permitan el desarrollo de nuevos métodos por AdCSV con una mayor sensibilidad y selectividad.

En este sentido, las hidrazonas tienen interesantes propiedades que las hacen apropiadas para su aplicación como ligandos complejantes en la determinación de metales mediante esta técnica. Además de sus conocidas propiedades en medicina [Shyam, 1985; Mohan, 1988] y analíticas [Katyal, 1975; Singh, 1982], también han sido utilizadas, especialmente las aroilhidrazonas, como complejantes para la determinación espectrofotométrica de metales, tanto en disolución acuotética [Gallego, 1978; Gallego, 1979a; Gallego, 1979b; García-Vargas, 1980; Silva, 1980a; Silva, 1980b; García-Vargas, 1981], como en medios orgánicos inmiscibles con el agua, mediante la extracción líquido-líquido [García-Vargas, 1984]. Asimismo, también se ha estudiado el comportamiento electroquímico de algunas aroilhidrazonas, las cuales mostraron interesantes

propiedades potenciales para la determinación de metales por voltamperometría [García-Vargas, 1987; Hidalgo, 1991; Kamal, 1992].

De esta forma, en este capítulo se desarrolla una nueva metodología para el análisis de plomo empleando la saliciloilhidrazona de la 2-acetilpiridina (2-APSH) como agente quelatante, la cual aporta numerosas ventajas a la determinación por AdCSV, tales como: bajo límite de detección, amplio rango lineal de aplicación y aplicable a muestras de agua salinas.

2.2. Saliciloilhidrazona de la 2-acetilpiridina (2-APSH)

2.2.1. Estudios previos

Para comenzar estos estudios, se exploró la capacidad de producir señales electroquímicas por AdCSV entre varios ligandos de la familia de las aroilhidrazonas y el plomo por su interés como contaminante. Como estos reactivos suelen tener baja solubilidad en agua, fueron previamente disueltos en etanol y adicionados a la celda electroquímica conteniendo el metal en disolución acuosa.

Se realizaron diversas pruebas con los reactivos: *2-hidroxibenzaldehído saliciloilhidrazona (2-HBSH)*, *o-vanillina benzoilhidrazona (VBH)*, *2-hidroxibenzaldehído semicarbazona (2HBS)*, *o-vanillina feniltiosemicarbazona (VFT)*, *2-acetilpiridina benzoilhidrazona (2-APBH)*, *2-acetilpiridina saliciloilhidrazona (2-APSH)*, en medio ligeramente ácido (pH 4,5). De estos estudios previos se obtuvieron resultados prometedores para la *2-HBSH* y la *2-APSH* (ver tabla 2.1). Ambos reactivos mostraron una señal voltamperométrica durante su reducción y cuando se adicionó plomo a la disolución se produjo una nueva señal correspondiente a la reducción del metal.

En las condiciones previas estudiadas, se obtuvo una mejor señal utilizando la *2-APSH*, por lo que se decidió continuar los siguientes estudios con este reactivo.

Tabla 2.1. Resultados iniciales obtenidos con 2-HBSH y 2-APSH a pH 4,5

Reactivos	2-HBSH	2-APSH
Potencial de medida del complejo (Pb-R)	-360 mV	-500 mV
Potencial de medida del reactivo (R)	-950 mV	-700 mV
Δ Potencial entre la señal del complejo y del reactivo	590 mV	200 mV
Intensidad para 4 ppb de Pb	0,87 nA	5 nA

2.2.2. Características de la 2-APSH

La saliciloilhidrazona de la 2-acetilpiridina (2-APSH) es una sustancia que estructuralmente pertenece al grupo de las *aroihidrazonas*, las cuales han sido empleadas entre otros usos como reactivos analíticos para la determinación de trazas de iones metálicos. Estos compuestos son de gran interés debido a su importante versatilidad como agente quelatante y por su tendencia a producir estequiometrías de alto número de coordinación.

En general, las *hidrazonas* se caracterizan por la presencia de un grupo imino enlazado a través de su nitrógeno imínico a otro átomo de nitrógeno (amínico), el cual a su vez puede presentar sustituciones de diversa naturaleza. En aquellos casos en los que la sustitución R₃ y/o R₄ es por grupos aromáticos, reciben el nombre de *aroihidrazonas* (ver apartado 1.8.1).

El interés por la 2-APSH como ligando orgánico para su aplicación en la determinación de metales mediante AdCSV está basado en las interesantes perspectivas como agente complejante de diversos iones metálicos. En este sentido, García-Vargas y col., [García-Vargas, 1987] han estudiado sus propiedades espectrales y metalocrómicas e Hidalgo y col., [Hidalgo, 1991] estudiaron sus características electroquímicas polarográficas (DCP, DP y ACP).

Como se puede apreciar en la figura 2.1 los sustituyentes que determinan la estructura de la 2-APSH son R₁: -CH₃, R₂: -C₅H₄N (grupo piridilo), R₃: -H y R₄: -C₇H₅O₂ (grupo saliciloilo). Entre los distintos isómeros que puede presentar este compuesto, destacan sus isómeros 3-APSH y 4-APSH, los cuales difieren en la posición del N en el anillo piridínico. Esta disposición de los isómeros determina las distintas propiedades tanto espectroscópicas como electroquímicas. De los tres isómeros, la posición en *orto* del N piridínico hace que la 2-APSH presente mejores

características como ligando de metales pesados que los otros dos isómeros *meta* y *para* [García-Vargas, 1987].

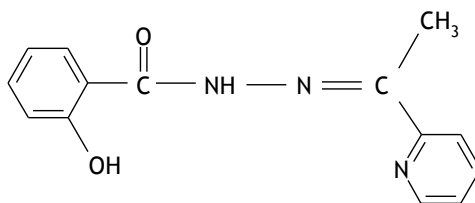


Figura 2.1. Estructura de la saliciloilhidrazona de la 2-acetilpiridina (2-APSH)

Como se muestra en la figura 2.2, otra característica de este compuesto es la existencia de un equilibrio tautomérico ceto-enólico a causa de la migración del hidrógeno entre el nitrógeno amínico y el oxígeno cetónico.

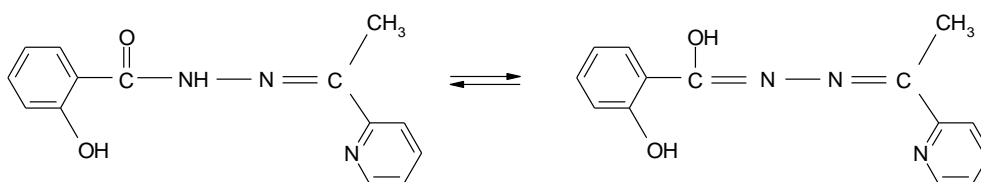


Figura 2.2. Equilibrio tautomérico en 2-APSH

La existencia del grupo funcional carbonilo junto al N imínico es responsable de su comportamiento como ligando bidentado para los iones metálicos, dando lugar a estructuras de coordinación en forma de anillo de cinco miembros a través del átomo de O del grupo carbonilo (o del grupo enólico) y el átomo de N imínico. Sin embargo, esta aroilhidrazona puede comportarse también como ligando tridentado, debido a la presencia de un grupo donador (N piridínico) en uno de los sustituyentes del C imínico, en una posición adecuada para cerrar también un anillo de cinco miembros con el ión metálico (Ver fig. 2.3).

En general, las relaciones estequiométricas metal-ligando comprobadas avalan estos tipos de coordinación, en cuanto a sus relaciones estequiométricas [García-Vargas, 1987], como en el caso del Fe(II) cuya estequiometría es 1:3 para el complejo Fe(II)-2-APSH y la naturaleza neutra del mismo. En consecuencia, la posición *orto* del N piridínico en 2-APSH influye significativamente en su capacidad de quelatación de los metales, en comparación con sus isómeros

3-APSH y 4-APSH. Además, esto se demuestra por el mayor número de iones metálicos con los que forma complejos metálicos coloreados en disoluciones acuoetanólicas tamponadas con V(V), Fe(III), Pd(II), Ga(III), Pb(II) y Bi(III) y en medio clorofórmico con Ni(II), Co(II), Cu(II) y Cd(II) [García-Vargas, 1987].

Respecto a sus propiedades electroquímicas, los estudios polarográficos de la 2-APSH han mostrado la existencia de picos bien definidos adecuados para propósitos analíticos cuyo potencial cambia con el pH, lo que indica la implicación de H⁺ en los procesos de reducción [Hidalgo, 1991].

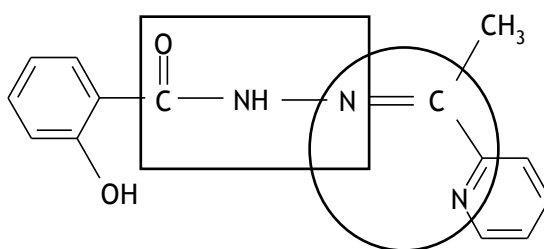


Figura 2.3. Grupos funcionales de la molécula 2-APSH

El estudio de pH realizado por Hidalgo y col. para la 2-APSH muestra cuatro picos de reducción, de los cuales los tres primeros claramente dependen del pH mientras que para el cuarto pico la dependencia con el pH no está claramente evidenciada y es a menudo confundido con la señal de fondo (tabla 2.2).

Tabla 2.2. Variación del potencial de pico para $3,4 \times 10^{-4}$ M de 2-APSH en función del pH en medio etanol-agua (40%)

pH	1ª onda	2ª onda	3ª onda	4ª onda
4,5	0,15	0,70	1,26	-
5,0	0,17	0,71	1,31	1,65
5,5	0,27	0,75	1,35	-
6,0	0,30	0,83	1,43	-
6,5	0,41	0,83	-	1,65
7,0	0,38	0,91	-	1,74
8,0	0,36	1,05	-	1,74
9,0	-	1,18	-	1,76

La primera onda de 2-APSH puede corresponder a la reducción del grupo = N – N - por 2 electrones y 2 protones, dando lugar a la ruptura del enlace y a la formación de las correspondientes amida e imina. La segunda y tercera onda corresponde probablemente a la reducción de los grupos imino y amido, estando involucrados un electrón y un protón en cada una. Este fenómeno electroquímico puede resultar un inconveniente importante en la aplicabilidad del compuesto a la determinación de metales, mediante complejación y determinación por AdCSV, puesto que las señales voltamperométricas del ligando pueden superponerse a las del complejo metálico, llegando a interferir en la determinación del analito. No obstante, esta dificultad puede superarse en aquellos casos en los que el complejo metálico sufra el proceso de reducción a un potencial suficientemente distinguible de los que presente la aroilhidrazona.

Puesto que el pH ejerce una influencia primordial en los procesos redox que tienen lugar en la 2-APSH y, por tanto, afecta a la localización de las señales voltamperométricas en los barridos de reducción de DP, se han llevado a cabo una serie de experimentos cuyo objetivo ha sido la determinación de los potenciales a los que aparecen las señales voltamétricas del compuesto en el barrido de reducción en DP-AdCSV en función del pH del medio.

Como se muestra en la figura 2.4, el ligando exhibe diversos picos de reducción a medida que se realiza el barrido voltamperométrico y, también, estas señales experimentan un cambio en el potencial de pico con el pH del medio.

Así, se observa un desplazamiento hacia valores de potencial más negativos conforme aumenta el pH. No obstante, también se puede apreciar que dicha señal sufre una disminución paulatina de la i_p con el incremento de pH, siendo dicha señal prácticamente inapreciable a partir de pH 9,8.

En consecuencia, esta potencial interferencia del pico principal de la 2-APSH sobre el pico correspondiente del complejo metálico, podría evitarse o al menos minimizarse si se selecciona un intervalo de pH apropiado, el cual debe cumplir el requisito de ser adecuado para la formación del complejo entre el metal y el ligando. En el caso de la saliciloidhidrazona, el desplazamiento del pico de mayor intensidad hacia valores más negativos a medida que crece el pH, permite obtener un intervalo de potenciales en el que no aparecen picos del ligando (Figura 2.5). Esto evita las interferencias por solapamiento con los de aquellos complejos

metal-2-APSH cuya reducción tenga lugar a un valor de potencial situado dentro de este intervalo.

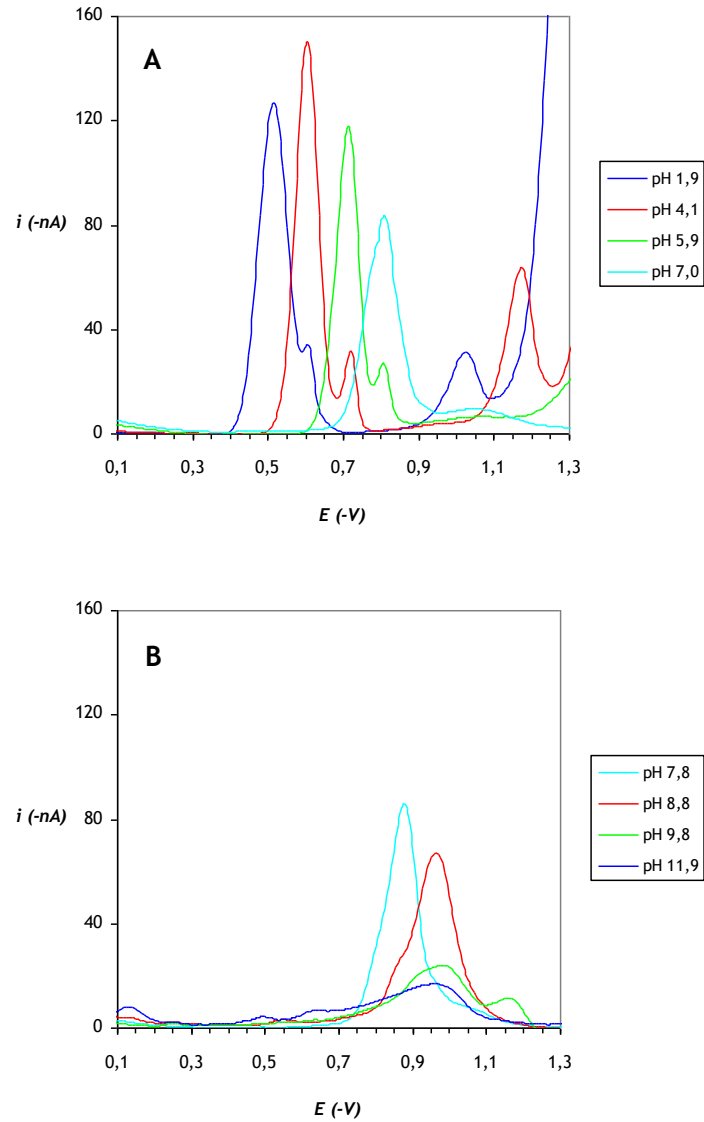


Figura 2.4. Superposición de voltamperogramas correspondientes a disoluciones de 2-APSH a diferentes valores de pH: (A) ácido y neutro, (B) alcalino. Disoluciones: disolución reguladora Britton-Robinson al 10% v/v y $9 \cdot 10^{-6}$ M 2-APSH. Parámetros instrumentales: DP-AdCSV; E_d , -0,05 V; t_d , 60 s; tamaño de gota, 6 u.a.; P, -50 mV; U_s , 6 mV y velocidad de barrido, $30 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$

Como puede verse en figura 2.5, puesto que el margen máximo se alcanza a pH 8,8, la determinación de los metales cuyos potenciales redox se encuentren a valores superiores a -0,8 V no estaría condicionada, en principio, por el solapamiento del pico de 2-APSH, siempre y cuando esta zona de pH fuese adecuada para la formación del complejo.

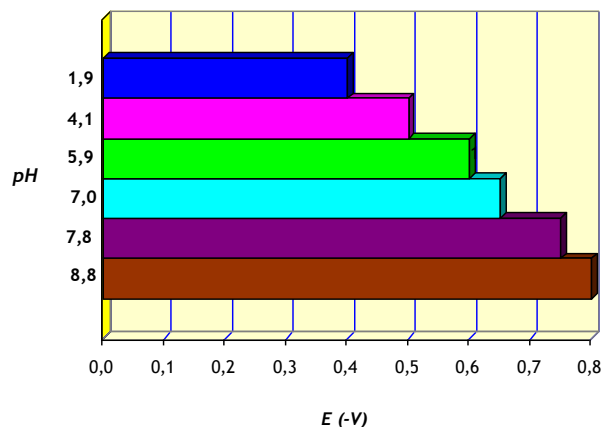


Figura 2.5. Intervalos de potenciales en los que las señales de 2-APSH no producirían interferencia por solapamiento con la señal del metal-ligando

Así, metales como Pb(II), Cd(II), Cu(II) o Bi(III) no encontrarían esta limitación, mientras que Co(II), Ni(II), V(V), Zn(II), Fe(II) y Fe(III), serían más susceptibles de sufrir solapamiento (ver tabla 2.3).

Tabla 2.3 Potenciales de semionda ($E_{1/2}$), respecto a Ag/AgCl, para varios metales en disoluciones con distintos tipos de electrolitos (acetato, salino y ácido)

Metal	2 M CH ₃ COOH/ 2 M CH ₃ COONH ₄	1 M KCl	1 M HCl
Pb(II)	-0,46	-0,40	-0,40
Cd(II)	-0,62	-0,61	-0,60
Co(II)	-	-1,37	-
Cu(II)	-0,24	-0,17	-0,19
Ni(II)	-1,08	-1,02	-
V(V)	-	-1,09	-1,10
Bi(III)	-0,20	-0,05	-0,06
Zn(II)	-1,04	-0,98	-0,98
Fe(III)	-	-1,41	-
Fe(II)	-	-1,56	-

No obstante, hay que indicar que pueden existir otras variables que afecten al proceso electroquímico que pueden alterar la distribución de picos y, por tanto, hacer factible o no la determinación del metal.

2.2.3. Estequiometría del complejo Pb(II)-2-APSH mediante espectrofotometría de absorción molecular UV-Vis

Antes de continuar con los estudios electroquímicos y con objeto de conocer la composición del complejo de plomo se realizó el estudio de su estequiometría. Para ello, se emplearon dos métodos: el método de las variaciones continuas [Kirkbright, 1965; Job, 1928] y el método de la relación molar [Skoog, 2005; Yoe, 1944], a través de mediciones por espectrofotometría UV-VIS.

En primer lugar, se determinó la longitud de onda de máxima absorción para el complejo en disolución acuoetanólica. Para ello, en un matraz de 10 mL se preparó una disolución conteniendo: 1 mL de tampón hidrógeno ftalato de potasio a pH 5,6, 1 mL de 2-APSH 10^{-4} M, 0,186 mL de Pb $5 \cdot 10^{-4}$ M y se realizó el espectro de absorción (figura 2.6).

A partir de los resultados obtenidos se seleccionó 364 nm como longitud de onda de máxima absorción.

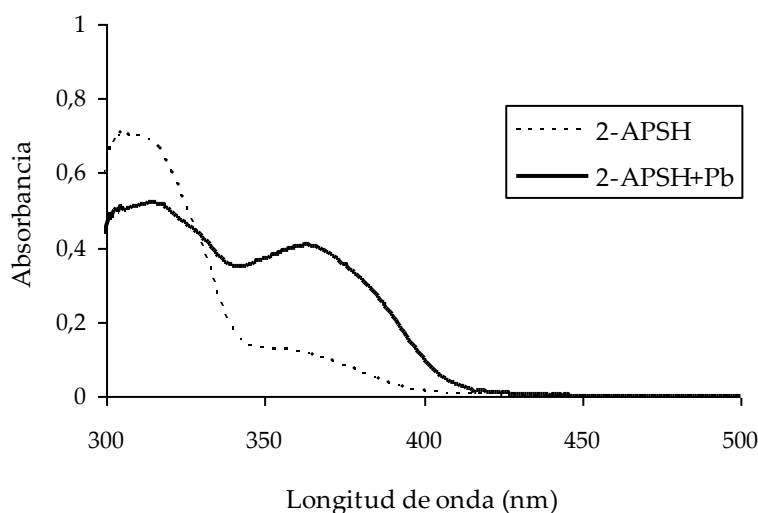


Figura 2.6. Espectro de absorción UV-Vis de la disolución acuoetanólica de Pb-2-APSH

Una vez establecida la longitud de onda de medida ($\lambda=364$ nm) se pasó a aplicar en primer lugar el *método de la relación molar*, el cual consiste en la medición de la señal espectrofotométrica del complejo metal-ligando en una serie de disoluciones en las que se mantiene constante la concentración analítica de uno de los reactivos, mientras que se varía la del otro [Skoog, 2005]. En este estudio, se mantuvo constante la concentración de reactivo, la 2-APSH y se fue incrementando la concentración de plomo.

En segundo lugar y para confirmar el resultado obtenido por el método anterior, se aplicó el *método de las variaciones continuas*. En líneas generales, este método consiste en la medición de la señal espectrofotométrica del complejo metal-ligando en una serie de disoluciones en las que las proporciones de sus concentraciones respectivas se ajusten gradualmente desde una disolución que contenga únicamente ligando hasta una disolución que contenga sólo metal [Kirkbright, 1965].

En ambos casos, el blanco se preparó añadiendo las mismas especies excepto el metal y el reactivo.

En las tablas 2.4 y 2.5 se recoge la composición de cada una de las disoluciones empleadas para la determinación de la estequiometría del complejo Pb-2-APSH por ambos métodos, además de la proporción de Pb (fracción molar o relación molar).

Tabla 2.4. Composición de las disoluciones empleadas en la determinación de la estequiometría del complejo Pb-2-APSH por el método de la relación molar a pH 5,6

Muestras	1	2	3	4	5	6	7	8
Tampón Britton-Robinson	3	3	3	3	3	3	3	3
Pb(II) 10⁻³M	0,25	0,50	0,75	1	1,25	1,50	1,75	2
2-APSH 10⁻³M	1	1	1	1	1	1	1	1
Agua	1,75	1,50	1,25	1	0,75	0,50	0,25	0
Relación molar Pb/2-APSH	0,25	0,5	0,75	1	1,25	1,5	1,75	2

Los volúmenes están expresados en mL y el reactivo se ha disuelto en etanol

Tabla 2.5. Composición de las disoluciones empleadas en la determinación de la estequiometría del complejo Pb-2-APSH por el método de las variaciones continuas a pH 5,6

Muestras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tampón B-R	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Pb(II) 10⁻³M	0	0,063	0,125	0,188	0,250	0,313	0,375	0,500	0,625	0,750	0,875	1
2-APSH 10⁻³M	1	0,937	0,875	0,812	0,75	0,687	0,625	0,5	0,375	0,25	0,125	0
Agua	1	0,937	0,875	0,812	0,75	0,687	0,625	0,5	0,375	0,25	0,125	0
Etanol	0	0,063	0,125	0,188	0,250	0,313	0,375	0,500	0,625	0,750	0,875	1
X_{Pb}	0	0,063	0,125	0,188	0,250	0,313	0,375	0,500	0,625	0,750	0,875	1

Los volúmenes están expresados en mL y el reactivo se ha disuelto en etanol

El resultado del método de la relación molar se muestra en la figura 2.7. Como se puede apreciar, el cruce de las dos líneas que se obtienen por regresión lineal de los puntos delimita un punto de corte que corresponde a un valor de 1 para la relación molar en la que se encuentran el metal y el ligando en el complejo (mol Pb/mol reactivo = 1).

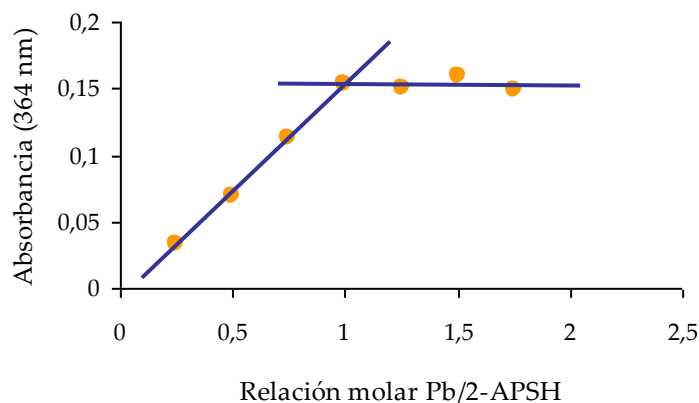


Figura 2.7. Aplicación del método de la relación molar en el cálculo de la estequiometría de Pb-2-APSH

Para el método de las variaciones continuas, el corte de las dos líneas mostró la fracción molar X_{Pb} característica del complejo ($X_{Pb} = 0,5$).

Por tanto, por ambos métodos, se obtuvieron idénticos resultados demostrando que la estequiometría del complejo era 1:1.

2.3. Estrategia de diseño del método de análisis de Pb por AdCSV

A la hora de establecer un método analítico, es de gran importancia elegir un procedimiento adecuado, especialmente cuando se trata del estudio de nuevas metodologías de análisis, en las que es necesario tener en cuenta un número considerable de parámetros, ya sean instrumentales, químicos o de otra índole. Así, la finalidad de cualquier optimización es descubrir las condiciones que producen mejor respuesta [Montgomery, 2001].

Las estrategias más habituales para el desarrollo de nuevos métodos de AdCSV se han basado en estudios univariantes, prestando especial atención a la influencia del pH y a los parámetros característicos de deposición (potencial y tiempo). Aunque, este tipo de actuación resulta útil para describir las pautas generales de comportamiento de las señales voltamperométricas, no obstante, se puede alcanzar un conocimiento más riguroso usando los diseños de experimentos. Además, éstos ofrecen información sobre las relaciones entre las variables, la optimización multivariante de las respuestas seleccionadas y un menor número de experimentos [Domínguez, 1999]. Además, permite la realización de modificaciones sobre la marcha según las condiciones experimentales con objeto de adaptarlas a nuevas muestras y/o situaciones, lo cual es bastante frecuente en los estudios medioambientales y de gran importancia en los estudios de especiación.

En consecuencia, los estudios realizados se han desarrollado en base a una estrategia en tres etapas, realizando:

a) Experimentos preliminares sobre ciertas variables con la finalidad de adquirir información sobre las mismas y establecer los intervalos entre cuyos valores han sido posteriormente estudiadas.

b) Aplicación de un diseño simultáneo exploratorio Plackett-Burman para seleccionar las variables más significativas.

c) Por último, se ha aplicado un diseño secuencial (Simplex Modificado) para establecer los valores óptimos de las variables que tienen influencia destacada en la respuesta voltamperométrica.

2.3.1. Estudios preliminares

Un aspecto de gran importancia en la optimización mediante diseño de experimentos es la adecuada elección de las variables (*variables de diseño*), así como de sus intervalos. De ahí que resulte de gran utilidad disponer previamente de información suficiente sobre ellas.

Así, los estudios previos constituyen una fuente de información inicial del comportamiento de las variables en el proceso. Además sirven para establecer los rangos iniciales en los que serán estudiadas con el diseño, sobre todo para aquellos valores que no vienen determinados por limitaciones propias del sistema.

De esta forma, se llevaron a cabo una serie de experimentos preliminares para conocer en líneas generales el comportamiento electroquímico del complejo Pb-2-APSH. El procedimiento de medida se realizó preparando una disolución conteniendo 500 μL de 2-APSH $2 \cdot 10^{-4}$ M disuelto en etanol, 2000 μL de disolución reguladora Britton-Robinson 1,5 M y 50 μL de Pb $9,6 \cdot 10^{-6}$ M, completando hasta 25 mL con agua Milli-Q. A continuación, se pasó nitrógeno por la muestra, siendo las restantes condiciones del análisis las que se muestran en la tabla 2.6.

En esta tabla también se muestran el tipo de electrodo de trabajo, modo de trabajo y tipo de calibración usado, así como las concentraciones de las distintas especies empleadas a lo largo del capítulo. También se presentan el resto de parámetros instrumentales los cuales se han fijado teniendo en cuenta los resultados experimentales previos realizados.

Tabla 2.6. Condiciones y variables instrumentales utilizadas en los estudios de optimización para Pb con 2-APSH

Restantes condiciones de análisis	
Electrodo de trabajo	HMDE
Modo	DP
Calibración	Adición estándar
t_p : Tiempo de impulso (s)	0,04
Tamaño de gota (u.a.)	9
Velocidad de agitación (rpm)	2000
Concentración de disolución reguladora (M)	0,12 (Britton-Robinson) 0,08 (Acetato amónico)
Concentración de Pb	$1,9 \cdot 10^{-8} \text{ M} = 4 \text{ ppb}$
Concentración de 2-APSH (M)	$(0,5-50) \cdot 10^{-6}$
Volumen de muestra (mL)	25

HMDE: Electrodo de gota colgante de mercurio; DP: Impulso diferencial

A continuación, en la tabla 2.7 se muestran las distintas variables que pueden afectar de forma más significativa o desconocida al sistema así como los valores iniciales obtenidos de estas experiencias previas, los cuales van a servir para el siguiente diseño.

Tabla 2.7. Variables seleccionadas para su estudio por AdCSV y valores iniciales obtenidos de experiencias previas

Variable	Valor
pH	7
E_d : Potencial de deposición (V)	-0,35
t_d : Tiempo de deposición (s)	90
P: Amplitud de impulso (V)	-0,07
U_s : Salto de potencial (V)	0,008
t_s : Intervalo de tiempo para el salto de potencial (s)	0,6

2.3.2. Diseño exploratorio Plackett-Burman

Al principio el número de variables de diseño potencialmente interesantes puede ser relativamente elevado. Un tipo de diseño de experimentos particularmente útil que aporta información sobre los principales efectos de las variables, con el menor número de experimentos posible, son los diseños de Plackett y Burman [Plackett, 1946]. Este tipo de diseño no tiene en cuenta las interacciones entre variables, de ahí que se empleen como primera etapa de la optimización.

El objetivo fundamental de esta exploración es identificar aquellas variables más significativas de las que depende el sistema. Para ello, se diseñan experimentos de manera que permitan obtener estimaciones de los efectos de cada una de las variables en la respuesta. Las variables que muestren mayores efectos sobre la respuesta se considerarán como más relevantes para el sistema.

Los experimentos de los que consta un diseño se disponen formando la llamada *matriz de diseño*, en la cual se recogen todas las combinaciones de los niveles de las variables de diseño K .

Estos diseños con K variables pueden ejecutarse únicamente en aquellos casos en los que el número de experimentos N sea múltiplo de 4. Plackett y Burman proporcionaron las primeras filas de las matrices de diseño para valores de N desde 4 hasta 100 (excepto para $N=92$). La combinación de los valores de las variables de la primera fila para 7 variables de diseño es:

+ + + - + - -

A partir de esta fila se puede construir la totalidad de la matriz, cambiando la primera fila cíclicamente. De esta forma, para la construcción de la segunda fila de la matriz, se mueve el elemento de la última columna de la primera fila (-) hasta la posición de la primera columna de la segunda fila y se completa esta segunda fila con los elementos de la fila anterior, sin alterar su orden, comenzando por el elemento de la primera columna, y así sucesivamente. La última fila debe estar formada únicamente por signos negativos. Las filas del diseño se toman como experimentos y las columnas como variables. La matriz completa del diseño Plackett-Burman para $K=7$ y $N=8$ se muestra en la tabla 2.8.

Tabla 2.8. Matriz completa de diseño Plackett-Burman para K=7 y N=8

		K						
N	1	2	3	4	5	6	7	
1	+	+	+	-	+	-	-	
2	-	+	+	+	-	+	-	
3	-	-	+	+	+	-	+	
4	+	-	-	+	+	+	-	
5	-	+	-	-	+	+	+	
6	+	-	+	-	-	+	+	
7	+	+	-	+	-	-	+	
8	-	-	-	-	-	-	-	

Debido a que para la determinación de plomo por AdCSV mediante complejación con 2-APSH sólo se han establecido 6 variables de diseño (pH, potencial de deposición, tiempo de deposición, amplitud de impulso, salto de potencial e intervalo de tiempo para el salto de potencial), se requieren 6 columnas nada más, por lo que la última columna fue eliminada de la matriz de diseño final. Además, se realizaron tres experimentos más, como punto central, para evaluar la variabilidad de la medición, ya que de este modo es más adecuada la fijación del cambio de la variable respuesta por efecto de las variables de diseño y no por el ruido experimental.

Las variaciones de las variables de diseño suelen ajustarse a un intervalo definido por un nivel inferior y un nivel superior, pudiéndose también definir niveles intermedios. Los niveles son los valores que pueden adoptar las variables de diseño en el experimento, los cuales se codifican, asignando una nomenclatura para designar estos valores. La codificación empleada ha sido (-1, 0 y +1) para el nivel inferior, intermedio y superior, respectivamente.

De esta forma, en este trabajo se ha elaborado un diseño de 6 variables, cuya matriz codificada se ha realizado con 3 réplicas en el centro, produciendo un total de 11 experimentos (tabla 2.9) que fueron llevados a cabo por duplicado realizando a su vez dos medidas de cada duplicado. Hay que tener en cuenta que la matriz codificada con los valores -1, 0 y +1 es equivalente a sustituir los signos + y - por +1 y -1, respectivamente, en la matriz del diseño exploratorio (Tabla

2.8). A esta matriz se le ha adicionado un experimento central donde los valores codificados se designan como 0.

Tabla 2.9. Matriz de las variables del diseño Plackett-Burman con los valores codificados ($K = 6, N = 8 + \text{tres puntos centrales}$)

	pH	P	t _s	U _s	t _a	E _a
1	+1	+1	+1	-1	+1	-1
2	-1	+1	+1	+1	-1	+1
3	-1	-1	+1	+1	+1	-1
4	+1	-1	-1	+1	+1	+1
5	-1	+1	-1	-1	+1	+1
6	+1	-1	+1	-1	-1	+1
7	+1	+1	-1	+1	-1	-1
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1
9a	0	0	0	0	0	0
9b	0	0	0	0	0	0
9c	0	0	0	0	0	0

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos mediante los estudios preliminares, se decidió tomar aquéllos como valores centrales de cada uno de los intervalos de las variables. Así, en la tabla 2.10 se detallan los intervalos seleccionados para iniciar la optimización mediante el diseño Plackett-Burman.

Como variable de respuesta se empleó la intensidad del pico de Pb-2-APSH, ya que para cualquier procedimiento cuantitativo directo, la sensibilidad del método constituye un requisito esencial. Cada uno de los experimentos se realizó en el orden aleatorio proporcionado por el software para el diseño estadístico de Plackett-Burman. La tabla 2.11 recoge los valores de las variables de cada uno de los experimentos, así como el valor medio de la intensidad del pico de las réplicas de cada experimento del diseño.

Tabla 2.10. Niveles de las variables en el diseño de Plackett-Burman

Variables	Nivel inferior (-1)	Nivel intermedio (0)	Nivel superior (+1)
pH	6	7	8
E _d : Potencial de deposición (V)	-0,25	-0,35	0,45
t _a : Tiempo de deposición (s)	60	90	120
P: Amplitud de impulso (V)	-0,04	-0,07	-0,1
U _s : Salto de potencial (V)	0,004	0,008	0,012
t _s : Intervalo de tiempo para el salto de potencial (s)	0,2	0,6	1

Tabla 2.11. Valores de las variables e intensidades obtenidas para cada uno de los experimentos del diseño de Plackett-Burman

Expto	pH	P	t _s	U _s	t _a	E _d	Intensidad (nA)
9a	7	-0,07	0,6	0,008	90	-0,35	1,33
9c	7	-0,07	0,6	0,008	90	-0,35	0,92
4	8	-0,04	0,2	0,012	120	-0,45	3,81
7	8	-0,1	0,2	0,012	60	-0,25	---*
5	6	-0,1	0,2	0,004	120	-0,45	11,59
1	8	-0,1	1	0,004	120	-0,25	---*
8	6	-0,04	0,2	0,004	60	-0,25	2,76
3	6	-0,04	1	0,012	120	-0,25	2,11
2	6	-0,1	1	0,012	60	-0,45	5,63
9b	7	-0,07	0,6	0,008	90	-0,35	0,98
6	8	-0,04	1	0,004	60	-0,45	1,05

* No se produjo señal amperométrica

El análisis estadístico de los resultados del diseño de Plackett-Burman permitió estudiar los efectos de las variables seleccionadas sobre la variable de

respuesta, que se encuentran en la tabla 2.12. Se ha utilizado para los análisis estadísticos el programa *The Unscrambler* [The Unscrambler, 1998].

Tabla 2.12. Análisis de los efectos de las variables del diseño de Plackett-Burman

Variables	Análisis de los Efectos
pH	---
Amplitud de impulso (P)	+++
Intervalo de tiempo para el salto de potencial (t_s)	---
Salto de potencial (U_s)	--
Tiempo de deposición (t_d)	+++
Potencial de deposición (E_d)	+++

(NS): $p > 0,05$; (+): $0,05 > p > 0,01$; (++): $0,01 > p > 0,001$; (+++): $p < 0,001$

La simbología empleada hace referencia al intervalo de probabilidad (p) para cada una de las variables de diseño. En este sentido, cuanto menor sea el valor de p mayor será el número de signos + (efecto positivo) o - (efecto negativo), es decir, mayor será la influencia de la variable de diseño sobre la variable de respuesta; en el extremo opuesto está la influencia no significativa, NS. Así, para los valores de p : $> 0,05$; $0,05 - 0,01$; $0,01 - 0,001$ y $< 0,001$ se tienen, respectivamente, los siguientes tipos de efectos positivos (NS), (+), (++) y (+++) y negativos (NS), (-), (--) y (---). El efecto positivo o negativo de la probabilidad indica el sentido en el que la variable de diseño influye sobre la de respuesta.

El signo - indica que la variable ejerce una influencia negativa significativa sobre la intensidad. El signo + indica de forma contraria, que la intensidad se incrementa al crecer el valor de la variable. En el caso de que alguna variable no fuera significativa, se obtendría las letras NS (No significativo) en el análisis de los efectos, lo cual no ha ocurrido en este caso.

De los estudios realizados se dedujo que la amplitud de impulso, el tiempo de deposición y el potencial de deposición mostraron efectos significativos positivos sobre la señal del pico del complejo metálico con valor de $p < 0,001$. En el caso del tiempo de deposición por ejemplo, esto implica que al incrementar su

valor en el intervalo 60-120 s se observa un aumento en la intensidad del pico de Pb(II)-2-APSH, mejorando por tanto su sensibilidad. Lo mismo ocurre para el caso de la amplitud de impulso y del potencial de deposición.

Por el contrario, el pH e intervalo de tiempo para el salto de potencial mostraron efectos negativos con la misma significación; indicando que al disminuir su valor dentro del intervalo estudiado, se observa un aumento en la intensidad del pico de Pb(II)-2-APSH.

Por último, el salto de potencial presentó también un efecto negativo pero con un valor de p comprendido entre $0,001 < p < 0,01$, observándose un aumento de la intensidad del pico a medida que disminuye este parámetro.

A la vista de los resultados de este estudio, todas las variables eran significativas en mayor o menor medida en el sistema. No obstante, y para simplificar algo el estudio siguiente se estableció para la amplitud de impulso el valor máximo del equipo (-0,1 V), ya que el análisis de los efectos indicó que era adecuado que fuera el valor más elevado del intervalo estudiado. Igualmente, para el tiempo de deposición el estudio indicó que este valor debería ser alto, por lo que se decidió establecer un valor de 120 s, que era el valor más alto del intervalo estudiado. No se trató de aumentar el tiempo de deposición para no alargar demasiado el análisis. Ambas variables suelen utilizarse en voltamperometría con sus valores elevados, y en nuestro sistema en concreto también. Las restantes variables suelen tener una influencia más diversa, por lo que no fueron establecidas en esta etapa de la optimización.

2.3.3. Diseño secuencial Simplex Modificado

Los diseños de optimización secuenciales se usan cuando el analista tiene conocimientos limitados sobre la localización de la región óptima en la que se encuentra su sistema [Bayne, 1986]. Existen distintos tipos de diseño secuencial, siendo los más notables el diseño simplex y sus versiones modificadas, el diseño de pendiente ascendente y el diseño de optimización evolutivo. En este trabajo de investigación se optó por usar el diseño simplex modificado para el desarrollo de la metodología de análisis de Pb por AdCSV.

El simplex implica la identificación de los valores de las variables que dan lugar al óptimo de la respuesta deseada. Esto se alcanza por medio de una sucesión de ensayos en los que los valores de las variables se encuentran condicionados por los resultados del ensayo inmediatamente anterior. En contraste con un diseño factorial, el número de experimentos exigidos en el método simplex no crece rápidamente con el número de factores. Por esta razón, todos los factores que razonablemente pudieran pensarse que tienen relación con la respuesta deberían ser incluidos en la optimización [Miller, 2002].

Desde la introducción del diseño simplex en 1962 por Spendley y col., [Spendley, 1962] éste ha sido aplicado a muchos problemas químicos. La técnica se basa en la figura geométrica más simple posible, que es una línea en una dimensión, un triángulo en dos dimensiones, un tetraedro en tres dimensiones y una figura de $K + 1$ vértices en K dimensiones [Bayne, 1986]. Así pues, el simplex se visualiza como una figura geométrica definida por un número de puntos una unidad superior al número de variables a optimizar.

Una optimización simplex de un sistema que depende de K factores comienza con un diseño simplex inicial de $K + 1$ experimentos. Para crear los vértices iniciales es necesario elegir unos valores de variables de partida y un ancho de paso para cada una de las variables. Teniendo en cuenta estos valores elegidos se crea un simplex inicial.

Para moverse hacia el óptimo de la forma más rápida y eficaz posible se siguen una serie de reglas:

1. Se produce un nuevo simplex rechazando el peor o el mejor valor experimental, dependiendo de si se quiere maximizar o minimizar la respuesta, y sustituyendo éste por uno nuevo simétrico con respecto al centro de gravedad del simplex. Para calcular los valores de las variables del nuevo vértice se multiplica la media de los valores de los vértices que se mantienen por dos y al resultado se le resta el valor descartado. La aplicación gráfica de esta regla se muestra en la figura 2.8.

Cuando el nuevo punto tiene el peor valor del nuevo simplex, no se puede aplicar de nuevo la regla 1, ya que una nueva reflexión daría de nuevo el simplex anterior, produciéndose una oscilación entre los dos simplex. En este caso se aplica la regla número 2.

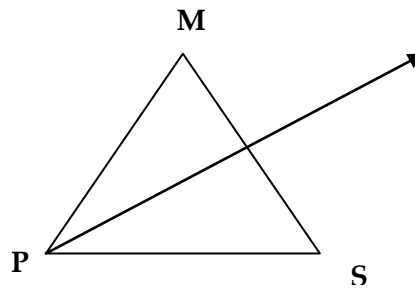


Figura 2.8. Reflexión del simplex (dos factores) en dirección opuesta al peor valor, siendo P la peor respuesta, M la mejor y S la segunda peor respuesta

2. Siempre que el nuevo vértice produzca una respuesta peor, el simplex avanza eliminando el segundo vértice con peor respuesta y obteniendo el nuevo simplex mediante la imagen especular ya explicada. El resultado es obtener un cambio de dirección en la progresión hacia el óptimo, lo que suele suceder en la zona próxima al mismo. La representación gráfica se muestra en la figura 2.9.

Si el punto obtenido está próximo al óptimo, los sucesivos simplex girarán en torno al óptimo.

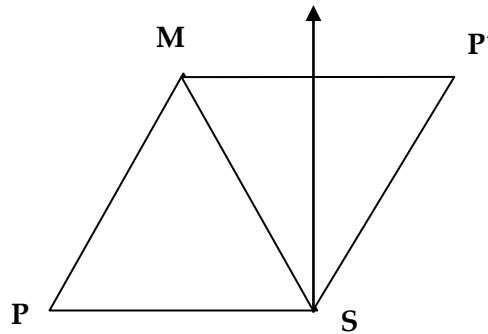


Figura 2.9. Cambio de dirección mediante el rechazo del segundo peor punto, siendo P' la peor respuesta, M la mejor y S la segunda peor respuesta, para un simplex de dos factores

3. Este método permite también sustituir viejos vértices. Si un vértice se mantiene durante $K+1$ simplex sin ser eliminado, se puede sustituir haciendo una repetición del mismo antes de continuar con la optimización. Esta regla evita que el sistema de los simplex se ancle en resultados falsos.

Estas reglas se aplican en un método simplex básico, pero el método simplex presenta diversas variantes, las cuales aceleran la aproximación hacia el

óptimo. En este trabajo de investigación se ha utilizado el Método del Simplex Modificado (MSM) introducido por Nelder y Mead en 1965 [Nelder, 1965]. Este método permite realizar, además de reflexiones, expansiones, contracciones y traslaciones del simplex.

En las figuras 2.10 y 2.11 se muestran los posibles movimientos a realizar. Se rige por las mismas reglas que el simplex básico, pero tiene reglas adicionales para saber qué operaciones usar [Bayne, 1986].

Los valores del primer vértice reflejado se construyen añadiendo al centroide (D) la distancia desde el peor valor (P) a dicho centroide. Este movimiento puede observarse en la figura 2.10.

$$R = D + (D - P) \quad (2.1)$$

Este método de reflexión es equivalente a la regla 1 del método básico antes mencionada.

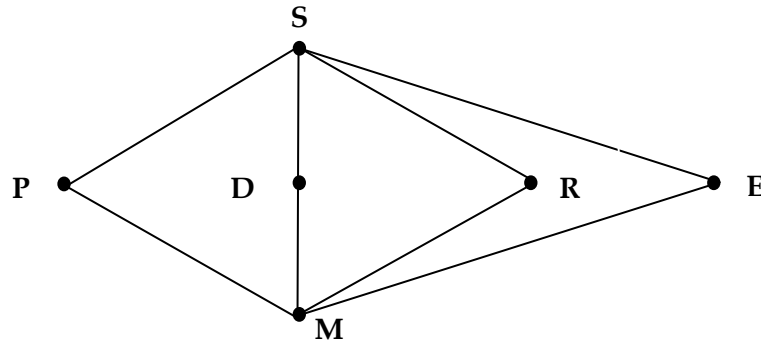


Figura 2.10. Reflexión (R) y expansión (E) del simplex modificado, siendo P la peor respuesta, M la mejor, S la segunda mejor y D el centroide

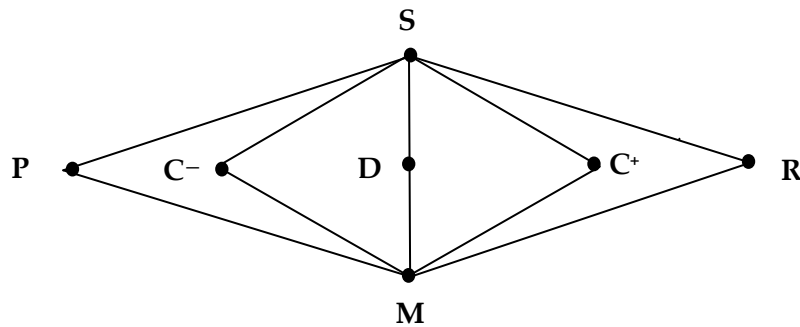


Figura 2.11. Contracción positiva (C+) o negativa (C-) en la optimización del simplex modificado, siendo P la peor respuesta, M la mejor, S la segunda peor, R la reflexión y D el centroide

Los diferentes movimientos del simplex modificado se calculan dependiendo del valor de la respuesta en el vértice reflejado (R) respecto al resto de vértices, según las siguientes reglas:

1. Si la respuesta en el vértice reflejado es mejor que la mejor obtenida anteriormente ($R > M$), el nuevo vértice se calcula mediante una expansión (E) (figura 2.10) siguiendo la ecuación:

$$E = D + a(D - P) \quad a > 1 \quad (2.2)$$

El valor de "a" suele ser 2, pero puede ser modificado dependiendo de la situación.

2. Si la respuesta en el vértice reflejado se encuentra entre el mejor valor y el segundo peor valor ($S < R < M$), el nuevo vértice se calcula mediante una reflexión.

3. Si la respuesta en el vértice reflejado es peor que el segundo peor valor obtenido anteriormente ($R < S$), el nuevo vértice se calcula mediante una contracción, existiendo dos posibles situaciones: que se produzca una contracción negativa (C^-) o que se produzca una contracción positiva (C^+). En ambos casos debe restarse o sumarse al centroide la distancia ($D - P$), respectivamente. Estos movimientos pueden apreciarse en la figura 2.11.

a) Si $R > P$, se realiza una contracción positiva y el nuevo simplex será MSC^+

$$C^+ = D + b(D - P) \quad 0 < b < 1 \quad (2.3)$$

normalmente b vale 0,5.

b) Si $R < P$, se realiza una contracción negativa y el nuevo simplex es MSC^-

$$C^- = D - b(D - P) \quad 0 < b < 1 \quad (2.4)$$

normalmente b vale 0,5.

De este modo, a medida que se van calculando los nuevos vértices del simplex se aproxima al valor óptimo haciéndolo en este caso con mayor flexibilidad. Inicialmente el simplex es grande y proporciona un progreso rápido hacia el óptimo, y se contrae empleando tamaños de paso más pequeños cuando se encuentra cerca del mismo.

Para decidir cuándo hay que parar el simplex, es decir, cuándo se ha alcanzado el óptimo, pueden aplicarse diversos criterios basados en diferentes principios:

1) *Que el número de experimentos sea excesivo*: Antes de comenzar el análisis se puede prefijar un número máximo de experimentos teniendo en cuenta aspectos de tiempo, esfuerzo y dinero invertidos en el análisis.

2) *Que la distancia entre los vértices sea demasiado pequeña*: A medida que el simplex avanza acercándose al óptimo, los pasos para calcular el siguiente simplex son más y más pequeños. Se puede establecer previamente que el simplex pare cuando ese paso llegue a un valor mínimo.

3) *Que la varianza de respuesta sea demasiado pequeña*: Este último criterio ha sido el empleado en este trabajo de investigación, ya que es el más fiable, al ser el más fácilmente cuantificable. Este criterio se basa en la comparación de la varianza de la respuesta (varianza del simplex) con la varianza propia del método, la cual debe ser previamente establecida.

Con ambas varianzas se calcula el valor de la distribución F, el cual viene dado por el cociente entre la varianza del simplex y la varianza del método. Este valor calculado se compara con el valor tabulado para la misma distribución.

La optimización se considera concluida cuando el valor calculado sea menor que el tabulado. El valor tabulado es función de los grados de libertad del sistema y de la probabilidad admitida.

Por lo que con los resultados obtenidos mediante el diseño de Plackett-Burman, se pasó a la optimización por el Método del Simplex Modificado (MultiSimplex Versión 2.0.4 Grabitech Solutions AB), manteniendo constantes los valores de las variables que se recogen en la tabla 2.13, y optimizando las variables que se habían obtenido como significativas en el anterior diseño: pH, potencial de deposición, salto de potencial e intervalo de tiempo para el salto de potencial.

El procedimiento de medida se realizó preparando una disolución conteniendo 500 μL de 2-APSH $2 \cdot 10^{-4}$ M disuelto en etanol, 2000 μL de disolución reguladora Britton-Robinson 1,5 M y 50 μL de Pb 2 ppm, completando hasta 25 mL con agua Milli-Q.

Tabla 2.13. Valores seleccionados para las variables del análisis de Pb por AdCSV con 2-APSH durante la optimización por el método Simplex Modificado

Variable	Valor
Amplitud de impulso (P)	-0,1 V
Tiempo de Deposición (ta)	120 s
[2-APSH]	$4 \cdot 10^{-6}$ M
[Pb]	4 ppb = $1,93 \cdot 10^{-8}$ M
Tamaño de Gota	9 u.a
Velocidad de agitación	2000 rpm
[Tampón]	0,12 M

El Simplex partió de las condiciones obtenidas como más satisfactorias en el diseño Plackett-Burman, para las variables de estudio, utilizando el experimento número 5 como valor central para establecer los intervalos (tabla 2.14), ya que éste fue el que proporcionó el valor de intensidad más alto.

Tabla 2.14. Variables del diseño del Simplex Modificado

Variable	Intervalo
pH	(5,6,7)
Ea: Potencial de deposición (V)	(-0,35; -0,45; -0,55)
Us: Salto de potencial (V)	(0,004; 0,008; 0,012)
ts: Intervalo de tiempo para el salto de potencial (s)	(0,2; 0,6; 1)

De esta forma, en la tabla 2.15 aparecen recogidos los experimentos propuestos para su comienzo.

Se utilizaron dos variables de respuesta: la intensidad de la determinación electroquímica y la desviación de esa intensidad, maximizando la primera (influencia alta: nivel 1) y minimizando la segunda (influencia media: nivel 0,67), debido a que se observó una ligera irreproducibilidad en algunos experimentos

realizados en el diseño de Plackett-Burman. De esta forma, se pretendía optimizar la sensibilidad del método, haciéndolo a su vez robusto.

Tabla 2.15. Simplex inicial proporcionado por el programa MultiSimplex 2.0.4

Experimentos	pH	Ed (V)	Us (V)	ts (s)
1	5	-0,35	0,004	0,2
2	7	-0,35	0,012	0,2
3	7	-0,35	0,004	1
4	5	-0,55	0,012	1
5	7	-0,55	0,004	0,2

El número total de experimentos que fue preciso realizar antes de parar el simplex aplicando el criterio de la varianza y decidir cuales eran las condiciones óptimas, fue de 21. En la tabla 2.16 se detallan los resultados de la optimización mediante el empleo del simplex modificado, tanto la intensidad de cada uno de los experimentos como la desviación estándar de las intensidades para n=4, es decir, los resultados de las dos variables de respuesta.

Tabla 2.16. Resultados del proceso de optimización mediante el empleo del Simplex Modificado

Experimento	Tipo	pH	Ed (V)	Us (V)	ts (s)	Intensidad (nA)	SD* (nA)
1	F	5	-0,35	0,004	0,2	2,12	0,06
2	F	7	-0,35	0,012	0,2	1,70	0,06
3	F	7	-0,35	0,004	1	1,43	0,20
4	F	5	-0,55	0,012	1	6,79	0,22
5	F	7	-0,55	0,004	0,2	7,66	0,38
6	R	5	-0,55	0,012	-0,2	--	--
7	C-	6,5	-0,4	0,006	0,7	7,77	0,29
8	R	4,8	-0,575	0,001	0,85	9,92	0,17

SD* Desviación estándar de las réplicas de las intensidades medidas para cada experimento

Tabla 2.16. cont. Resultados del proceso de optimización mediante el empleo del Simplex Modificado

Experimento	Tipo	pH	E _d (V)	U _s (V)	t _s (s)	Intensidad (nA)	SD* (nA)
9	E	3,6	-0,688	-0,0045	1,18	--	--
10	R	6,7	-0,688	0,0075	1,18	16,15	0,66
11	E	7,5	-0,856	0,0092	1,66	5,58	0,18
12	R	7,5	-0,556	-0,0027	0,46	--	--
13	C-	5,6	-0,552	0,0083	0,87	17,25	0,23
14	R	4,8	-0,557	0,0074	1,6	15,23	0,08
15	R	4,5	-0,786	0,0061	1,55	7,44	0,29
16	C-	6	-0,496	0,006	0,91	13,40	0,10
17	R	6,8	-0,572	0,0136	1,43	10,44	0,53
18	C+	6,3	-0,572	0,0105	1,28	13,44	0,13
19	R	5,7	-0,689	0,0109	1,55	15,81	0,17
20	R	5,1	-0,671	0,0066	1,32	11,60	0,31
21	C-	6	-0,597	0,0095	1,29	15,86	0,17

SD* Desviación estándar de las réplicas de las intensidades medidas para cada experimento

Como se ha comentado, el criterio seguido en este trabajo para decidir cuando se había llegado a un valor "óptimo" y parar el avance del simplex, fue el de la varianza de la respuesta. Este criterio se basa en la comparación de la varianza de la respuesta (varianza del simplex) con la varianza del método. Con ambas varianzas se calcula el valor de la distribución F, el cual viene dado por el cociente entre la varianza del simplex y la varianza del método. Este valor F obtenido experimentalmente se compara con el valor tabulado según los grados de libertad y la probabilidad admitida de ambas varianzas, de modo que si la teórica es mayor que la calculada se concluye que las variaciones del simplex se deben únicamente a errores aleatorios y se habría encontrado el óptimo [Bayne, 1986].

Para calcular la varianza del método se eligió uno de los experimentos dados por el simplex dentro de los que producían un valor aceptable de la intensidad de la señal electroquímica así como de la desviación de esa intensidad, repitiéndose un total de cinco veces. El experimento elegido fue el correspondiente al vértice 13, descrito en la tabla 2.16.

Los resultados de las intensidades de cada una de las repeticiones del experimento 13, así como la varianza del método obtenida a partir de este experimento, aparecen recogidas en la tabla 2.17

La varianza del método corresponde a la varianza de la función respuesta la cual puede calcularse mediante la expresión [Box, 1989]:

$$\sigma^2 = \frac{\sum (y - \bar{y})^2}{n - 1} \quad (2.5)$$

Tabla 2.17. Cálculo de la varianza del método (Experimento 13) (Condiciones: pH: 5,6; potencial de deposición: -0,552 V; salto de potencial: 0,0083 V e intervalo de tiempo para el salto de potencial: 0,87 s)

Réplica	Intensidad (nA)	Varianza del Método (σ_m) ²
1	17,96	1,22
2	17,63	
3	17,25	
4	17,61	
5	15,21	

Se calculó a su vez la varianza de la respuesta para cada uno de los bloques de cinco experimentos (simplex) ofrecidos por el programa. Los resultados obtenidos aparecen recogidos en la tabla 2.18.

Conforme avanza el método, se comparan ambas varianzas (la varianza de cada simplex con la del método) mediante el valor de la distribución F, con objeto de determinar si entre las dos varianzas existen diferencias significativas. Este parámetro se calcula mediante el cociente de la varianza del simplex y la varianza del método (tabla 2.19).

Tabla 2.18. Varianza de cada uno de los diferentes simplex realizados

Simplex	Experimentos del Simplex	Varianza del simplex (σ_s) ²
1	1,2,3,4,5	9,15
2	1,2,4,5,7	9,23
3	1,4,5,7,8	8,32
4	1,4,5,7,8	8,32
5	4,5,7,8,10	14,50
6	5,7,8,10,13	21,38
7	7,8,10,13,14	17,36
8	7,8,10,13,14	17,36
9	8,10,13,14,16	8,23
10	8,10,13,14,16	8,23
11	10,13,14,16,18	2,85
12	10,13,14,18,19	1,97
13	10,13,14,18,19	1,97
14	10,13,14,19,21	0,55

Teniendo en cuenta que la varianza de cada simplex corresponde a la varianza en la respuesta de 5 experimentos, el número de grados de libertad que le corresponde es 4. De la misma manera, el número de grados de libertad correspondiente a la varianza de método es 4, ya que se realizaron cinco réplicas del experimento seleccionado. Para estos grados de libertad y una probabilidad de 0,5 el valor de $F_{\text{teórico}}$ tabulado es 1,00.

Como se puede observar, al llegar al simplex 14 (tabla 2.18), la varianza del simplex es más pequeña que la del propio método (tabla 2.17).

Además, comparando los valores de $F_{\text{Teórico}}=1,00$ y $F_{\text{calculado}}$ (tabla 2.19), se concluye que es en el simplex 14 donde se alcanzaron las condiciones óptimas, ya que en él el valor de la distribución F calculado es menor que el valor teórico, lo cual indica que no existen diferencias significativas entre las dos varianzas.

Tabla 2.19. Valor de la distribución F para cada uno de los simplex realizados

Simplex	F calculado
1	7,5
2	7,57
3	6,82
4	6,82
5	11,89
6	17,52
7	14,23
8	14,23
9	6,75
10	6,75
11	2,34
12	1,61
13	1,61
14	0,45

Para establecer las condiciones óptimas del método se podía seleccionar cualquier experimento del simplex 14, pues la varianza de los experimentos de este simplex era inferior a la del método. No obstante, de los cinco experimentos (10, 13, 14, 19, 21), se seleccionó como óptimo el número 13, ya que dio lugar a la mayor intensidad (17,25 nA), presentando menor desviación entre las réplicas (0,23).

Las condiciones de este experimento fueron las que detallan en la tabla 2.20, las cuales constituyen los valores óptimos de las variables para llevar a cabo el análisis de Pb por AdCSV empleando 2-APSH.

Tabla 2.20. Variables físico-químicas y electroquímicas del experimento 13 seleccionadas como óptimas para el análisis de Pb por AdCSV empleando 2-APSH

Variable	Valores
pH	5,6
Ea: Potencial de deposición (V)	-0,552
Us: Salto de potencial (V)	0,0083
ts: Intervalo de tiempo para el salto de potencial (s)	0,87

2.4. Influencia de la concentración de ligando

Bajo las condiciones óptimas establecidas para el análisis de Pb por AdCSV, se ha llevado a cabo un estudio para determinar el intervalo para la relación [reactivo]/[metal], con el cual la señal voltamperométrica del complejo Pb-2-APSH se hace independiente de esa relación.

La experiencia consistió en mantener fija la concentración de plomo e ir variando la del reactivo, para poder determinar en qué momento la intensidad de la señal se mantenía constante, es decir, se hace independiente de la relación metal/reactivo, pues eso ocurrirá al variar las muestras reales a analizar.

Observando la gráfica de la figura 2.12, se puede ver como a medida que aumenta la concentración de ligando, va incrementándose progresivamente la intensidad debido a que se favorece la formación del complejo. A partir de una relación molar de 60:1 se mantiene relativamente constante la intensidad del complejo, con unos valores entre 40 y 45 nA. Para valores por encima de 600:1, la intensidad del complejo deja de ser constante volviendo a disminuir. Este fenómeno es debido probablemente a que el exceso de ligando se deposita en la gota y compite con el complejo al adsorberse en el electrodo.

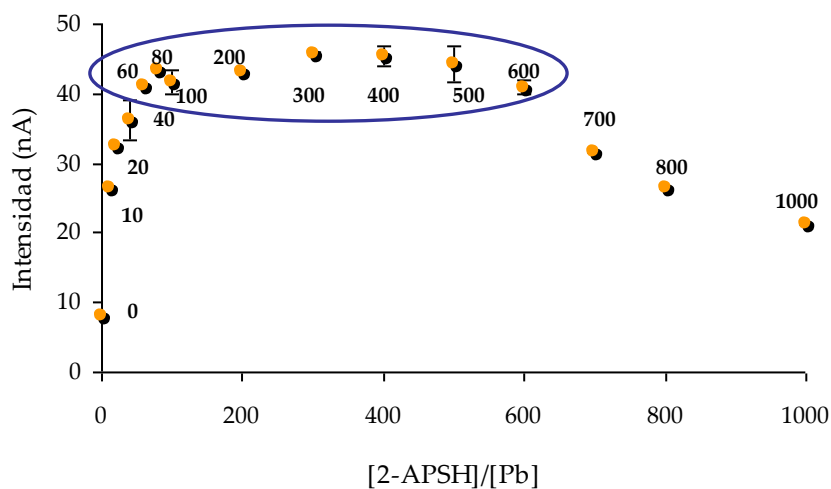


Figura 2.12. Estudio de la relación óptima reactivo/metal que influye en la intensidad del pico del complejo Pb-2-APSH para una concentración de $4,95 \cdot 10^{-8}$ M de Pb(II) a pH 5,6 ($n=2$)

De esta forma, se concluye que es adecuado analizar muestras reales cuya relación molar reactivo-metal esté comprendida entre **60:1 y 600:1**.

2.5. Control del pH óptimo en el procedimiento propuesto: empleo de la disolución reguladora acetato amónico-ácido clorhídrico

Por último, antes de pasar a establecer las características analíticas del método, se pasó a realizar un último estudio. Dado que se encontró en la bibliografía que la señal electroquímica en estos métodos de AdCSV puede estar influenciada por el tipo de disolución reguladora utilizada en el control del pH del medio, se estudiaron diversas disoluciones de pH 5,6, valor óptimo obtenido. Las disoluciones fueron: Britton-Robinson; $\text{NH}_4\text{Ac}/\text{HCl}$; $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ y PIPES.

De ellas, la que proporcionó mejor señal fue la disolución de $\text{NH}_4\text{Ac}/\text{HCl}$ empleada anteriormente por Fischer y Van den Berg [Fischer, 1999].

Esta disolución se prepara a partir de acetato amónico 1 M, mediante ácido acético glacial (100%) 1 M y amoníaco en disolución (25%) 1 M, ambos de calidad Suprapur, y ácido clorhídrico 0,5 M Suprapur para el ajuste del pH a 5,6 [Fischer, 1999].

Igualmente se estudió el volumen mínimo necesario para que actuara su capacidad reguladora. Para ello se efectuaron diversos ensayos mediante la adición de alícuotas de disolución reguladora sobre las cantidades de reactivo y metal determinadas y utilizadas en la celda electroquímica (Figura 2.13).

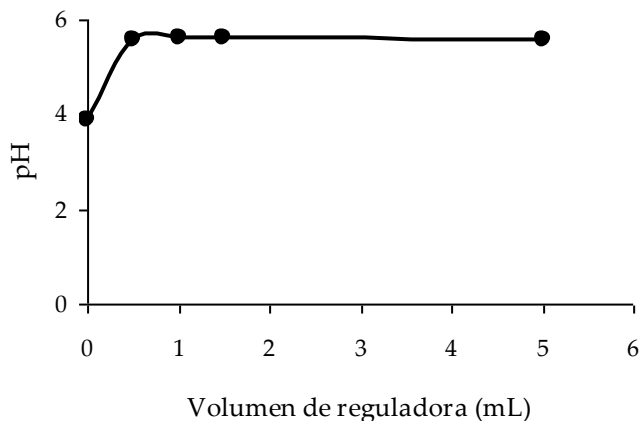


Figura 2.13. Evolución del pH con la adición de alícuotas sucesivas de disolución reguladora de Acetato amónico / Ácido Clorhídrico sobre 25 mL de electrolito (2-APSH $4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) conteniendo Pb $1,93 \cdot 10^{-8} \text{ M}$

Como puede comprobarse en la figura 2.13, prácticamente a partir de la primera adición de 0,5 mL de disolución reguladora se alcanza un valor de pH de 5,6 que prácticamente se mantiene constante tras sucesivas adiciones.

Por ello, se decidió añadir 2 mL de tampón para no diluir la muestra en exceso y asegurarse de mantener constante el pH en 5,6 dado que en AdCSV, pequeñas variaciones de pH pueden modificar las señales electroquímicas de forma significativa.

2.6. Método de análisis de Pb propuesto

A modo de resumen, se detallan en la tabla 2.21 las condiciones óptimas para el análisis de Pb a nivel de trazas por AdCSV con 2-APSH como ligando complejante en muestras acuosas. Se ha empleado el electrodo HMDE como electrodo de trabajo, la modalidad diferencial de impulso (DP) y adiciones estándar como tipo de calibración.

Una vez identificada, caracterizada y optimizada la señal de AdCSV correspondiente al Pb(II) a través de la formación del complejo con 2-APSH (figura 2.14), se ha procedido a evaluar la viabilidad de este sistema como método analítico para la determinación de Pb(II) en aguas naturales.

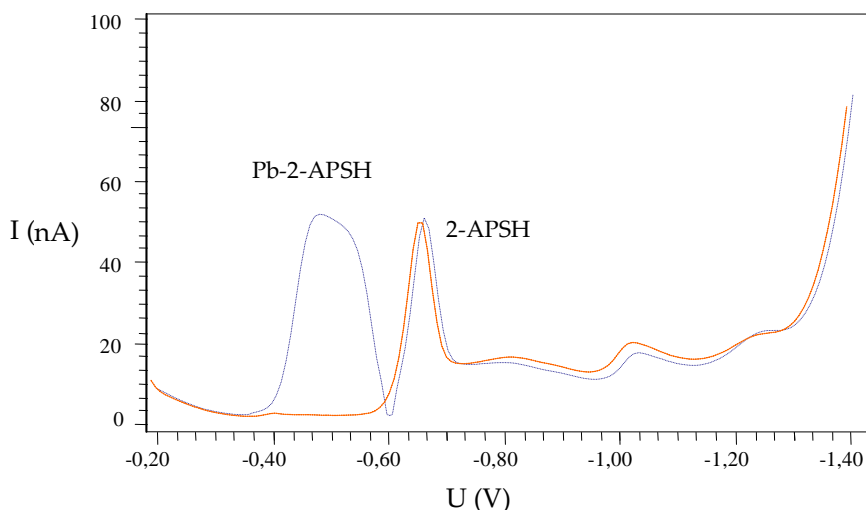


Figura 2.14. Voltamperogramas de 2-APSH $9 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ en ausencia de Pb(II) (línea naranja) y en presencia de Pb(II) 49,5 nM (línea azul). (Las condiciones de análisis son las mostradas en la tabla 2.21)

Para ello, se han estudiado los parámetros característicos que definen a un método analítico: rango dinámico (linealidad), precisión, límites de detección y cuantificación, validación e interferencias.

Tabla 2.21. Condiciones óptimas para la determinación de trazas de Pb por AdCSV con 2-APSH

Variable	Valores
Concentración 2-APSH (M)	$(0,5-50) \cdot 10^{-6}$
[2-APSH]/[Pb]	60:1 - 600:1
Reguladora	NH ₄ Ac/HCl
Concentración reguladora NH₄Ac/HCl (M)	0,08
Volumen de reguladora NH₄Ac/HCl (mL)	2
pH	5,6
Potencial de medida (V)	-0,488
Potencial de deposición (V)	-0,552
Amplitud de impulso (V)	-0,1
Tiempo de deposición (s)	120
Salto de potencial (V)	0,0083
Intervalo de tiempo para el salto de potencial (s)	0,87
Tiempo de impulso (s)	0,04
Tamaño de gota (u.a.)	9
Velocidad de agitación (rpm)	2000

2.6.1. Parámetros analíticos del método

2.6.1.1. Recta de calibrado

En la figura 2.15 se muestra uno de los voltamperogramas obtenidos en este trabajo de investigación correspondiente a diversas disoluciones con concentraciones crecientes de Pb(II) comprendidas entre 9,6 y 38,4 nM para el método propuesto. Se puede observar como la intensidad de la señal es proporcional a la concentración de Pb(II) apareciendo a un potencial de -0,488 V.

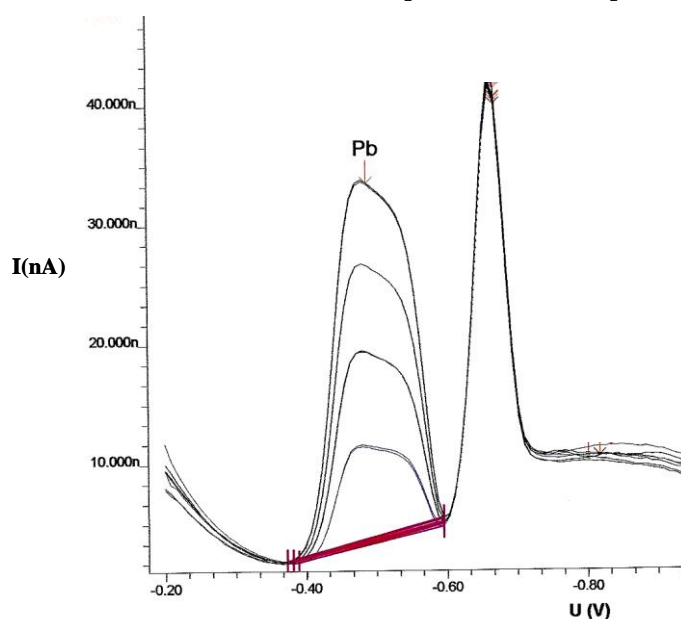


Figura 2.15. Ejemplo de voltamperograma obtenido para sucesivas adiciones de Pb(II) 9,6 nM mediante AdCSV y empleo de 2-APSH $9 \cdot 10^{-6}$ M como reactivo

Uno de los parámetros más importantes a la hora de establecer un nuevo método analítico es el rango lineal de aplicación. Para ello se ha estudiado la linealidad mediante el método propuesto (tabla 2.21) con 11 niveles de concentración de Pb(II) realizados por duplicado, empleando $9 \cdot 10^{-6}$ M de 2-APSH. Al representar la intensidad de pico frente a la concentración de Pb(II) se obtuvo un comportamiento lineal entre 2,4 y 145 nM de Pb(II) (de 0,5 a 30 ppb de Pb(II)) (Ver fig. 2.16).

Como puede observarse, se puede decir que una de las ventajas que aporta este método es la de poseer un amplio rango lineal de aplicación.

El coeficiente de correlación y la ecuación de la recta aparecen reflejados en la figura 2.16.

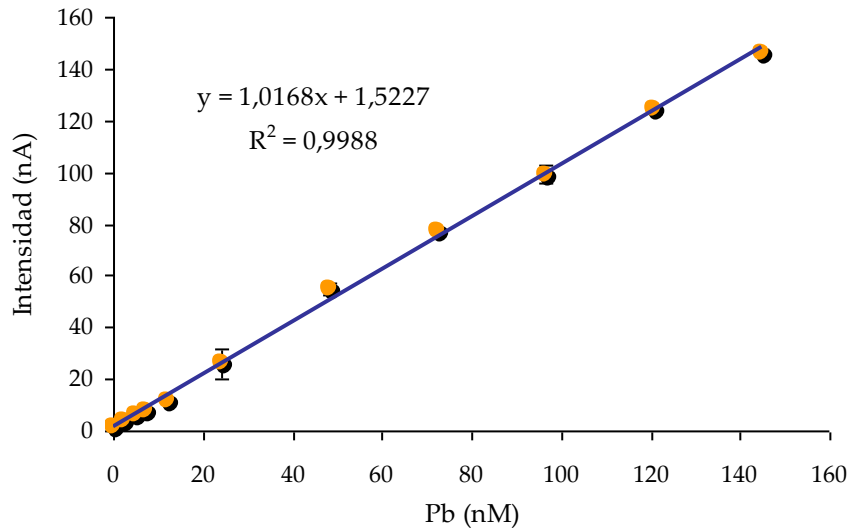


Figura 2.16. Recta de Calibrado para concentraciones de plomo de 2,4 a 145 nM aplicando el método propuesto por AdCSV

2.6.1.2. Límite de detección (LD) y cuantificación (LC)

A partir de diversas medidas realizadas sobre el blanco se calculó el límite de detección definido como [IUPAC, 1997]:

$$LD = 3\sigma/m \quad (2.6)$$

siendo σ la desviación estándar del blanco y m la pendiente de la recta de regresión.

Igualmente, se evaluó el límite de cuantificación, definido como [IUPAC, 1997]:

$$LC = 10 \sigma/m \quad (2.7)$$

Se realizaron 3 análisis diferentes de una muestra de blanco, y cada uno de ellos se realizó por triplicado, obteniéndose como límite de detección un valor de **0,17 nM = 0,034 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$** de Pb y como límite de cuantificación **0,58 nM = 0,117 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$** de Pb.

2.6.1.3. Reproducibilidad

Para estudiar la reproducibilidad del método de análisis de Pb por AdCSV propuesto se realizaron cinco análisis diferentes en las condiciones óptimas obtenidas, sobre una muestra de agua con una concentración de plomo de 17,3 nM = 3,5 µg·L⁻¹. Los datos obtenidos para estos experimentos se muestran en la tabla 2.22, incluyendo desviación estándar, desviación estándar relativa (RSD) y % de error.

Para calcular el valor de la distribución t se tuvo en cuenta los grados de libertad del sistema $n-1=4$ (siendo n el número de experimentos realizados) y se aceptó un intervalo de confianza del 95%.

Así, para 4 grados de libertad y un intervalo de confianza del 95%, el valor de t tabulado es 2,132.

La desviación estándar de las medidas se calculó con la siguiente expresión:

$$s = \sqrt{\frac{\sum(X - \bar{X})^2}{n - 1}} \quad (2.8)$$

donde n es el número de repeticiones, X es el resultado obtenido y \bar{X} corresponde al valor medio de los resultados.

La desviación estándar relativa (RSD) se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\text{RSD} = \frac{s}{\bar{X}} \cdot 100 \quad (2.9)$$

La precisión o % de error viene determinada por la expresión:

$$\% \text{ error} = \frac{s \cdot t}{\bar{X} \cdot (\sqrt{n})} \cdot 100 \quad (2.10)$$

donde t es el valor de la distribución t tabulado.

Los resultados indicaron la buena reproducibilidad de la medida de intensidad electroquímica para el análisis de plomo, con una precisión del 1,14 % para un 95 % de intervalo de confianza.

Tabla 2.22. Reproducibilidad de la medida electroquímica obtenida en el análisis de Pb mediante el método de AdCSV propuesto

Parámetros	Valores
Intensidad (nA)	14,79; 15,18; 14,81; 14,81; 14,74
<i>n</i>	5
Grados de libertad (<i>n-1</i>)	4
Intervalo de confianza	95%
<i>t</i>	2,132
Media	14,866
<i>s</i>	0,1778
RSD (%)	1,20
Precisión (%)	1,14

2.6.2. Interferencias

Dadas las características particulares del método de redisolución adsorptiva, la presencia de determinadas sustancias en disolución puede afectar de diferentes formas a los procesos involucrados en la obtención de la señal voltamperométrica del complejo Pb(II)-2-APSH.

Cabe citar principalmente dos, (1) los efectos de los componentes mayoritarios de la matriz de las muestras y (2) la existencia de otros metales con afinidad también para la formación de quelatos metálicos con la 2-APSH, siendo en estos casos esenciales la naturaleza y la concentración de la especie interferente. Estos metales podrían interferir por dos motivos: (a) que compitan con el Pb(II) en el proceso de formación del complejo, impidiendo la reacción del Pb(II) con la 2-APSH, ó (b) que sean una interferencia electroquímica de la señal del Pb(II) por solapamiento de picos. Por tanto, para estudiar la aplicabilidad del método de Pb(II) por AdCSV en aguas, y en concreto en agua de mar, se han probado los efectos que producen las sales usuales que conforman la matriz del agua de mar.

2.6.2.1. Iones mayoritarios y minoritarios presentes en el agua de mar

Se ha evaluado la influencia de las sales sobre la determinación de Pb(II) por AdCSV. Aunque, la composición cuantitativa de dichas sales puede verse alterada en función de la localización y características propias de cada zona, su composición cualitativa en elementos mayoritarios así como la conservación de las relaciones de concentración puede considerarse aproximadamente constante. Por tanto, se han ensayado el efecto de estas especies iónicas a los niveles de concentración que se encuentran en el agua de mar de salinidad 35. Para ello, se disolvieron en agua Milli-Q las sales expresadas en la tabla 2.23, a las concentraciones establecidas por Grasshoff y colaboradores [Grasshoff, 1983].

Tabla 2.23 Composición salina de las muestras utilizadas para el estudio de interferencias

Especie Interferente		Concentración en la disolución stock (g·L ⁻¹)	Concentración en la disolución de ensayo (g·L ⁻¹)**	Concentración en la disolución de ensayo (M)**
Iones en la disolución	Sal*			
Na ⁺ , Cl ⁻	NaCl	119,70	23,939	0,409
Mg ²⁺ , Cl ⁻	MgCl ₂ ·6H ₂ O	54,13	10,825	0,053
Na ⁺ , SO ₄ ²⁻	Na ₂ SO ₄	19,97	3,994	0,028
Ca ²⁺ , Cl ⁻	CaCl ₂ ·H ₂ O	8,51	1,704	0,012
K ⁺ , Cl ⁻	KCl	3,39	0,677	9,081·10 ⁻³
Na ⁺ , HCO ₃ ⁻ , CO ₃ ²⁻	NaHCO ₃	0,98	0,196	2,33·10 ⁻³
K ⁺ , Br ⁻	KBr	0,49	0,098	8,23·10 ⁻⁴
H ₂ BO ₃ ⁻ , HBO ₃ ²⁻ , BO ₃ ³⁻	H ₃ BO ₃	0,14	0,027	4.369·10 ⁻⁴
Sr ²⁺ , Cl ⁻	SrCl ₂ ·6H ₂ O	0,12	0,024	9,006·10 ⁻⁵
Na ⁺ , F ⁻	NaF	0,015	0,003	7,143·10 ⁻⁵

*Merck, p.a.; **concentraciones de sales en agua de mar sintética [Grasshoff, 1983]

Se prepararon distintas muestras sintéticas conteniendo Pb(II) 21,3 ± 2,0 nM y una sal a la concentración que se ha detallado en la tabla 2.23.

Los resultados obtenidos para el estudio de estas especies interferentes se resumen en la tabla 2.24. Como puede comprobarse de los resultados mostrados en esta tabla, todos los porcentajes de recuperación se encuentran en torno al 100 %, además se puede ver como todas las concentraciones de Pb(II) encontradas caen dentro del intervalo de precisión del método (19,3 – 23,3 nM).

Tabla 2.24. Efecto de sustancias interferentes en el análisis de plomo (21,3 nM) por el método propuesto de AdCSV

Especie Interferente	[Pb(II)]	[Pb(II)]	Recuperación (%)
	Encontrado (ppb)	Encontrado (nM)	
NaCl	4,465	22,1	103,8
MgCl ₂	4,587	22,7	106,6
Na ₂ SO ₄	4,404	21,8	102,3
CaCl ₂	4,096	20,3	95,2
KCl	4,414	21,8	102,6
NaHCO ₃	3,99	19,8	92,7
KBr	4,609	22,8	107,1
H ₃ BO ₃	4,642	23,0	107,9
SrCl ₂	4,155	20,6	96,6
NaF	4,48	22,2	104,1

Por consiguiente, no se ha observado la existencia de interferencias significativas procedentes de las sales más abundantes presentes en el agua de mar.

2.6.2.2. Metales pesados

Otra causa potencial de interferencia puede encontrarse en la existencia de otros metales en disolución que también presenten afinidad por la formación de complejos con la 2-APSH y que, por tanto, puedan competir con el Pb(II) en el proceso de formación del complejo Pb(II)-2-APSH o bien interferir en su determinación voltamperométrica.

De esta forma, se han hecho una serie de ensayos con disoluciones de iones metálicos que pueden formar complejos con la 2-APSH. Además, las concentraciones de estos metales se han seleccionado de acuerdo con los niveles a los cuales suelen estar presentes en el agua de mar (tabla 2.25).

Tabla 2.25 Concentraciones de metales (nM) en agua de mar [Crompton, 1997]

Metal	Aguas costeras	Aguas oceánicas
V(V)	0,20 - 100	8,83 - 39,26
Fe(III)	17,91 - 4476	3,58 - 5766
Ni(II)	3,41 - 90,79	2,55 - 15,84
Cu(II)	1,09 - 315	0,099 - 44,07
Zn(II)	0,11 - 3059	0,76 - 167
Mn(II)	6,37 - 4551	0,33
Al(III)	237,2 - 2335	3,71 - 22,24
Cd(II)	0,13 - 44,48	0,089 - 1,12
Bi(III)	0,00024 - 3,25	< 0,000014 - 0,000024
Co(II)	< 0,17 - 4,24	0,051 - 2,72

Así, V(V), Fe(III), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Mn(II) y Al(III) se ensayaron a una concentración de 100 nM, y Cd(II), Bi(III) y Co(II) a 3 nM. Se estudió también el efecto de otros metales de interés medioambiental como Pd(II) y Tl(I) a una concentración de 3 nM. Estas disoluciones se prepararon por dilución a partir de las correspondientes disoluciones patrones comerciales de 1000 mg·L⁻¹ (Merck).

El efecto sobre la señal voltamperométrica de Pb(II) se estudió como en el apartado anterior por medio del método de las adiciones estándar. Los resultados obtenidos para Pb(II) 21,3 nM se exhiben en la tabla 2.26. Como puede comprobarse todo los porcentajes de recuperación se encuentran en torno al 100 %, además los valores de las concentraciones de Pb(II) encontradas se hallan dentro del intervalo proporcionado por la precisión del método (19,3 - 23,3 nM).

Hay que destacar la existencia de señales voltamperométricas para V(V), Ni(II) y Zn(II) a los valores de potencial especificados, sin que ninguno de ellos afecte a la señal correspondiente al Pb(II) cuyo potencial de medida es -0,488 V. La 2-APSH también forma complejo con Cd(II) dando una señal sobre -0,6 V a pH 8 [Jurado-González, 2003], pero en este estudio no se observó debido a que el análisis se realizaba a un pH distinto, de 5,6, y a ese pH más ácido no se observó señal para el cadmio.

Tabla 2.26. Efecto de sustancias interferentes en el análisis de plomo (21,3 nM) por el método propuesto de AdCSV

Metal	[Pb(II)] Encontrado ppb	[Pb(II)] Encontrado nM	Recuperación (%)	E _{Metal} (V)
V(V)	4,378	21,7	101,7	-0,86
Fe(III)	4,503	22,3	104,6	-
Ni(II)	4,540	22,5	105,5	-0,70
Cu(II)	4,198	20,8	97,6	-
Zn(II)	4,475	22,2	104,0	-1,00
Mn(II)	4,163	20,6	96,7	-
Al(III)	4,464	22,1	103,7	-
Cd(II)	4,078	20,2	94,8	-
Bi(III)	4,229	20,9	98,3	
Co(II)	4,701	23,3	109,2	
Pd(II)	4,237	21,0	98,5	
Tl(I)	4,562	22,6	106,0	

Por consiguiente, de los datos expuestos puede deducirse la inexistencia de efectos interferentes significativos procedentes de los iones metálicos que forman complejos con 2-APSH, a los niveles característicos presentes en agua de mar, y la posibilidad de desarrollar un método simultáneo de AdCSV que permita el análisis de V(V), Ni(II), Zn(II) y Pb(II), con muy buenas perspectivas y aplicable también a agua de mar.

2.6.3. Validación del método y aplicación a muestras reales

La exactitud del método fue evaluada mediante la determinación de Pb (II) en una muestra de referencia certificada de agua de estuario, LGC 6016 y una muestra de agua de bebida, LGC 6011. La muestra de referencia LGC 6016 presenta valores certificados para Cd, Cu, Pb, Mn, Ni y Zn, y valores estimados para Ca, Mg, K y Na. El valor certificado para Pb(II) es de $196 \pm 3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Se trata de un agua procedente del estuario Severn de Gran Bretaña, cerca de Avonmouth, zona bastante industrializada. El agua fue filtrada a través de filtros de membrana de 0,45 micras de tamaño de poro y estabilizada a pH 2 mediante la adición de ácido nítrico concentrado. Las muestras de agua se conservan en botes de polietileno de alta densidad. Los valores certificados de los metales fueron obtenidos mediante espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo y dilución isotópica (ID-ICP-MS) y confirmada mediante datos gravimétricos.

A su vez, la muestra de referencia validada *LGC 6011* presenta valores certificados para Al, Ba, Ca, Cr, Fe, Pb, Mg, Mn, Ni, K, Ag, Na y Zn, siendo el valor certificado para Pb(II) de $43 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Por otro lado, el método propuesto también fue aplicado satisfactoriamente en el análisis de Pb(II) disuelto en dos muestras reales de agua de mar recogidas en la costa de Huelva. Las muestras fueron analizadas mediante voltamperometría de redisolución después de un proceso de digestión UV para eliminar la interferencia de la materia orgánica. La cuantificación fue llevada a cabo mediante el método de adiciones estándar. Los resultados fueron comparados con los determinados por voltametría de redisolución anódica (ASV) (ver tabla 2.27), técnica que aporta datos adecuados pero peor sensibilidad.

Las muestras de agua se tomaron con ayuda de una bomba (Masterflex 7521-00, cabezal 07518-10, tubo 6429-25 de Cole Parmer Instrument Co. Illinois U.S.A) siguiendo el protocolo “manos sucias manos limpias”. En cada punto de muestreo todo el sistema de bombeo se enjuagó durante unos minutos con el agua antes de tomar la muestra definitiva. Las muestras de agua fueron filtradas *in-situ* a través de filtros de membrana de 0,45 micras de tamaño de poro conectados a la bomba (figura 2.17).



Figura 2.17. Toma de muestra de agua de mar en la costa de Huelva

El agua se depositó en las botellas de toma de muestra, que fueron cerradas e introducidas en bolsas de plástico de cierre hermético. Las botellas se conservaron en neveras de plástico refrigeradas con bloques de hielo hasta su llegada al laboratorio.

Ya en el laboratorio se conservaron mediante la adición de 0,6 mL de ácido nítrico (Merck, calidad Suprapur) a 500 mL de la muestra filtrada. La muestra se dejó aproximadamente dos semanas a temperatura ambiente para que el ácido pudiera lixiviar los metales que pudieran haberse adsorbido en las paredes del recipiente de plástico y posteriormente se congeló a -4° C. La noche anterior a ser medida por el método propuesto se sacó del congelador y se descongeló en el interior del frigorífico.

En la tabla 2.27 se muestran los resultados obtenidos de concentración de Pb(II) por el método propuesto de AdCSV, para cada una de las muestras de referencia evaluadas así como para las muestras reales de agua de mar. En el caso de las muestras de referencia, el valor considerado como valor verdadero ha sido el valor certificado, y en el caso de las muestras reales de agua de mar, el valor considerado como verdadero ha sido el calculado mediante un segundo método considerado de referencia, voltamperometría de redisolución anódica (ASV).

Tabla 2.27. Concentración de Pb encontrado en muestras de agua reales y certificadas mediante el método propuesto de AdCSV y por ASV

Muestra	Concentración Pb(II)	Pb medido por el método propuesto AdCSV	Error relativo (%)
LGC 6016 (agua de estuario)	$196 \pm 3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1a}$	$191,8 \pm 2,3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	-2,15
LGC 6011 (agua de bebida)	$43 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1a}$	$41,3 \pm 1,2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	-3,9
Agua de mar I	$15,9 \pm 1,0 \text{ nM}^b$ $(3,3 \pm 0,2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})^b$	$15,2 \pm 0,2 \text{ nM}$ $(3,14 \pm 0,04 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	-4,40
Agua de mar II	$21,7 \pm 0,5 \text{ nM}^b$ $(4,5 \pm 0,1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})^b$	$22,1 \pm 0,2 \text{ nM}$ $(4,57 \pm 0,04 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	+1,84

a: Valor certificado como $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

b: Pb medido por ASV

Como se puede comprobar, los errores relativos para cada una de las muestras (calculados teniendo en cuenta la diferencia entre el valor de la medida y el valor tomado como exacto entre el valor exacto), son relativamente bajos, todos por debajo del 5 %, indicándonos la fiabilidad de los resultados.

Las concentraciones de Pb(II) encontradas en las muestras de agua de mar, han proporcionado valores de 3,14 y 4,57 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Pb(II) respectivamente. Como se puede observar, comparando estos resultados con los valores guía de concentración de metales en aguas (ver tabla I.7) ninguno de ellos ha superado los valores límite establecidos por la EPA.

Una de las propiedades más importantes de un método analítico es que debería estar libre de errores sistemáticos. Esto significa que el valor dado para la cantidad de analito debería ser el valor verdadero. Sin embargo, incluso si no existieran errores sistemáticos, los errores aleatorios hacen poco probable que la cantidad medida sea exactamente igual que la cantidad conocida. Por lo que, para decidir si la diferencia entre ambas cantidades se puede atribuir a errores aleatorios se debe emplear algún contraste de significación.

Para validar el método propuesto mediante muestras de referencia, el contraste de significación se realiza mediante la *comparación de una media experimental con un valor conocido* [Miller, 2002].

En primer lugar se debe establecer la hipótesis nula H_0 , en la que se considera que el método analítico no está sujeto a errores sistemáticos, es decir, que no hay otra diferencia entre el valor observado y el conocido que la atribuible a la variación aleatoria.

Para decidir si la diferencia entre la media experimental y el valor verdadero es significativa, es decir, para contrastar H_0 , se calcula el estadístico t :

$$t = \frac{(\bar{x} - \eta) \cdot \sqrt{n}}{s} \quad (2.11)$$

donde \bar{x} es la media muestral, η es la media de la población, s la desviación estándar muestral y n el número de muestras.

Para el caso de la muestra de referencia LGC 6016, se tiene el valor certificado para plomo ($196 \pm 3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Y, por otro lado, se tiene una serie de datos

con su respectiva media y desviación estándar, obtenidos por el método propuesto (Tabla 2.28).

Tabla 2.28. Resultados del análisis de Pb mediante el método propuesto por AdCSV (n=4)

Datos	Media	Desviación estándar
197,8	191,8	17,1
178,2		
177,9		
213,3		

Al sustituir estos valores en la expresión inicial para la *t de Student* se llega a:

$$t = \frac{(191,8 - 196) \cdot \sqrt{4}}{17,1} = -0,49 \quad (2.12)$$

Si la *t* calculada en valor absoluto es mayor que un cierto valor crítico, entonces se rechaza la hipótesis nula.

El valor crítico de la *t de Student* para un 5% de probabilidad y 3 grados de libertad es $t_3=3,18$.

Como se puede comprobar, el valor tabulado es mucho mayor que el calculado. Por lo que no se rechaza la hipótesis nula (H_0 : la media muestral y la media de la población son iguales), es decir, no hay evidencia de error sistemático, o lo que es lo mismo la diferencia observada no es estadísticamente significativa.

Este mismo estudio estadístico fue llevado a cabo para el caso de la segunda muestra de referencia (LGC 6011), obteniendo en este caso unos valores de $t_{calculado}=-2,5$ y $t_{tabulado}=4,30$ para un 5% de probabilidad y 2 grados de libertad.

Para el caso de las muestras reales, el contraste de significación empleado fue la *comparación de dos medias experimentales* [Miller, 2002] empleando los valores conseguidos por el método propuesto y los obtenidos utilizando un segundo método de referencia, ASV. Para este caso, el estadístico *t* y la *s* se calculan empleando las siguientes expresiones:

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s \cdot \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad (2.13) \quad s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)} \quad (2.14)$$

Tanto en las muestras de referencia como en las muestras reales se pudo comprobar como los valores obtenidos por el método propuesto concordaban satisfactoriamente con el valor certificado y los proporcionados por ASV respectivamente, lo que avala la aplicabilidad del método a muestras de ecosistemas acuáticos.

2.7. Comparación del método

Debido a la alta toxicidad del plomo y a su presencia cada vez más elevada en los compartimentos medioambientales, es un metal de gran interés. Es por ello por lo que existen diferentes métodos para determinarlo. En la tabla 2.29 se recogen los métodos por AdCSV empleando electrodo tipo HMDE para la determinación de Pb en aguas, descritos en la bibliografía. Es de destacar que existen otros métodos por AdCSV aplicados a otro tipo de muestras, pero en esta comparativa sólo se han incluido los aplicados a muestras acuosas, ya que es el tipo de muestra de estudio en esta Tesis.

Uno de los primeros métodos presentados para la determinación de Pb, fue el propuesto en 1986 por Constant M.G. Van den Berg, para el análisis simultáneo de Pb, Cd y Cu empleando 8-hidroxiquinolina (oxina) como agente quelatante [Van den Berg, 1986]. Este método aportaba un límite de detección alto de 0,3 nM de Pb y un rango de aplicación de 0-60 nM de Pb y aplicable a muestras de agua de mar. A pesar de su aplicabilidad a este tipo de muestras salinas, presentaba una importante interferencia del Cu que afectaba en gran medida a la señal del Pb. Otra desventaja del método eran los elevados tiempos de deposición, los cuales podían llegar a alcanzar valores de hasta 10 min, alargando demasiado los análisis.

El método publicado por Qingguo Wu y col., años más tarde, mejoró 10 veces el límite de detección de plomo con respecto al de Van den Berg, empleando naranja de xilenol como ligando orgánico para la formación del complejo con Pb y además fue aplicable a agua de mar [Wu, 1995]. A pesar de las ventajas comentadas, hay que destacar como el rango lineal de aplicación disminuía hasta la mitad (0-34 nM de Pb) y el tiempo de deposición seguía siendo alto (3 min).

Por el contrario, Wang y colaboradores [Wang, 1993] ofrecieron la posibilidad de determinar Pb de una manera muy selectiva, ya que no se veía afectado por la presencia de grandes cantidades de Tl o Sn, ni de Cu como le ocurría al método propuesto por Van den Berg, y además mejoraba tanto el límite de detección (0,19 nM de Pb) como el rango de aplicación (0-72,5 nM de Pb). Pero, a diferencia de los dos métodos anteriores, sólo era aplicable a agua de bebida y no a agua de mar de matriz más compleja. Es de destacar también la interferencia del Mo debido al solapamiento con la señal del Pb.

Por otro lado, otros investigadores, Yokoi y colaboradores, en el año 1995, determinaron Pb mediante AdCSV mediante la complejación entre este metal y calceína azul [Yokoi, 1995]. En este caso, el tiempo de deposición se redujo a 1 minuto, el rango lineal se amplió hasta 100 nM de Pb y el límite de detección se mantuvo con valores bajos (0,04 nM de Pb), pero la aplicación del método seguía sin poder efectuarse en muestras salinas, evaluándose únicamente de manera satisfactoria en aguas de río, agua mineral y agua potable. Cabe destacar también como la determinación de Pb se veía afectada por iones tales como Fe(III), Mo(VI), Mn(II), Cr(III) y Sn(II) provocando la disminución de la intensidad del pico de Pb drásticamente.

Unos años más tarde, Colombo y colaboradores presentaron en 1997 un método para la determinación simultánea de metales pesados como el Cu, Cd, Ni y Pb en agua de mar, empleando la mezcla de ligandos dimetilglioxima y oxina. Con este método se redujeron los tiempos de análisis y los volúmenes de muestra, además de aportar la ventaja adicional de realizar análisis simultáneos de metales pesados de gran interés medioambiental. En contraposición el límite de detección era alto y el rango lineal de aplicación se veía bastante reducido de 0 a 2,5 nM de Pb [Colombo, 1997].

En 2001, Fischer y col., estudiaron la competición de ligandos usando calceína azul para la determinación de Pb en agua de lago mediante AdCSV [Fischer, 2001]. A pesar de la pequeña concentración de ligando empleado (0,5 μ M), el pequeño tiempo de deposición (90 seg), y el bajo límite de detección (0,1 nM de Pb), el rango lineal no es muy grande (0-10 nM de Pb) y sólo se ha estudiado su aplicabilidad en agua de lago. Además, se observó que los altos contenidos en Mg

de las aguas salinas, complicaban la medida disminuyendo la sensibilidad, debido a la complejación competitiva con calceína azul, afirmando que para una especiación adecuada de Pb en agua de mar, era necesario encontrar un ligando alternativo.

Con el método propuesto por Ensafi y col., en 2003, se obtuvo un límite de detección de 0,3 nM de Pb y se consiguió ampliar el rango lineal de aplicación (0,5-145 nM de Pb). Para ello, se empleó rojo de pirogalol (PGR) como ligando orgánico complejante. Su aplicación fue estudiada únicamente en aguas de río y potable y como puede comprobarse en la tabla 2.29, el pH óptimo para realizar los análisis se encontraba a pH 3,8. Cabe destacar como el efecto de los parámetros tanto instrumentales como químicos fue estudiado mediante un diseño factorial [Ensafi, 2003].

Comparando el método de Ensafi de 2003 para la determinación individual de Pb, con el propuesto un año más tarde por Shams y colaboradores [Shams, 2004] para la determinación simultánea de Pb, Cu y Zn, se puede comprobar como al mejorar tanto el tiempo de deposición (1 min) como el rango lineal de aplicación (1,5-386 nM de Pb), se empeora en este caso el límite de detección (0,4 nM de Pb). La aplicabilidad del método propuesto fue estudiada de manera satisfactoria únicamente en muestras de agua potable.

Con el objetivo de reducir los tiempo de análisis todavía más y de ampliar el rango de aplicación del método enormemente, Ensafi y colaboradores desarrollaron en 2006 un método para la determinación de Pb junto con Cd empleando naranja de xilenol como ligando orgánico para la acumulación del complejo en la etapa de deposición [Ensafi, 2006]. Debido a efectos intermetálicos entre dichos metales, la optimización de las variables químicas e instrumentales se realizó mediante el uso de redes neuronales (ANN) ya que se trata de un modelo capaz de trabajar con sistemas no lineales. Este método presenta por un lado importantes ventajas como un tiempo de deposición muy pequeño (30 seg) y un rango lineal de aplicación de los más grandes encontrados en la bibliografía para la determinación de Pb (24-724 nM), pero por otro lado presenta limitaciones como el elevado límite de detección (4,8 nM de Pb) y que su aplicación fue estudiada únicamente de manera satisfactoria en muestras de agua de río y potable.

El método para la determinación de Pb por AdCSV más reciente que se ha encontrado es el publicado por Arancibia y col., en 2009, que emplea morina-5'-ácido sulfónico como ligando quelatante además de la presencia de un tensioactivo, el dodecil sulfato sódico, para la mejora de la sensibilidad del método alcanzando un límite de detección de 0,19 nM de Pb [Arancibia, 2009]. Este método presenta unos análisis rápidos, y con la posibilidad de aplicarlo a muestras de agua de mar. La única limitación destacada es su rango lineal de aplicación (0,5-48,3 nM de Pb).

Como se puede observar, siempre existe alguna limitación en los métodos descritos en la bibliografía, ya sea el límite de detección, el rango lineal de aplicación o la posibilidad de aplicarlo a las muestras de matriz más compleja como son las de agua de mar. Como puede comprobarse, el método desarrollado en este trabajo proporciona un límite de detección muy bajo (0,17 nM), encontrándose dentro de los más pequeños, el tiempo de deposición no es muy grande (120 seg), el rango de aplicación va desde 2,4 hasta 145 nM, y además se ha estudiado el efecto de las sales y metales normalmente encontrados en el agua de mar sin observarse ninguna interferencia significativa. Igualmente, la aplicación a muestras reales de agua de mar ha sido también satisfactoria.

De esta forma se comprueba que el método propuesto no sólo aporta sensibilidad, sino también un amplio rango lineal de aplicación así como la posibilidad de analizar muestras salinas, que son las que presentan mayores interferencias por otros métodos.

Tabla 2.29. Estudio comparativo de metodologías de análisis de Pb en aguas por AdCSV

Referencias	Reactivo (L)	Metal	Electrolito	Parámetros Electroquímicos	Límite Detección	Rango Lineal de Pb	Aplicación
Van Den Berg, 1986	Oxina ^a	Cu, Pb, Cd	[L]: 8-20 μ M pH: 7,5-8	Ea: -1,1 V ta: 1-10 min	0,24 nM Cu 0,3 nM Pb 0,12 nM Cd	0-60 nM	Agua de mar
Wang y col., 1993	o-cresolftalexón	Pb	[L]: 1 μ M pH: 4	Ea: 0,0 V ta: 120 seg	0,19 nM Pb	0-72,5 nM R ² = 0,999	Agua de bebida
Qingguo Wu y col., 1994	Naranja de xilenol (XO)	Pb	[L]: 10 μ M pH: 5	Ea: -1,2 V ta: 180 seg	0,03 nM Pb	0-34 nM	Agua de mar
Yokoi y col., 1995	Calceína azul ^b	Pb	[L]: 0,3 μ M pH: 6,5	Ea: -0,15 V ta: 60 seg	0,04 nM Pb	0-100 nM	Agua dulce
Colombo y col., 1997	DMG ^c y Oxina ^a	Cu, Pb, Cd, Ni	[L]: DMG: 200 μ M Oxina: 20 μ M pH: 7,7	Ea: -0,80 V ta: 60 seg	0,3 nM Cu 0,2 nM Pb 0,1 nM Cd 0,2 nM Ni	0-2,5 nM R ² = 0,997	Agua de mar
Fischer y col., 2001	Calceína azul ^b	Pb	[L]: 0,5 μ M pH: 7	Ea: -0,15 V ta: 90 seg	0,1 nM Pb	0-10 nM R ² = 0,996	Agua de lago
Ensafi y col., 2003	Rojo de pirogalol (PGR)	Pb	[L]: 3,8 μ M pH: 3,8	Ea: -0,80 V ta: 180 seg	0,3 nM Pb	0,5-145 nM R ² = 0,997	Agua de río y potable
Shams y col., 2004	Morina	Cu, Zn, Pb	[L]: 2 μ M pH: 4,0	Ea: -0,5 V ta: 60 seg	0,9 nM Cu 0,4 nM Pb 0,9 nM Zn	1,5-386 nM R ² > 0,99	Agua potable
Ensafi y col., 2006	Naranja de xilenol (XO)	Pb, Cd	[L]: 4 μ M pH: 5,5	Ea: -0,50 V ta: 30 seg	4,8 nM Pb 10,5 nM Cd	24-724 nM R ² = 0,999	Agua de río y potable
Arancibia y col., 2009	Derivado de morina ^d	Pb	[L]: 0,5 μ M pH: 3,2	Ea: -0,35 V ta: 60 seg	0,19 nM Pb	0,5-48,3 nM R ² = 0,999	Agua potable y agua de mar
Este trabajo	2-APSH^e	Pb	[L]: 9 μM pH: 5,6	Ea: -0,552 V ta: 120 seg	0,17 nM Pb	2,4-145 nM R² = 0,999	Agua de mar

a: 8-hidroxiquinolina; b: 8-[N,N-bis(carboximetil)amino-metil]-4-metilumbeliferona; c: dimetilglioxima; d: morina-5'-ácido sulfónico; e: 2-acetilpiridina saliciloilhidrazona

2.8. Conclusiones y perspectivas futuras

Con el desarrollo del presente método de análisis de Pb en muestras acuosas por AdCSV mediante complejación con 2-APSH se alcanza el objetivo principal que se pretendía con el presente trabajo: el estudio de la aplicabilidad de las aroilhidrazonas para la determinación de metales disueltos por AdCSV. Paralelamente, se ha constatado la aplicabilidad de las estrategias de estudio basadas en el diseño de experimentos simultáneos y secuenciales para el desarrollo de metodología de Voltamperometría de Redisolución Catódica Adsorbtiva.

Las principales aportaciones del método desarrollado en estas investigaciones se encuentran no sólo en la buena sensibilidad alcanzada, (0,17 nM de Pb), la cual se encuentra por debajo de las publicadas en fuentes bibliográficas para el plomo en agua de mar mediante AdCSV, sino también porque proporciona un nuevo agente complejante que puede ser empleado para los estudios de especiación química de metales mediante estrategias de competición entre ligandos.

Dentro de las perspectivas futuras de este trabajo se plantean como las más interesantes por sus buenas expectativas las que se enumeran a continuación:

A. Extender la aplicabilidad del método propuesto a electrodos que permitan incrementar su sensibilidad, como el electrodo de película de mercurio (MFE), o que representen un menor impacto para el medio ambiente, como el caso de los electrodos de película de bismuto (BFE).

B. Investigar la aplicación de la 2-APSH para el desarrollo de nuevos métodos, individuales y/o simultáneos por AdCSV para otros metales, como Zn, Ni o V.

C. Aplicar los resultados obtenidos al desarrollo de estudios de especiación metálica de plomo en aguas naturales (las fracciones de plomo biodisponibles) mediante los métodos de complejación por competición entre ligandos.

Referencias

- Arancibia, V., Nagles, E., Cornejo, S., **2009**. Determination of lead in the presence of morin-5'-sulfonic acid and sodium dodecyl sulfate by adsorptive stripping voltammetry. *Talanta* 80, 184-188.
- Bayne, C.K., Rubin, I.B., **1986**. Practical experimental designs and optimization methods for chemists. Deerfield Beach, Florida, USA. VCH Publishers, Inc.
- Box, G.E.P., Hunter, W.G., Hunter, J.S., **1989**. Estadística para Investigadores. Ed. Reverté, S. A., España.
- Colombo, C., Van den Berg, C.M.G., **1997**. Simultaneous determination of several metals in seawater using cathodic stripping voltammetry with mixed ligands. *Analytica Chimica Acta* 337, 29-40.
- Crompton, T.R. **1997**. Toxicants in aqueous ecosystems. Chichester (England). John Wiley & Sons.
- Domínguez, O., Sanlloriente, S., Arcos, M.J., **1999**. Application of an optimization procedure in adsorptive stripping voltammetry for the determination of chromium with diphenylcarbazide. *Química Analítica*, 18, 143-149.
- Ensafi, A.A., Khayamian, T., Atabati, M., **2003**. Differential pulse cathodic stripping adsorption voltammetric determination of trace amounts of lead using factorial design for optimization. *Talanta* 59, 727-733.
- Ensafi, A.A., Khayamian, T., Benvidi, A., Mirmomtaz, E., **2006**. Simultaneous determination of copper, lead and cadmium by cathodic adsorptive stripping voltammetry using artificial neural network. *Analytica Chimica Acta* 561, 225-232.
- Fischer, E., Van den Berg, C.M.G., **1999**. Anodic stripping voltammetry of lead and cadmium using a mercury film electrode and thiocyanate. *Analytica Chimica Acta* 385, 273-280.
- Fischer, E., Van den Berg, C.M.G., **2001**. Determination of lead complexation in lake water by cathodic stripping voltammetry and ligand competition. *Analytica Chimica Acta* 432, 11-20.
- Gallego, M., García-Vargas, M., Pino, F., Valcarcel, M., **1978**. Analytical applications of picolinealdehyde salicyloylhydrazone - spectrophotometric determination of nickel and zinc. *Microchemical Journal* 23, 353-359.
- Gallego, M., García-Vargas, M., Valcarcel, M., **1979a**. Analytical applications of picolinealdehyde salicyloylhydrazone. 2. Extraction and spectrophotometric determination of vanadium(V). *Microchemical Journal* 24, 143-149.
- Gallego, M., García-Vargas, M., Valcarcel, M., **1979b**. Pyridine-2-carbaldehyde 2-hydroxybenzoylhydrazone as a selective reagent for the extraction and spectrophotometric determination of iron(II). *Analyst* 104, 613-619.
- García Vargas, M., Gallego, M., de la Guardia, M., **1980**. Pyridine-2-acetaldehyde salicyloylhydrazone as an analytical reagent and its application to the determination of vanadium. *Analyst* 105, 965-973.
- García-Vargas, M., Bautista, J.M., de Toro, P., **1981**. Analytical possibilities of pyridine-2-acetaldehyde benzoylhydrazone as a chromogenic reagent. *Microchemical Journal* 26, 557-568.

García-Vargas, M., Hernández-Artiga, M.P., Pérez-Bustamente, J.A., **1984**. Liquid-liquid extraction with 2-acetylpyridinebenzoylhydrazone in the determination of traces of copper, nickel, cobalt and zinc by atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 157, 363-367

García-Vargas, M., Milla, M., Hidalgo, J.L., Bautista Rodríguez, J.M., **1987**. Spectral (u.v.-vis, i.r. and MS), electrochemical and metallochromic properties of 2-hydroxy-benzoylhydrazones of acetylpyridines. *Spectrochimica Acta* 43, 355-360.

Grasshoff K., Ehrhardt M., Kremling K., **1983**. *Methods of Seawater Analysis*, 2^a Ed., Verlag Chemie, Weinheim, p.491.

Hidalgo, J.L.; Milla, M.; García-Vargas, M., **1991**. Electrochemical behaviour and pulse polarographic determination of 2-hydroxy benzoylhydrazones of acetylpyridines. *Bulletin of Electrochemistry* 7 (12), 580-585.

IUPAC. **1997**. McNaught, A.D., Wilkinson, A. *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the "Gold Book"). Oxford. Blackwell Scientific Publications.

Job, P., **1928**. Formation and stability of inorganic complexes in solution. *Annales de Chimie* 9, 113-203.

Jurado-González, J.A., Galindo-Riaño, M.D., García-Vargas, M., **2003**. Experimental designs in the development of a new method for the sensitive determination of cadmium in seawater by adsorptive cathodic stripping voltammetry. *Analytica Chimica Acta* 487, 229-241.

Kamal, M.M., Abu Zuhri, A.Z., Hannoun, M.M., **1992**. Differential pulse polarography and voltammetry of di-2-pyridyl ketone benzoylhydrazone. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 344, 275-278.

Katyal, M., Dutt, Y., **1975**. Analytical applications of hydrazones. *Talanta* 22, 151-166.

Kirkbright, G.F., West, T.S., Woodward, C., **1965**. Spectrofluorometric determination of submicrogram amounts of aluminium and beryllium with 2-hydroxy-3-naphthoic acid. *Analytical Chemistry*, 37, 137-143.

Miller, J.N., Miller, J.C., **2002**. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. 4^a Edición. Madrid. Pearson Educación.

Mohan, M., Gupta, M.P., Chandra, L., Jha, N.K., **1988**. Synthesis, characterization and antitumour properties of some metal(II) complexes of 2-pyridinecarboxaldehyde 2'-pyridylhydrazone and related compounds. *Inorganica Chimica Acta* 151, 61-68.

Montgomery, D.C., **2001**. *Diseño y análisis de experimentos*. Mexico. Grupo Editorial Iberoamericana, S.A.

Moore, M.R., Goldberg, A., **1985**. *Dietary and Environmental Lead: Human Health Effects*, Elsevier, Amsterdam, p. 261.

Moore, M.R., **1986**. *Lead toxicity: History and Environmental Impact*, Johns Hopkins, University Press, Baltimore, p. 54.

Nelder, J.A., Mead, R., **1965**. A simplex method for function minimization. *Computer Journal* 7, 308-313.

Plackett R.L., Burman J.P., **1946**. "The design of optimum multifactorial experiments" en *Biometrika*. One hundred years by Titterton, D.M. & Cox, D.R., 33, 305-325. New York. Oxford University Press. 2001.

- Shams, E., Babaei, A., Soltaninezhad, M., **2004**. Simultaneous determination of copper, zinc and lead by adsorptive stripping voltammetry in the presence of Morin. *Analytica Chimica Acta* 501, 119-124.
- Shyam, K., Cosby, L.A., Sartorelli, A.C., **1985**. Synthesis and evaluation of N,N'-bis(arylsulfonyl)hydrazides as antineoplastic agents. *Journal of Medicinal Chemistry* 28, 525-527.
- Silva, M., Valcárcel, M., **1980a**. Spectrophotometric determination of microgram amounts of calcium in waters and foods using diphenylglyoxal bis-(2-hydroxybenzoyl hydrazone). *Analyst* 105, 193-202.
- Silva, M., Valcárcel, M., **1980b**. Spectrophotometric determination of indium(III) traces with diphenyl bis-salicyloylhydrazone and dipyridylglyoxal bis-salicyloylhydrazone. *Annales de Chimie* 76, 129-134.
- Singh, R.B., Jain, P., Singh, R.P., **1982**. Hydrazones as analytical reagents: a review. *Talanta* 29, 77-84.
- Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Crouch, S.R., **2005**. *Fundamentals of Analytical Chemistry* 8th Edition, International Thomson Editores.
- Spendley, W., Hext, G.R., Himsforth, F.R., **1962**. Sequential application of simplex in optimisation and evolutionary operation. *Technometrics* 4, 441.
- The Unscrambler 7.01, 1986-**1998**. CAMO ASA.
- Van den Berg, C.M.G., **1986**. Determination of copper, cadmium and lead in seawater by cathodic stripping voltammetry of complexes with 8-hydroxyquinoline. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 215, 111-121.
- Wang, J., Lu, J., Yarnitzky, C., **1993**. Highly sensitive and selective measurements of lead by stripping voltammetry/potentiometry following adsorptive accumulation of the lead-o-cresolphthalexon complex. *Analytica Chimica Acta* 280, 61-67.
- Wu, Q., Batley, G.E., **1995**. Determination of sub-nanomolar concentrations of lead in seawater by adsorptive stripping voltammetry with xylenol orange. *Analytica Chimica Acta* 309, 95-101.
- Yoe, J.H., Jones, A.L., **1944**. Colorimetric determination of iron with disodium-1,2-dihydroxybenzene-3,5-disulfonate, *Industrial and Engineering Chemistry* 16, 111-115.
- Yokoi, K., Yamaguchi, A., Mizumachi, M., Koide, T., **1995**. Direct determination of trace concentrations of lead in fresh water samples by adsorptive cathodic stripping voltammetry of a lead-Calcein Blue Complex. *Analytica Chimica Acta* 316, 363-369.

Capítulo 3:

*Aplicabilidad del ligando
2-HBBH en la determinación
simultánea de Cu, Pb, Cd y Bi por
AdCSV*

Capítulo 3: Aplicabilidad del ligando 2-HBBH en la determinación simultánea de Cu, Pb, Cd y Bi por AdCSV

Resumen

En este capítulo se estudia la aplicabilidad del reactivo 2-hidroxibenzaldehído benzoilhidrazona (2-HBBH) para la determinación de Cd(II), Cu(II), Pb(II) y Bi(III) mediante voltamperometría de redisolución catódica adsorptiva. La sensibilidad de las intensidades del pico de reducción de cada metal se ven incrementadas con la adición de 2-HBBH a las disoluciones metálicas, mostrando las características adsorptivas de los complejos. La respuesta electroquímica estuvo influenciada por diversas variables, destacando la influencia del pH, el electrolito soporte y el potencial de deposición sobre la selectividad y la sensibilidad. El empleo de este ligando permitió el análisis de trazas metálicas consiguiendo buenos límites de detección: $0,28 \mu\text{g L}^{-1}$ para Cd(II) a pH 10; $0,026 \mu\text{g L}^{-1}$ para Pb(II) a pH 9; $0,285 \mu\text{g L}^{-1}$ para Bi(III) a pH 8 y $0,051 \mu\text{g L}^{-1}$ para Cu(II) a pH 9,5. Igualmente se pudo aplicar este reactivo en las determinaciones simultáneas de los grupos de elementos, Cd(II)-Pb(II)-Cu(II) y Cd(II)-Pb(II)-Bi(III) a pH 9,5 y 9, respectivamente, con buena resolución y sensibilidad, estando el intervalo de linealidad comprendido entre $0,5$ y $14 \mu\text{g L}^{-1}$. La precisión de las determinaciones fue muy adecuada, con valores de desviación estándar relativa de 4,28% para Cd(II); 2,99% para Pb(II); 4,82% para Bi(III) y 1,35% para Cu(II) para una concentración de metal de $5 \mu\text{g L}^{-1}$. El método fue aplicado a la determinación simultánea de metales en agua de referencia certificada (TMDA-62) y muestras de agua sintética con resultados muy satisfactorios.

3.1. Introducción

Como se ha comentado en el capítulo anterior, los procedimientos electroanalíticos son muy adecuados para determinar trazas metálicas con gran sensibilidad en muestras de agua naturales, especialmente agua de mar [Locatelli, 2000]. En este capítulo se avanzará un paso más, aportando una nueva metodología para el análisis simultáneo de varias especies.

Como se ha indicado, la voltamperometría de redisolución catódica adsorbtiva (AdCSV) muestra numerosas ventajas en análisis medioambiental de aguas, tales como mínimo pretratamiento de la muestra, alta velocidad de análisis, buena respuesta con matriz salina, bajo coste y buena selectividad y sensibilidad [Jurado-González, 2003], pero una posible limitación es que algunas veces sólo uno o dos metales pueden ser determinados con un solo barrido, dependiendo de la especificidad por el metal del ligando empleado [Colombo, 1997].

Debido a ello, se han estudiado varios agentes complejantes en los últimos años para su aplicación en la formación previa de complejos metálicos durante el proceso adsorbtivo en AdCSV; no obstante sólo unos pocos estudios recogen la determinación simultánea de metales.

Cabe citar, el método propuesto por Constant M.G. Van den Berg en 1986, [Van den Berg, 1986] para la determinación simultánea de Cu(II), Cd(II) y Pb(II), por DP-AdCSV, empleando 8-hidroxiquinolina como ligando orgánico quelatante, pero la interferencia del Cu afectaba en gran medida al Pb.

El reactivo 8-hidroxiquinolina también fue empleado por Collado-Sánchez y colaboradores en 1996 para el análisis de Cu(II), Pb(II) y Cd(II) mediante AdCSV reduciendo los tiempos de análisis.

Limson y colaboradores en 1997 emplearon catecoles sustituidos para la determinación de Bi(III), Pb(II), Cu(II) y Cd(II) empleando en este caso, electrodo de película de mercurio [Limson, 1997], pero que tenía el inconveniente de carecer de mucha sensibilidad ($>5 \mu\text{g L}^{-1}$).

En este mismo año se propuso un método para el análisis multielemental de Cu(II), Pb(II), Cd(II) y Ni(II) en muestras de agua de mar empleando una mezcla de ligandos [Colombo, 1997]. Los límites de detección fueron de $0,02 \mu\text{g L}^{-1}$

para Cu(II), 0,04 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Pb, 0,012 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Cd y 0,013 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Ni, obtenidos usando una mezcla de dimetilglioxima y 8-hidroxiquinolina como ligando mediante AdCSV.

El método de Ensafi del 2000 empleaba amonio 2-amino-ciclopentano ditiocarboxilato para detectar Co(II), Cd(II) y Ni(II), pero con altos límites de detección (0,02 $\mu\text{g L}^{-1}$; 1,29 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$) respectivamente [Ensafi, 2000].

Con el fin de desarrollar un método alternativo para el análisis simultáneo de Cu(II), Zn(II) y Pb(II), Shams y col., presentaron en 2004 un método por AdCSV y electrodo HMDE empleando morina como ligando orgánico quelatante [Shams, 2004]. El método propuesto fue aplicado de manera satisfactoria para la determinación simultánea de estos tres metales pero únicamente en muestras de agua potable.

Uno de los más recientes es el de Ensafi y col., del 2006 [Ensafi, 2006] con el que desarrollaron un método para la determinación de Pb(II), Cd(II) y Cu(II) empleando naranja de xilenol como ligando orgánico aplicándolo de manera satisfactoria en muestras de agua de río y agua potable .

Así pues, existe un gran interés por encontrar nuevos ligandos con adecuadas propiedades complejantes, los cuales permitan determinaciones simultáneas de varios metales a nivel de traza.

En este sentido, las **hidrazonas** tienen interesantes propiedades que las hacen apropiadas para su aplicación como ligandos complejantes en la determinación de metales mediante AdCSV. Es por ello, por lo que este capítulo aborda el estudio de la aplicabilidad de la **2-hidroxibenzaldehído benzoilhidrazona (2-HBBH)** para el análisis simultáneo de metales.

Mediante una serie de estudios previos, metales tales como Cu(II), Pb(II), Cd(II) y Bi(III) produjeron señales electroquímicas mediante AdCSV empleando este reactivo.

El desarrollo de métodos de análisis de estos metales es muy interesante ya que por ejemplo, Pb y Cd son significativamente tóxicos para el medioambiente y Cu y Bi tienen gran interés biológico, ya que pueden ser enlazados a ligandos naturales. Así, incluso a bajas concentraciones, Pb y Cd son elementos clave por su toxicidad; y, Cu y Bi son importantes ya que pueden jugar un papel vital o tóxico, dependiendo de sus concentraciones y la naturaleza de los organismos

considerados. Cabe destacar que el análisis voltamperométrico de Cu y Bi por ASV es difícil ya que los potenciales de pico de ambos metales se encuentran cerca de la oxidación del mercurio, por lo que la señal de oxidación del electrodo se encuentra normalmente en la región de estos metales. Además, los voltamperogramas de redisolución anódica del Cu y Bi aparecen altamente solapados [Hajian, 2003].

Por todo ello, resulta muy interesante el desarrollo de nuevos métodos voltamperométricos para el análisis de estos metales en aguas. Así pues, se abordó el estudio de los principales parámetros químicos y electroanalíticos que afectan a la respuesta electroquímica por AdCSV empleando 2-HBBH, tales como: pH, composición del electrolito soporte, potencial de deposición y tiempo de deposición.

3.2. 2-Hidroxibenzaldehido benzoilhidrazona (2-HBBH)

Las hidrazonas han sido ampliamente usadas para la determinación espectrofotométrica y fluorimétrica de metales [Liu, 2006], siendo buenos reactivos analíticos debido a sus propiedades metalocrómicas [Zidan, 2003].

La 2-HBBH fue seleccionada por ser una de las importantes bases de Schiff que puede reaccionar con un amplio número de metales de transición [Sazanovich, 2003; Yuan, 2001; Lu, 2006] y formar numerosos complejos con los mismos, y hasta el momento no ha sido aplicada su capacidad de complejación para la determinación metálica por AdCSV, ni en el campo de los sensores ópticos, que se verá en capítulos posteriores.

3.2.1. Características estructurales de la 2-HBBH

Este reactivo, también conocido como salicilaldehido de la benzoilhidrazona (SBH), pertenece a la familia de las aroilhidrazonas caracterizada por la presencia del grupo triatómico C=N-N (fig. 3.1). Se trata de una importante base de Schiff, que reacciona con una gran variedad de metales de transición, siendo un buen agente quelatante. Es de destacar las interesantes actividades biológicas, propiedades fisicoquímicas y aplicaciones industriales que presenta [Jiang, 1997].

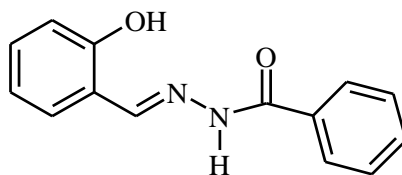


Figura 3.1. Estructura de la molécula 2-HBBH

Este ligando tiene tres grupos adecuados para formar enlaces de coordinación con metales de transición: el grupo hidroxilo fenólico, el nitrógeno del grupo azometino y el grupo carbonilo de la amida. La reactividad del primer grupo depende fuertemente del medio, estando involucrado en la coordinación de metales en medios neutros y básicos. De este modo, el grupo carbonilo de la amida y el nitrógeno del azometino juegan un papel más importante en la coordinación que el oxígeno fenólico cuando el grupo hidroxilo no está ionizado. En este caso, la 2-HBBH se comporta como ligando bidentado en medios ácidos, mientras que es un ligando mononegativo tridentado en medios básicos y ligeramente neutros [Lu, 2006]. Cuando la 2-HBBH actúa como ligando tridentado es a través del oxígeno del grupo hidroxilo, del nitrógeno del grupo azometino y del grupo carbonilo en su forma cetónica por los que forma complejo [Zidan, 2004; Ainscough, 1995].

Su solubilidad en agua es baja, pero posee dos funciones ácidas: OH (pK_a 6,77) y NH (pK_a 9,11) [Cordier, 2004].

El análisis de la molécula de 2-HBBH por espectroscopía de infrarrojos indica la presencia de las siguientes bandas vibracionales: $\nu(N-H) + \nu(O-H)$ 3175(w); $\nu(C=O)$ 1675(s); $\nu(C=N) + \text{amida(II)}$ 1620(m) [Ainscough, 1998]. Este ligando mostró una banda alrededor de 3400 y 3200 cm^{-1} , debido a la tensión de los enlaces entre O-H y N-H de los grupos OH y NH libres, respectivamente. Estas bandas no aparecen en el complejo metálico, lo cual sugiere la desprotonación del grupo fenólico y la coordinación a través del oxígeno fenólico y la enolización del grupo carbonilo, seguido de desprotonación [Sreeja, 2005].

3.2.2. Características voltamperométricas de la 2-HBBH

Puesto que el pH ejerce una influencia muy notable en los procesos redox de la molécula de 2-HBBH, modificando los potenciales de reducción de sus

centros electroactivos, se han llevado a cabo una serie de experimentos para la determinación de los potenciales a los que aparecen las señales voltamétricas del compuesto en función del pH del medio (figura 3.2).

En estos estudios se utilizó una concentración de 2-HBBH de $5,48 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ y un potencial de deposición de -0,8 V, ajustando el pH con distintas disoluciones de HNO₃ o NaOH.

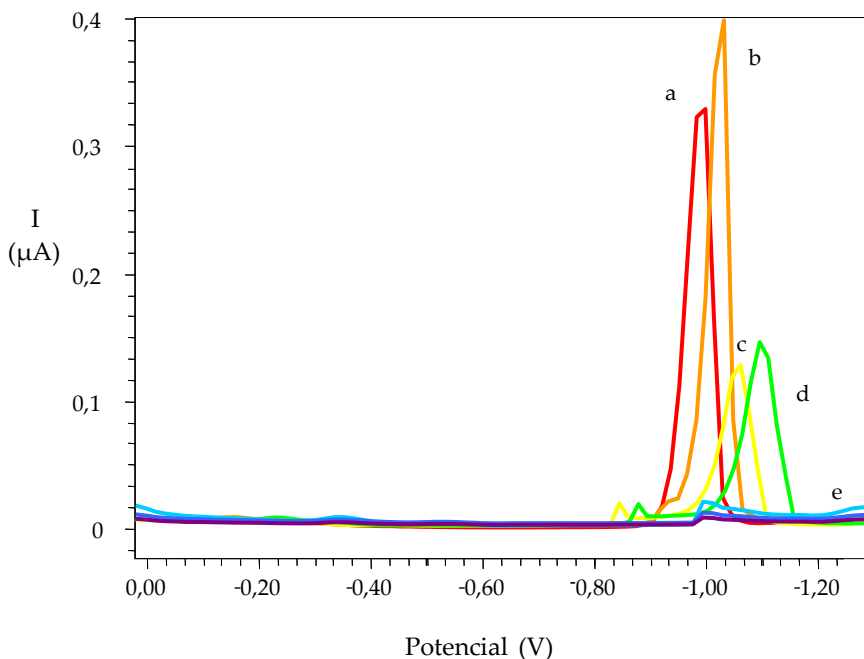


Figura. 3.2. Voltamperogramas correspondientes a disoluciones de 2-HBBH ($5,48 \times 10^{-6}$ M) a diferentes valores de pH: a) pH = 4; b) pH = 5; c) pH = 6; d) pH = 7; e) pH = 8, 9 y 10 por AdCSV

El comportamiento electroquímico de este reactivo fue estudiado en el rango de pH de 4 a 10. En la figura 3.2 se han registrado los voltamperogramas correspondientes. Se observa como el ligando presenta un pico catódico alrededor de -1,0 V, el cual se desplaza hacia valores más negativos a medida que el pH aumenta (-1,2 V a pH 10). También se observa como aparece otro pequeño segundo pico a pH 7. El desplazamiento del pico catódico a potenciales más negativos indica que los protones están involucrados en el proceso de reducción. En disoluciones ácidas, se produce la reducción del grupo azometino (C=N)

mediante una transferencia de 4 electrones, dando lugar al primer pico. A $\text{pH} > 7$, se produce la reducción del 2-hidroxibenzaldehído formado mediante la hidrólisis de la hidracida, en cuyo caso participan dos electrones en la reacción de reducción dando lugar al segundo pequeño pico. Se puede decir que en la primera reducción se consumen dos protones y uno sólo en la segunda reducción. El grupo $\text{C}=\text{O}$ permanece inactivo durante la reducción [Temerk, 1979].

3.3. Comportamiento electroquímico de diferentes metales en presencia de 2-HBBH

Con el fin de identificar las características de partida más adecuadas para iniciar las investigaciones con la 2-HBBH, se hacía necesario realizar una serie de estudios preliminares del comportamiento electroquímico de diferentes metales en presencia de este reactivo.

Para encontrar aquellos metales pesados que diesen lugar a complejos metálicos con la 2-HBBH y en consecuencia una adecuada señal electroquímica, se comenzó este estudio registrando los correspondientes voltamperogramas de diversos metales de interés medioambiental como el Tl(I), Cd(II), Cu(II), Ni(II), Pb(II), Bi(III), Co(II) y Zn(II).

Estos estudios previos se llevaron a cabo preparando una disolución de 25 mL totales conteniendo $5,48 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de 2-HBBH disuelta en etanol, reguladora Britton-Robinson $0,12 \text{ mol L}^{-1}$ y $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de metal. En todos los casos la disolución preparada debía contener un total de 0,5 mL de etanol (bien procedente del reactivo o bien tras añadir etanol absoluto a la disolución), con el fin de mantener la constante dieléctrica del electrolito soporte.

Se detectaron señales electroquímicas de una gran sensibilidad que crecían con las adiciones, para los complejos de Cu(II)-, Cd(II)-, Bi(III)- y Pb(II)- en presencia de este 2-HBBH, demostrando las excelentes características adsorptivas que presenta este reactivo con los iones metálicos. Durante la etapa de preconcentración los complejos metal-ligando eran acumulados sobre el electrodo de trabajo, debido a las características adsorptivas del complejo y durante el barrido, los iones metálicos de los complejos adsorbidos eran reducidos a metales elementales.

Mediante estos estudios iniciales, se observó una señal que aparecía a diferentes potenciales según el pH estudiado en el caso del Cu(II). A pH básicos la señal se obtenía alrededor de -0,45 V, la cual sufría desplazamientos hacia la izquierda del voltamperograma cuando se trabajaba a pH ácidos (figura 3.3).

La señales voltamperométricas correspondientes al Pb(II) y al Cd(II) aparecían a -0,55 V y -0,70 V, respectivamente, observándose un aumento de la señal con la concentración creciente de dichos metales (figura 3.3).

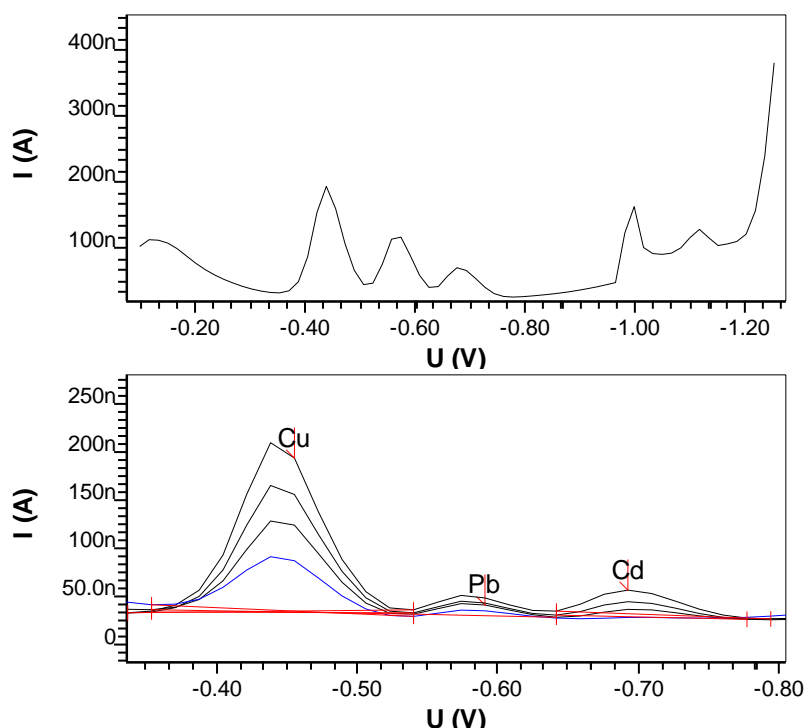


Figura. 3.3. Voltamperogramas correspondientes a disoluciones de 2-HBBH ($5,48 \times 10^{-6}$ M) y $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu, Pb y Cd, a pH 9,5 por AdCSV

El Bi(III) fue otro de los metales estudiados que mostró señal electroquímica al añadir 2-HBBH a la disolución. Este metal daba señal en la zona alrededor de -0,4 V, donde también aparecía el Cu(II) (figura 3.4).

Es de destacar como el pico correspondiente al proceso de reducción de la 2-HBBH (ver figura 3.2) aparecía a potenciales más negativos (-1,0 V) por lo que no

se produce solapamiento con los picos catódicos de estos metales. Además, de estos estudios previos se pudo comprobar como en ausencia de ligando no aparecían señales correspondientes a los iones metálicos o bien eran demasiado pequeñas. De esta forma, las sensibilidades de los picos de reducción de los metales se veían claramente incrementadas mediante la adición de 2-HBBH a la disolución metálica.

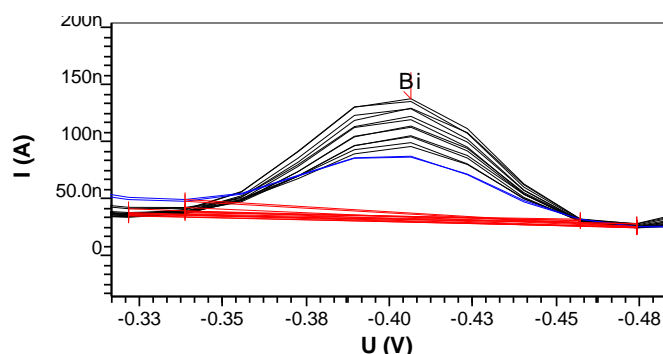


Figura. 3.4. Voltamperograma correspondiente a una disolución de 2-HBBH ($5,48 \times 10^{-6}$ M) y $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Bi, a pH 9 por AdCSV

Para el caso de Co(II), Ni(II) y Zn(II) no se observaron picos en todo el voltamperograma estudiado, posiblemente debido al solapamiento con el pico del reactivo en la zona donde normalmente aparecen estos metales (-1,0 V). Para el caso del Tl(I) se pudo detectar un pequeño pico al mismo potencial donde aparecía el pico de Pb(II), pero tanto al emplear reactivo como sin el uso del mismo se observaba la misma pequeña señal.

De esta forma, se decidió estudiar la aplicabilidad de este ligando orgánico como agente complejante en la determinación tanto individual como simultánea de Cu(II), Cd(II), Pb(II) y Bi(III) por AdCSV.

Es de destacar como el trabajo realizado en este capítulo no se basa únicamente en el desarrollo de una nueva metodología de análisis, como en el capítulo anterior. En este caso el interés se focaliza además en el estudio completo de un nuevo reactivo orgánico con excelentes características complejantes para diversos cationes metálicos, como es la 2-HBBH, con el fin de definir los intervalos más adecuados de trabajo así como la optimización de las variables de estudio más

relevantes, para poder trabajar con cada uno de los complejos metálicos, ya sea de manera individual como simultánea.

3.4. Optimización de las variables

Se vio en el capítulo anterior que la finalidad de cualquier optimización es descubrir las condiciones que producen mejor respuesta. En este caso, el sistema se ha optimizado siguiendo una serie de experimentos univariantes de las variables más significativas del sistema, controlando la influencia en la respuesta experimental de un factor cada vez. Con este esquema de trabajo, se identifica el valor de una variable en el que la respuesta alcanza el máximo o mínimo para, posteriormente, realizar el mismo proceso sobre la siguiente variable, manteniendo la primera de ellas en su zona óptima, y así sucesivamente con todas las variables que se desean estudiar.

Como ya se ha comentado, en esta investigación el interés radica en el estudio de la aplicabilidad de la 2-HBBH en AdCSV, la cual no había sido empleada como reactivo orgánico en esta técnica. Por ello, se decidió encontrar las condiciones que producían mejor respuesta empleando en este caso una estrategia de estudio univariante para conocer de forma versátil el comportamiento de cada metal.

Para conseguir las condiciones óptimas de los análisis individuales y simultáneos de estos metales, se evaluaron los efectos que producían los parámetros: pH, electrolito soporte, potencial de deposición y tiempo de deposición sobre las señales electroquímicas, a temperatura ambiente con $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de metal y $5,48 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ 2-HBBH disuelta en etanol. Esa concentración de ligando tan alta (alrededor de 100 veces más que la de metal) ayuda a la rápida formación del complejo.

Se seleccionaron esos parámetros de estudio debido a que suelen ser las variables de mayor relevancia en los estudios electroquímicos y las que influyen en mayor medida sobre la señal electroanalítica.

La tabla 3.1 muestra el resto de las condiciones de análisis de estos experimentos previos.

Tabla 3.1. Variables instrumentales utilizadas en los estudios previos para el análisis de Cd, Pb, Cu y Bi por AdCSV con 2-HBBH

Restantes condiciones de análisis	
Electrodo	HMDE
Modo	DP
Calibración	Adición estándar
Tamaño de gota	9 a.u.
Velocidad de agitación	2000 rpm
Salto de potencial	0,017 V
Intervalo de tiempo para el salto de potencial	0,050 s
Amplitud de impulso	-0,070 V
Tiempo de impulso	0,040 s
Tiempo de agitación y purga	100 s
Tiempo de equilibración	10 s

La optimización univariante se llevó a cabo observando la respuesta del sistema (intensidad de la señal) al modificar una variable, y manteniendo fijo el valor de las restantes. De forma sucesiva se estudiaron todos los parámetros de interés.

3.4.1. Efecto del pH

Para este estudio se modificó el pH del electrolito entre 2 y 10 empleando disolución reguladora Britton-Robinson $0,12 \text{ mol L}^{-1}$, y se midieron las intensidades de los picos AdCSV para Cd(II), Pb(II), Bi(III) y Cu(II) usando $-0,8 \text{ V}$ como potencial de deposición y 120 s como tiempo de deposición.

En las figuras 3.5 y 3.6, se ha representado no sólo la intensidad obtenida a los distintos pH sino también el potencial al que se observa cada uno de los picos con el fin de detectar posibles solapamientos en el voltamperograma.

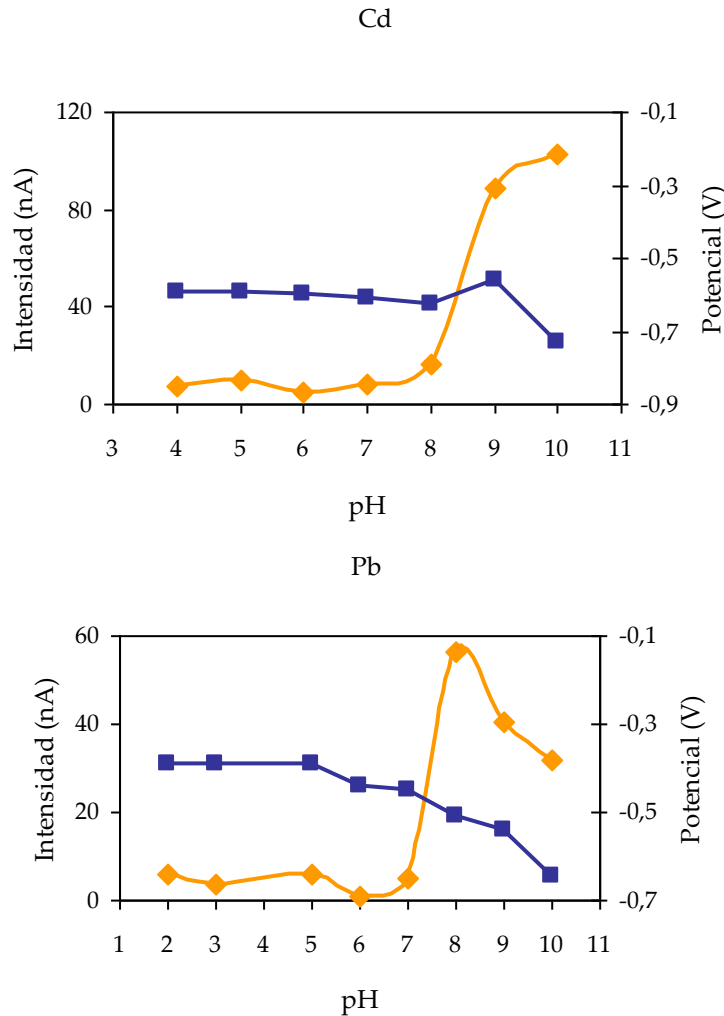


Figura 3.5. Influencia del pH del electrolito soporte en la intensidad de pico (◆) y el potencial de pico (■) para: Cd(II) y Pb(II). Condiciones: $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de metal, $5,48 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ 2-HBBH disuelta en etanol y disolución reguladora Britton-Robinson $0,12 \text{ mol L}^{-1}$

Debido a que las intensidades más altas se obtuvieron en la zona de pH de 6 a 10, se pudo establecer este rango de pH como el óptimo para llevar a cabo la determinación de estos metales. Como puede apreciarse, el pico de Cd(II) crece a medida que el pH aumenta hasta pH 9 - 10; el pico de Pb(II) alcanza su máximo a pH 8; la señal de Bi(III) crece con el pH hasta un valor de 9 disminuyendo de nuevo a pH más altos; mientras que el Cu(II) fue más sensible para la región de 6 a 10, disminuyendo ligeramente hacia pH 10.

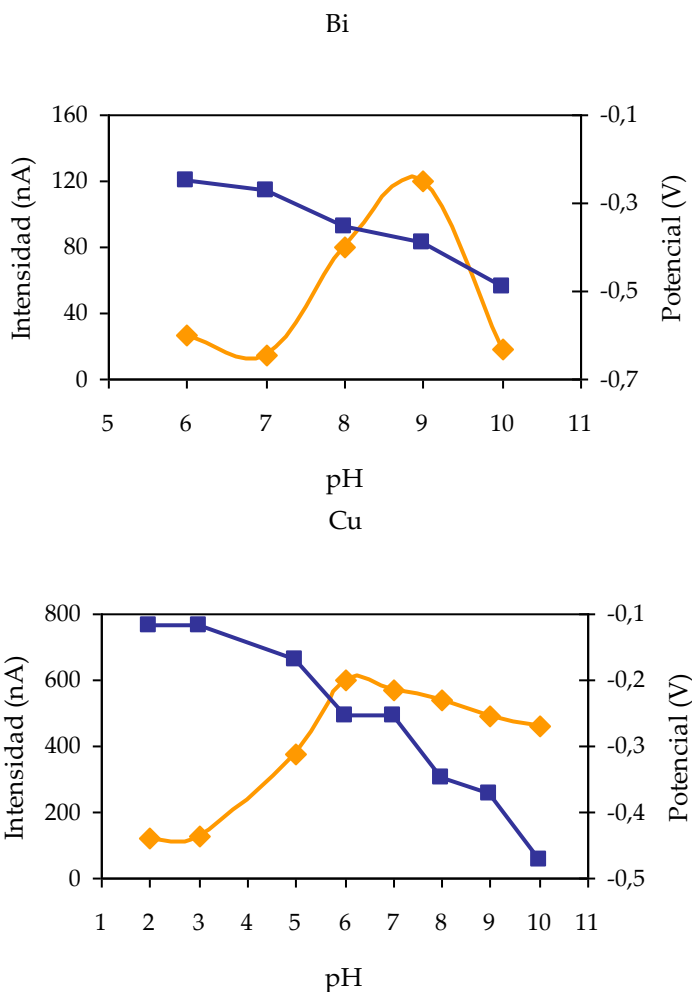


Figura 3.6. Influencia del pH del electrolito soporte en la intensidad de pico (◆) y el potencial de pico (■) para: Bi(III) y Cu(II). Condiciones: $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de metal, $5,48 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ 2-HBBH disuelta en etanol y disolución reguladora Britton-Robinson $0,12 \text{ mol L}^{-1}$

Los picos de Bi(III) y Cd(II) no se detectaron por debajo de pH 6 y 4, respectivamente. El resto de picos se detectaban bien en el amplio rango de valores de pH. Por otro lado, observando los valores de potenciales a los que aparecen las señales de los metales en el voltamperograma, cabe destacar como Cu(II) y Bi(III) pueden solaparse en el rango de pH 6 – 10 si se analizan simultáneamente. Por lo que de aquí en adelante se prestará especial atención a la separación de ambos picos.

3.4.2. Efecto del electrolito soporte

Después del estudio de pH sobre la intensidad del pico de metal, se probaron diferentes disoluciones reguladoras como electrolito soporte. Este estudio fue desarrollado para determinar si la presencia de aniones inorgánicos y orgánicos en el electrolito podía modificar la señal voltamperométrica, debido a la formación de compuestos solubles en el electrodo o de compuestos metálicos solubles en la disolución durante las etapas electroquímicas. Además, debido a que el solapamiento de las señales de Bi(III) y Cu(II) se había convertido en unos de los objetivos de interés, el estudio del electrolito soporte también se realizó para intentar encontrar un medio en el que ambas señales no solaparan.

Se trabajó en la región de pH entre 6 y 10, ya que esta zona fue la que proporcionó las intensidades más altas en el apartado anterior. Para ello se emplearon disoluciones de 0,3 mol L⁻¹ de cloruro amónico/amoniaco, 0,12 mol L⁻¹ de Britton-Robinson, 0,01 mol L⁻¹ de HEPES y 0,01 mol L⁻¹ de PIPES.

Las figuras 3.7 y 3.8 muestran los resultados obtenidos empleando disoluciones conteniendo 5 µg L⁻¹ de metal, 5,48 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ de 2-HBBH y las diferentes reguladoras, usando -0,8 V como potencial de deposición y 120 s como tiempo de deposición.

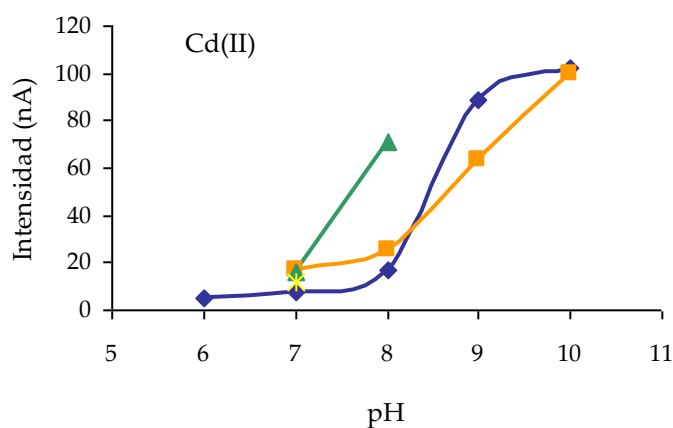


Figura 3.7. Influencia de la composición del electrolito soporte en la intensidad de pico para Cd(II) empleando diferentes tampones: (◆) Britton-Robinson; (■) NH₄Cl/NH₃; (▲) HEPES; y (*) PIPES

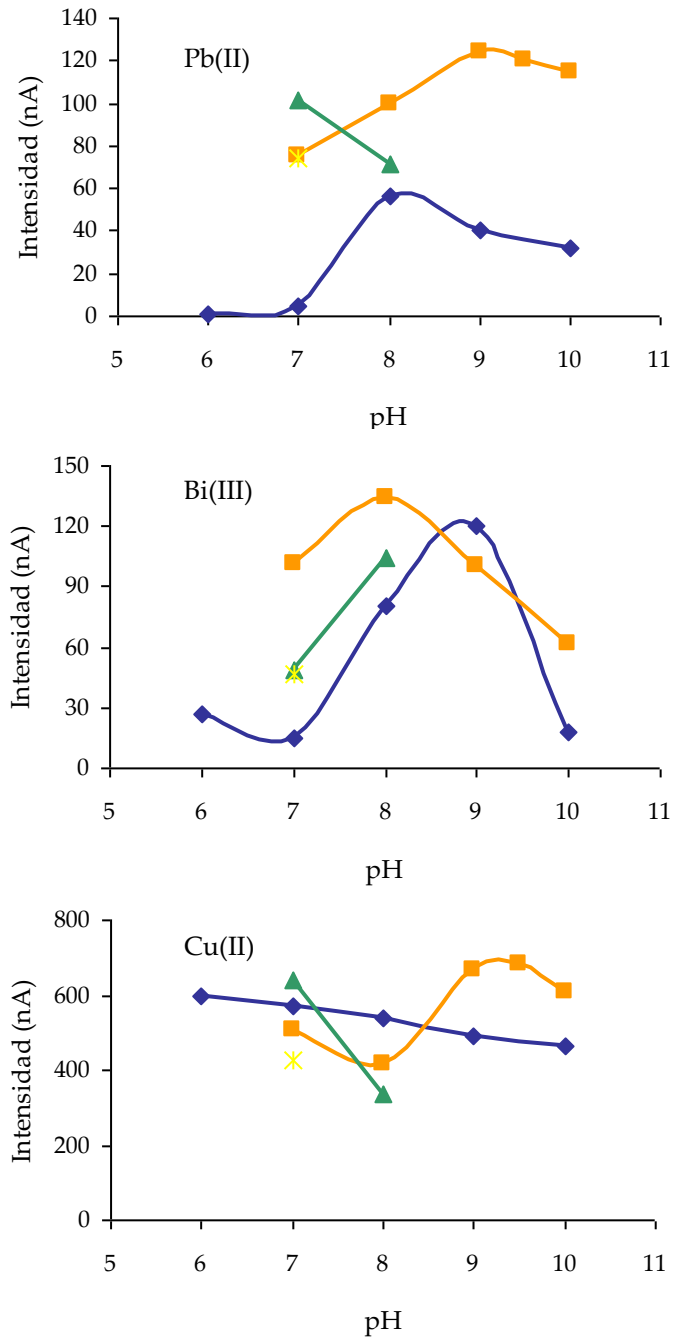


Figura 3.8. Influencia de la composición del electrolito soporte en la intensidad de pico para Pb(II), Bi(III) y Cu(II) empleando diferentes tampones: (◆) Britton-Robinson; (■) $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$; (▲) HEPES; y (*) PIPES

La reguladora de cloruro amónico/amoniaco fue la que proporcionó las mejores respuestas para los cuatro metales estudiados. La tabla 3.2 detalla los valores de pH obtenidos con esta reguladora que producen las intensidades más elevadas para cada metal así como el potencial de medida para cada uno de ellos.

Se observa como las señales de Cu(II) y Bi(III) están más cercanas pudiendo dar lugar a picos solapados más fácilmente si las concentraciones metálicas son significativamente elevadas.

Tabla 3.2. Valores de pH empleando reguladora cloruro amónico/amoniaco que producen intensidades más altas para cada metal y potencial de medida de cada uno de ellos

Metal	pH	E _p : Potencial de medida (V)
Cd(II)	10	-0,728
Pb(II)	9	-0,542
Cu(II)	9,5	-0,406
Bi(III)	8	-0,339

En la tabla 3.3 se ha comparado esta proximidad en los potenciales de medida para el caso de Bi(III) y Cu(II) para cada disolución reguladora estudiada, en el rango de pH de 6 a 10. Como puede observarse, la separación entre picos es parecida para los valores de pH estudiados, siendo ligeramente mayor si se utiliza la disolución de cloruro amónico/amoniaco a pH 7. Aún así, no es una separación suficiente como para no producirse el solapamiento de las señales.

Tabla 3.3. Potenciales de medida (V) para las señales de Cu(II) y Bi(III) empleando diferentes tipos de reguladoras

Disolución reguladora	E _m Cu(II) E _m Bi(III)				
	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10
B-R	-0,254	-0,254	-0,350	-0,373	-0,474
	-0,250	-0,271	-0,356	-0,390	-0,491
NH ₄ Cl/NH ₃		-0,271	-0,322	-0,406	-0,491
		-0,220	-0,339	-0,390	-0,457
HEPES		-0,288	-0,322		
		-0,271	-0,356		
PIPES		-0,288			
		-0,254			

3.4.3. Efecto del potencial de deposición

Otra variable importante a estudiar es el efecto del potencial de deposición. Para ello, los metales se han dividido en dos grupos realizando las determinaciones simultáneas a dos pH diferentes, por un lado para Cd(II), Pb(II) y Cu(II) a pH 9,5 y por otro para Cd(II), Pb(II) y Bi(III) a pH 9, usando NH₄Cl/NH₃ como disolución reguladora. Estos pH se han seleccionado empleando un valor intermedio entre los valores más adecuados para cada metal del conjunto formado. El potencial de deposición que se aplicó fue de -1,0; -0,8 y -0,6 V, realizando el barrido voltamperométrico desde -0,1 hasta -1,25 V. La tabla 3.4 muestra las intensidades (*I*) y potenciales de medida (*E_m*) obtenidas en este estudio utilizando una concentración de 5 µg L⁻¹ de metal, 5,48 × 10⁻⁶ mol L⁻¹ de 2-HBBH y 0,3 mol L⁻¹ de NH₄Cl/NH₃ en la celda electroquímica y fijando un tiempo de deposición de 120 s.

Tabla 3.4. Efecto del potencial de deposición sobre la intensidad de medida en las determinaciones simultáneas de Cu, Pb y Cd a pH 9,5 y Bi, Pb y Cd a pH 9

pH	Intensidad (nA)*			
	E _a /V	I Cu	I Pb	I Cd
pH 9,5	-1,0	645 (-0,455)	126,6 (-0,557)	67,3 (-0,693)
	-0,8	680,8 (-0,456)	127,6 (-0,574)	109,1 (-0,693)
	-0,6	513,3 (-0,455)	123,3 (-0,574)	2,8 (-0,693)
pH	Intensidad (nA)			
	E _a /V	I Bi	I Pb	I Cd
pH 9	-1,0	135,8 (-0,405)	86,2 (-0,557)	68,7 (-0,659)
	-0,8	142,35 (-0,405)	113,9 (-0,557)	66,7 (-0,660)
	-0,6	77,8 (-0,405)	52,2 (-0,557)	Sin señal

*(Los valores indicados entre paréntesis corresponden a los potenciales de medida de cada una de los metales en V)

No se observaron variaciones significativas de las intensidades de la señal en el caso del Pb(II) a pH 9,5 y para Cd(II) a pH 9 a diferentes potenciales de deposición. Para Cu(II) y Cd(II) a pH 9,5 y para Bi(III) y Pb(II) a pH 9, las intensidades alcanzaron su valor máximo a -0,8 V de potencial de deposición. En lo que respecta a los potenciales de medida a los que aparecen los picos, éstos mostraron muy pequeñas variaciones con esta variable.

Para los siguientes experimentos, se utilizó como potencial de deposición el valor de -0,8 V. Este potencial es más negativo que el potencial de medida de cada uno de los metales, por lo que el posible mecanismo que se propone para la preconcentración de los metales sobre el electrodo y su posterior redisolución consistiría en las siguientes etapas. En primer lugar, se produce la acumulación del metal en la gota de mercurio debido a que al aplicar el potencial de deposición más negativo, los metales estudiados se reducen y amalgaman en la gota, difundiendo hacia el interior de la misma. Posteriormente, cuando se comienza el barrido voltamperométrico se produce la oxidación del metal debido al valor más positivo del potencial inicial del barrido (-0,1 V) durante el período de equilibración (10 s). Durante este tiempo, el ión metálico difunde hacia el exterior de la gota de mercurio donde es retenido mediante complejación con la 2-HBBH en su superficie. Finalmente, el barrido voltamperométrico de reducción hacia potenciales más negativos produce de nuevo la reducción de los metales registrándose la correspondiente señal electroquímica. Este tipo de mecanismo ya ha sido descrito en la bibliografía [Suciu, 2000].

Por otro lado, como anteriormente se ha mencionado, bismuto y cobre presentaron efectos de solapamiento en la determinación simultánea. Así, el efecto del potencial de deposición fue estudiado también para conseguir una mejor separación de los picos de Cu(II) y Bi(III), empleando $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ a pH 7. Como ya se ha comentado en el apartado anterior, este valor de pH se seleccionó después de experiencias previas con diferentes disoluciones reguladoras a distintos valores de pH, el cual proporcionaba la mayor separación de los picos. En este caso, el potencial de deposición fue variado de -1,0 a +0,4 V. Este estudio también mostró el valor de -0,8 V como el potencial de deposición que proporcionaba mejor separación de los picos (tabla 3.5).

Tabla 3.5. Efecto del potencial de deposición en la intensidad de la señal para Cu(II) y Bi(III) a pH 7

E_d (V)	-1,0	-0,8	-0,6	-0,4	0	+0,2	+0,4
E_m Cu	-0,254	-0,271	-0,254	-0,254	-0,254	----	----
E_m Bi	-0,271	-0,220	-0,254	-0,254	-0,271	----	----

En estas condiciones, los potenciales de medida de los picos obtenidos fueron: $E_m = -0,271$ V para Cu(II) y $E_m = -0,220$ V para Bi(III). Tal y como ya se ha indicado, esta separación puede no ser suficiente si los incrementos en concentraciones metálicas aumentan la altura/anchura del pico. En tales casos, el análisis simultáneo de Bi(III) en presencia de Cu(II) o viceversa requeriría una calibración multivariante aplicando modelos tales como Redes Neuronales Artificiales (Artificial Neural Networks: ANN) o regresión por mínimos cuadrados parciales (Partial least squares: PLS).

3.4.4. Efecto del tiempo de deposición

El efecto del tiempo de deposición sobre la señal de redisolución para los metales estudiados se evaluó en el rango de 30 - 180 s a dos pH diferentes del electrolito soporte según la determinación simultánea a realizar, es decir, para Cd(II)-Pb(II)-Cu(II) a pH 9,5 y para Cd(II)-Pb(II)-Bi(III) a pH 9 (figura 3.9).

Para el desarrollo del experimento se trabajó con una concentración de $4 \mu\text{g L}^{-1}$ de metal, $5,48 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de 2-HBBH y $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ en la celda electroquímica y fijando un potencial de deposición de $-0,8$ V.

La intensidad de pico para todos los metales aumentaba inicialmente con el incremento del tiempo de preconcentración hasta 120 - 150 s, excepto para Cu(II) que parecía seguir creciendo. Este metal mostró valores de intensidad muy altos (valores cercanos a 1000 nA empleando un tiempo de deposición de 180 s) y parece más afectado por el tiempo de deposición. Por el contrario, para los picos de Pb(II), Cd(II) y Bi(III) a pH 9 se observó una baja influencia con el aumento del tiempo de deposición.

Para los siguientes experimentos, se eligió un valor de 120 s para evitar largos tiempos de análisis. En cualquier caso, para los casos en los que se desee

obtener una mayor sensibilidad para el pico de Cu(II), ésta puede ser aumentada mediante el empleo de un tiempo de deposición mayor.

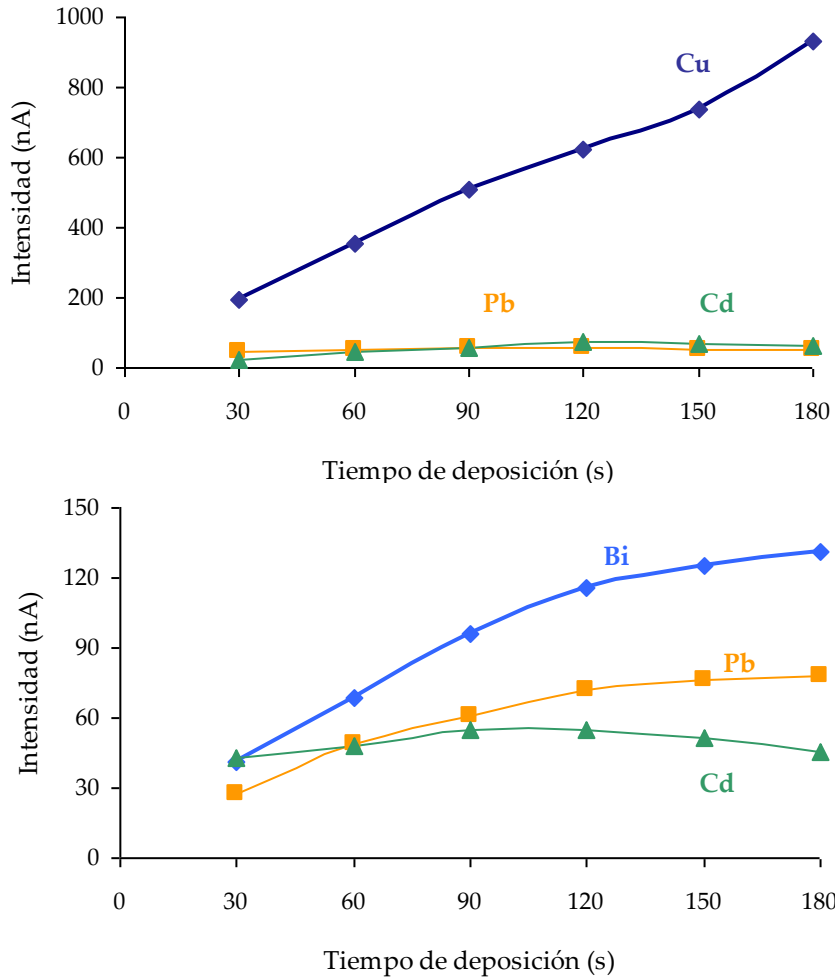


Figura 3.9. Influencia del tiempo de deposición en las intensidades de pico para el análisis simultáneo de Cd(II)-Pb(II)-Cu(II) (a pH 9,5) y Cd(II)-Pb(II)-Bi(III) (a pH 9)

3.5. Aplicabilidad de la 2-HBBH al análisis de muestras con Cu y Bi por AdCSV

Dado que no era posible analizar simultáneamente Cu y Bi por este método, se estudió la posibilidad de analizar una muestra de agua con ambos metales mediante sucesivos análisis. Así, y teniendo en cuenta los resultados del

efecto del pH obtenidos para Cu(II) usando disolución de Britton-Robinson, donde la intensidad de la señal también era adecuada a pH menores, se abordó realizar un cambio en la disolución reguladora usando tampón ácido acético/acetato sódico a pH ligeramente ácido de 4 a 5,5. Estas nuevas intensidades del pico de Cu(II) se presentan en la figura 3.10. Como puede observarse, la señal voltamperométrica de Cu(II) empleando esta reguladora se incrementaba a medida que el pH disminuía. Lo más destacado era que el pico de Bi(III) desaparecía en este tampón de acetato, por lo que este medio permite la detección de Cu(II) en presencia de Bi(III) sin ningún tipo de interferencia. Aplicando el método en medio básico se obtendría una señal suma de ambos metales, que permitiría determinar la concentración total en la muestra. Por diferencia de estas concentraciones se podría calcular la concentración de bismuto en la muestra problema. Por tanto, el método puede ser aplicado a este tipo de muestras.

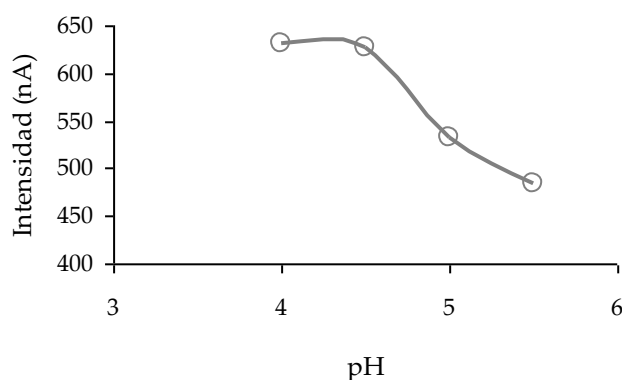


Figura 3.10. Influencia del pH del electrolito soporte ácido acético/acetato sódico en la intensidad de pico de Cu(II)

Como conclusión, tanto la detección individual de los metales estudiados como la determinación simultánea de los grupos de elementos Cd(II)-Pb(II)-Cu(II) y Cd(II)-Pb(II)-Bi(III) puede ser llevada a cabo. Las determinaciones simultáneas son realizadas a pH 9,5 y pH 9 respectivamente, siendo el pH seleccionado un valor intermedio entre las condiciones óptimas de estos grupos de metales. Y por otro lado, combinando el empleo del electrolito en medio básico y ácido, los análisis de Cu(II), en presencia de Bi(III), pueden ser realizados a pH 4.

3.6. Condiciones óptimas y mecanismo de redisolución

En la tabla 3.6 se detallan las condiciones de las variables obtenidas para llevar a cabo los análisis individuales y simultáneos de Cu(II), Cd(II), Pb(II) y Bi(III) empleando 2-HBBH por AdCSV con electrodo HMDE y adiciones estándar.

Tabla 3.6. Condiciones óptimas para el análisis de Cu, Cd, Pb y Bi por AdCSV empleando 2-HBBH

Variable	Valores
pH	pH 9,5 para Cu sin interferencia de Bi
	pH 4 para Cu con interferencia de Bi
	pH 10 para Cd
	pH 9 para Pb
	pH 8 para Bi sin interferencia de Cu
	pH 9,5 para Cu, Cd y Pb
	pH 9 para Bi, Cd y Pb
Disolución reguladora básica	Cloruro amónico/Amoníaco (0,3 M)
Disolución reguladora ácida	Ácido acético/Acetato sódico (0,3 M)
[2-HBBH]	5,48·10 ⁻⁶ M
Ea: Potencial de deposición (V)	-0,8
Ta: Tiempo de deposición (s)	120
Amplitud de impulso (V)	-0,070
Salto de potencial (V)	0,017
Intervalo de tiempo para el salto de potencial (s)	0,050
Tiempo de impulso (s)	0,040
Tamaño de gota (u.a.)	9
Velocidad de agitación (rpm)	2000
Amplitud de impulso (V)	-0,070
Tiempo de agitación y purga (s)	100
Tiempo equilibración (s)	10

En la figura 3.11 se pueden observar los voltamperogramas obtenidos para cada una de las determinaciones simultáneas.

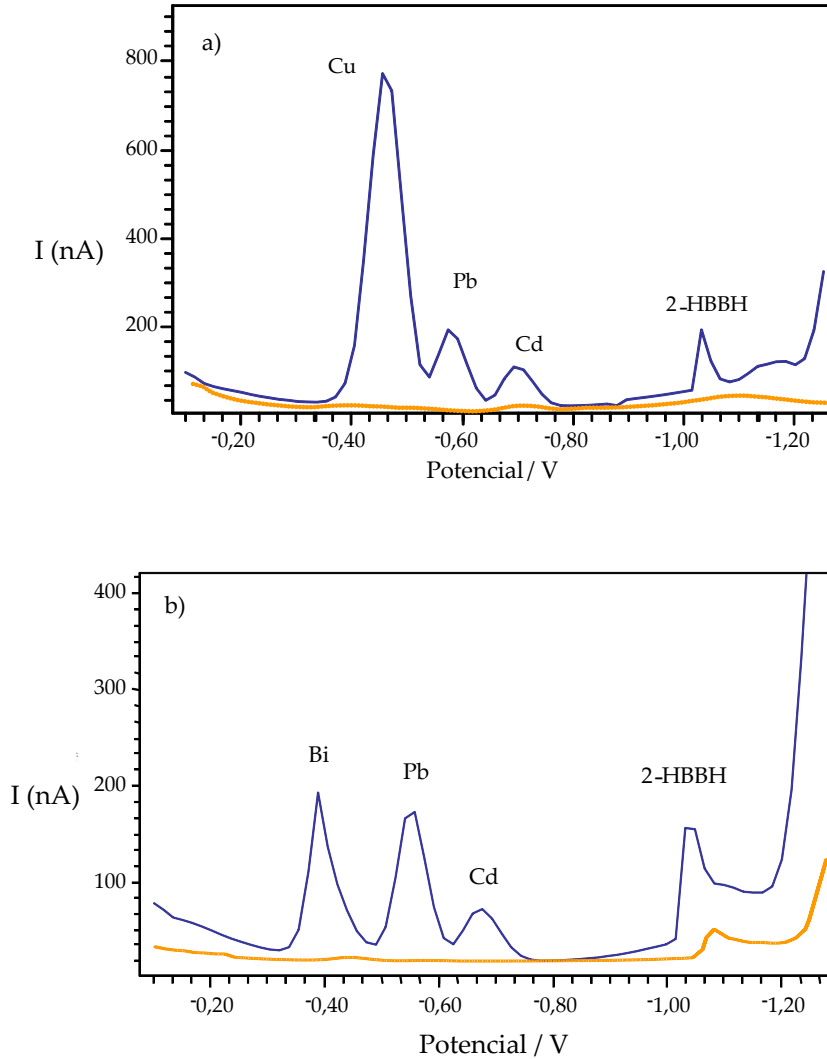


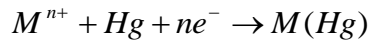
Figura 3.11. Voltamperogramas simultáneos de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de (a) Cd(II)-Pb(II)-Cu(II) a pH 9,5 and (b) Cd(II)-Pb(II)-Bi(III) a pH 9 en presencia (—) y ausencia (—) de 2-HBBH

Observando más detenidamente los voltamperogramas de cada uno de los grupos de elementos, se puede ver como los potenciales de reducción de los metales se encuentran en el rango de -0,40 V a -0,70 V, más concretamente: -0,47 V

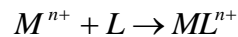
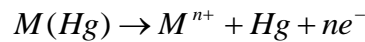
para el Cu; -0,58 V para el Pb; el Cd aparece a -0,70 V y el Bi a -0,40 V. Por lo que el potencial que se aplica, -0,8 V, es más negativo que cada uno de los potenciales estándar de reducción de los metales estudiados. Esto implica que en la etapa de acumulación todos los metales van a encontrarse reducidos en su forma metálica en la gota.

Como ya se explicó en el capítulo 1, existen varias modalidades de voltamperometría de redisolución en función de las etapas de acumulación y determinación. Además se comentó como existen también métodos que incluyen una etapa intermedia entre la de acumulación y la de redisolución. En este caso, se puede proponer el siguiente mecanismo de redisolución, descrito en la bibliografía [Fogg, 1994, Suci, 2000] cuando se dan estas circunstancias:

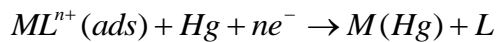
1) Acumulación (Catódica):



2) Paso intermedio (Anódico y químico):



3) Redisolución (Catódica):



(siendo una medida directa de M^{n+})

En la primera etapa, al aplicar un potencial de deposición de -0,8 V, todos los metales se reducen y amalgaman en la gota de Hg. A continuación, los metales se oxidan al aplicar el potencial inicial del barrido voltamperométrico (-0,1 V) durante el tiempo de equilibración (10 s). Debido a esta oxidación, los iones metálicos empiezan a difundir hacia fuera de la gota de mercurio, pero quedan retenidos en su superficie por la presencia del ligando en la disolución. Ambas especies formarán un complejo que se adsorberá en la gota. Finalmente, mediante el barrido hacia potenciales negativos se produce de nuevo la reducción del metal quedando éste amalgamado en la gota y pasando el ligando a la disolución.

Debido a que este método sigue un mecanismo distinto al procedimiento usual de voltamperometría catódica adsortiva, el tiempo de equilibración podría ser un parámetro adicional a tener en cuenta. Sin embargo, tras una serie de

experiencias empleando diferentes tiempos de equilibración (desde 10 hasta 40 s) para cada uno de los grupos de elementos, no se observaron grandes mejoras con el aumento de este parámetro.

3.7. Parámetros analíticos

Después de optimizar la señal correspondiente al Cd(II), Cu(II), Pb(II) y Bi(III) tanto de manera individual como simultánea, se ha procedido a evaluar la viabilidad de este sistema como método analítico para la determinación de los mencionados metales en aguas naturales. Para ello, se han estudiado los parámetros característicos que definen a un método analítico: intervalo de linealidad y límites de detección para análisis individuales, rangos lineales y límites de detección para determinaciones simultáneas, reproducibilidad, interferencias y aplicabilidad del método.

3.7.1. Análisis individuales

3.7.1.1. Rangos lineales y límites de detección

Para verificar la relación lineal entre las intensidades de pico y las concentraciones de metal, se han realizado las cinco curvas de calibración bajo las condiciones óptimas para cada metal individualmente, después de 120 s de tiempo de acumulación, usando -0,8 V como potencial de deposición y realizando dos réplicas de cada medida. Para Cu(II), se usaron dos valores de pH para evaluar la calibración con electrolitos ácidos y básicos, que serán de aplicación dependiendo de si existe la interferencia mutua con Bi(III) o no.

Las curvas de calibración se muestran a continuación en las figuras 3.12, 3.13, 3.14, 3.15 y 3.16.

Los coeficientes de correlación obtenidos fueron mayores de 0,99, indicando en todos los casos que la relación entre intensidad y concentración era lineal en el rango de concentraciones de 0,5 - 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Cd(II), Pb(II), Bi(III) y Cu(II) en medio básico, y en el rango de 0,5 - 12 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Cu(II) en medio ácido.

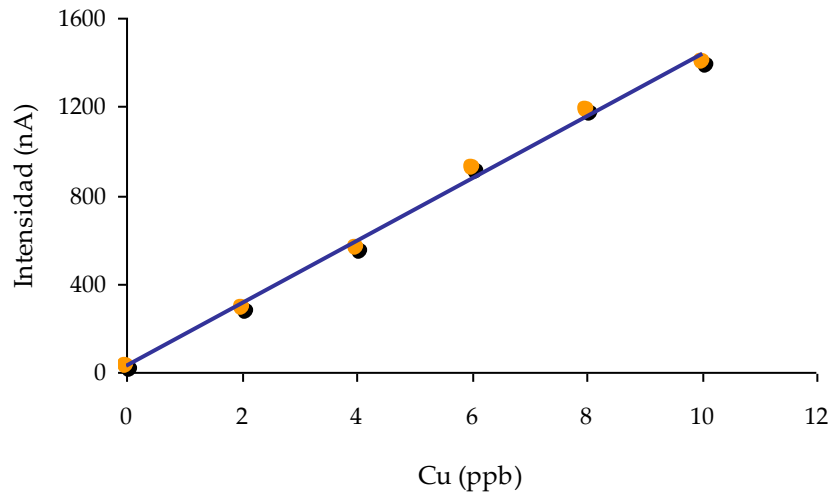


Figura 3.12. Curva de calibración para el análisis individual de Cu(II) a pH 9,5

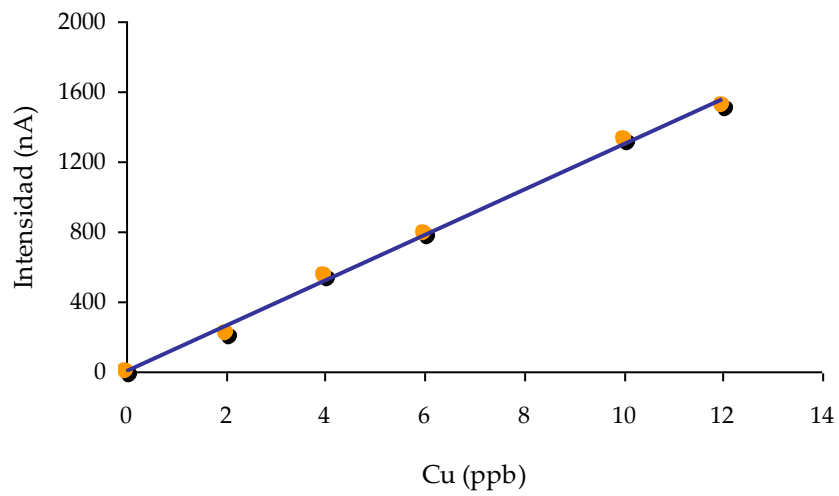


Figura 3.13. Curva de calibración para el análisis individual de Cu(II) a pH 4

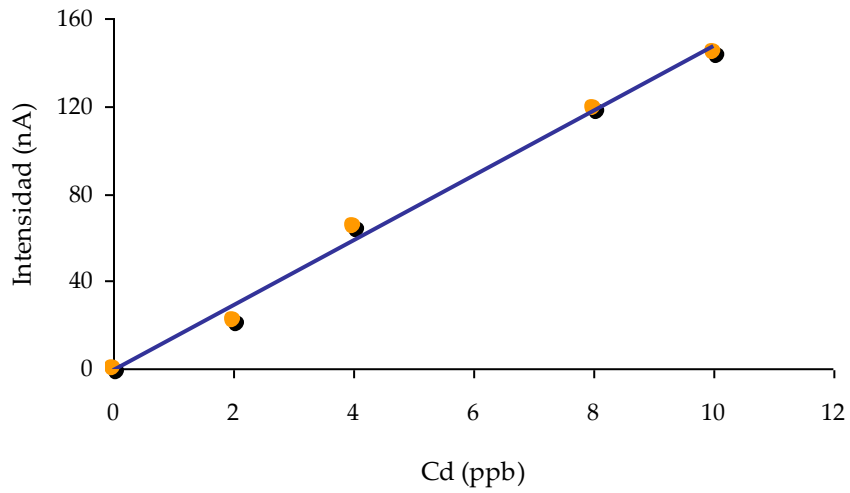


Figura 3.14. Curva de calibración para el análisis individual de Cd(II) a pH 10

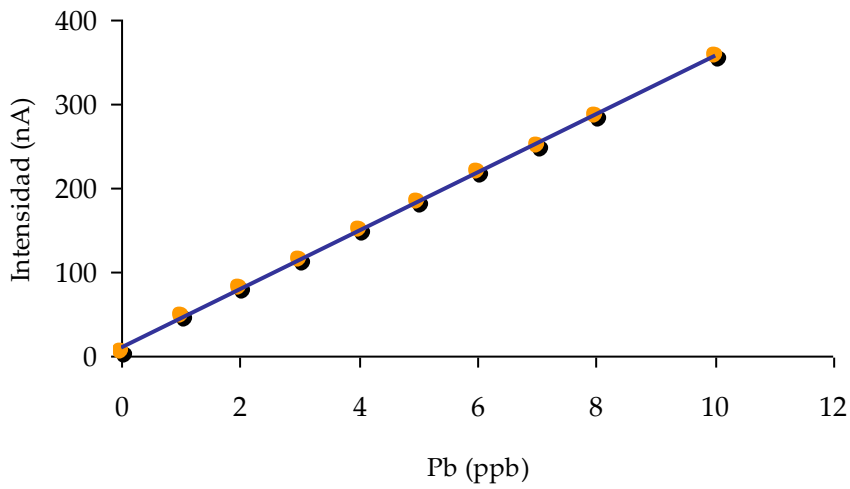


Figura 3.15. Curva de calibración para el análisis individual de Pb(II) a pH 9

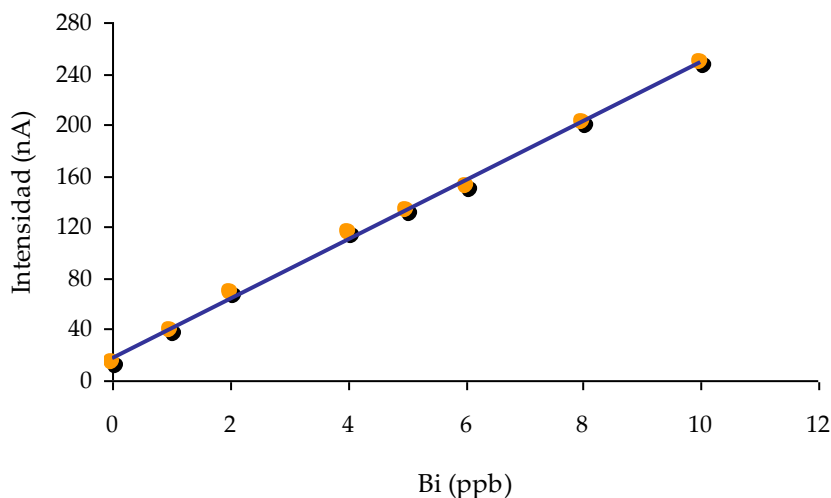


Figura 3.16. Curva de calibración para el análisis individual de Bi(III) a pH 8

Se evaluaron los límites de detección del método para cada uno de estos iones. El límite de detección LD se define como $3\sigma/m$ (donde σ es la desviación estándar del blanco y m la pendiente de la curva de calibración).

Por tanto se realizaron cinco réplicas del blanco, calculando este parámetro en cada caso. Los límites de detección obtenidos fueron 0,28; 0,026 y 0,285 $\mu\text{g L}^{-1}$ para cadmio, plomo y bismuto, respectivamente. En el caso del ion cobre se obtuvieron los límites de detección de 0,051 y 0,038 $\mu\text{g L}^{-1}$ para cobre a pH 9,5 y 4, respectivamente.

Estos valores eran muy satisfactorios y adecuados para el análisis de trazas. Las diferencias entre pendientes para los iones estudiados, pueden justificarse, entre otras razones, debido a las diferencias en las constantes de formación de los complejos con 2-HBBH. Todos estos resultados se muestran en la tabla 3.7.

3.7.1.2. Reproducibilidad

Para estudiar la reproducibilidad de estos análisis se realizaron las medidas de cinco disoluciones conteniendo 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de metal dando lugar a intensidades de pico muy reproducibles.

En la tabla 3.8 se han incluido las intensidades de pico media obtenidas para cada metal individual así como las desviaciones estándar relativa (RSD).

Tabla 3.7. Parámetros analíticos obtenidos para el análisis individual de Cd(II), Pb(II), Bi(III) y Cu(II)

Parámetro	Metal	pH ^a	Pendiente (nA µg ⁻¹ L)	Ordenada en el origen (nA)	R ²	Rango lineal (µg L ⁻¹)	Límite de detección (µg L ⁻¹)
Análisis individual	Cd(II)	10	14,77	-0,92	0,994	0,5 - 10	0,280
	Pb(II)	9	34,74	+9,415	0,999	0,5 - 10	0,026
	Bi(III)	8	23,09	+17,74	0,995	0,5 - 10	0,285
	Cu(II)	9,5	141,60	+23,92	0,996	0,5 - 10	0,051
	Cu(II)	4	129,49	-1,45	0,998	0,5 - 12	0,038

a. Tampón ácido, ácido acético/acetato sódico 0,3 mol L⁻¹; Tampón básico, NH₄Cl/NH₃ 0,3 mol L⁻¹

Tabla 3.8. Intensidades y RSD obtenidas para el análisis individual de Cd(II), Pb(II), Bi(III) y Cu(II) (C_M= 5 µg L⁻¹)

Metal	pH del electrolito	Intensidad (nA)	RSD (%)
Cd(II)	10	141,5 ± 6,1	4,28
Pb(II)	9	187,8 ± 65,6	2,99
Bi(III)	8	185,1 ± 8,9	4,82
Cu(II)	9,5	717,2 ± 9,7	1,35

3.7.2. Análisis simultáneos

Como se ha comentado anteriormente, tiene gran interés el desarrollo de métodos de análisis simultáneos, ya que pocas metodologías por AdCSV han sido empleadas para la determinación de varios metales a la vez, sobre todo desde el punto de vista medio ambiental.

Dado que la aplicación de la 2-HBBH en AdCSV permite la detección de dos grupos de metales, Cd(II), Cu(II) y Pb(II) por un lado y Cd(II), Pb(II) y Bi(III) por otro, se han determinado los parámetros analíticos para ambos grupos.

3.7.2.1. Rangos lineales y límites de detección del análisis de Cd(II)-Pb(II)-Cu(II)

En este caso se estudiaron las tres curvas de calibración para cadmio, plomo y cobre, mediante el uso de adiciones simultáneas de estos iones metálicos a pH 9,5, seleccionado anteriormente como la mejor condición para el electrolito soporte. Además, se aplicó para las medidas 120 s como tiempo de acumulación y -0,8 V como potencial de deposición. Las curvas de calibración se muestran en la figura 3.17.

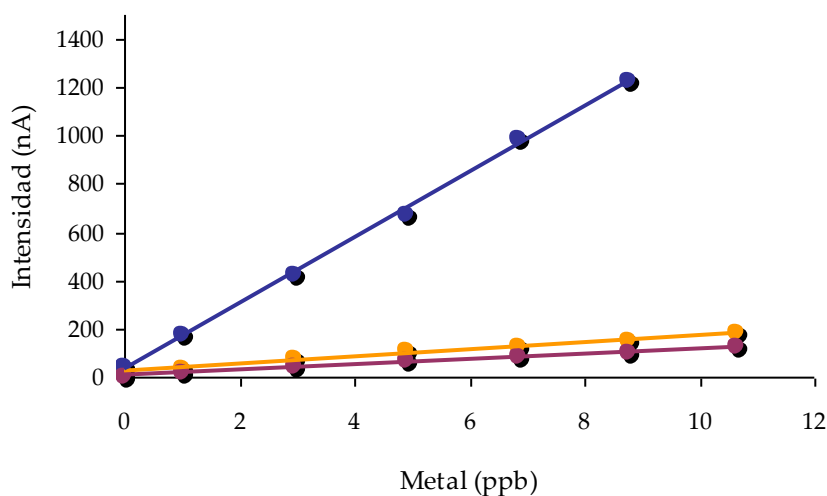


Figura 3.17. Curvas de calibración para el análisis simultáneo de Cd(II), Pb(II) y Cu(II) a pH 9,5

Los datos de la calibración se han incluido en la tabla 3.9. Las curvas de calibración fueron lineales en el rango de 0,5 - 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ para cadmio y plomo, y de 0,5 - 9 $\mu\text{g L}^{-1}$ para cobre, con límites de detección de 0,107, 0,170 y 0,053 $\mu\text{g L}^{-1}$ para cadmio, plomo y cobre, respectivamente. Las pendientes obtenidas para análisis simultáneo fueron similares a aquellas obtenidas en el análisis individual. Sólo Pb(II) mostró una pendiente ligeramente más baja, probablemente porque los picos de respuesta estuvieron afectados significativamente por el pH de la disolución reguladora. Puede comprobarse también como el método es muy sensible para el cobre.

Tabla 3.9. Parámetros analíticos obtenidos para el análisis simultáneo de Cd(II), Pb(II) y Cu(II)

Determinación simultánea:	pH ^a	Pendiente (nA·μg ⁻¹ L)	Ordenada en el origen (nA)	R ²	Rango lineal (μg·L ⁻¹)	Límite de detección (μg·L ⁻¹)
Cd(II)	9,5	11,31	+5,29	0,975	0,5 - 10	0,107
Pb(II)		14,81	+23,06	0,985	0,5 - 10	0,170
Cu(II)		136,58	+29,99	0,998	0,5 - 9	0,053

a: Tampón: NH₄Cl/NH₃ 0,3 mol L⁻¹

Finalmente, la figura 3.18 presenta los voltamperogramas obtenidos con los picos de respuesta de estos metales.

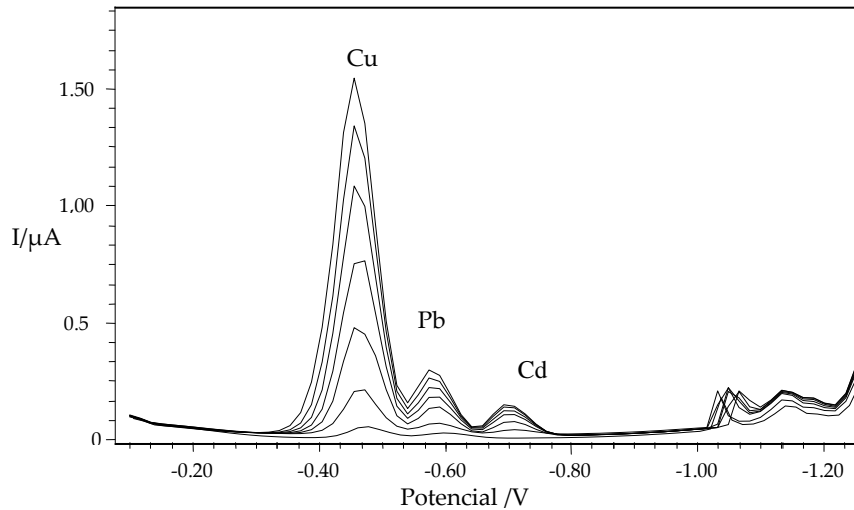


Figura 3.18. Voltamperogramas obtenidos para el análisis simultáneo de Cd(II)-Pb(II)-Cu(II) (a pH 9,5)

3.7.2.2. Rangos lineales y límites de detección del análisis de Cd(II)-Pb(II)-Bi(III)

De la misma forma, se estudiaron las tres curvas de calibración para cadmio, plomo y bismuto mediante el uso de adiciones simultáneas de iones

metálicos a pH 9, siendo la mejor condición para el electrolito. Igualmente, se emplearon 120 s como tiempo de acumulación y -0,8 V como potencial de deposición. Las curvas de calibración se muestran en la figura 3.19.

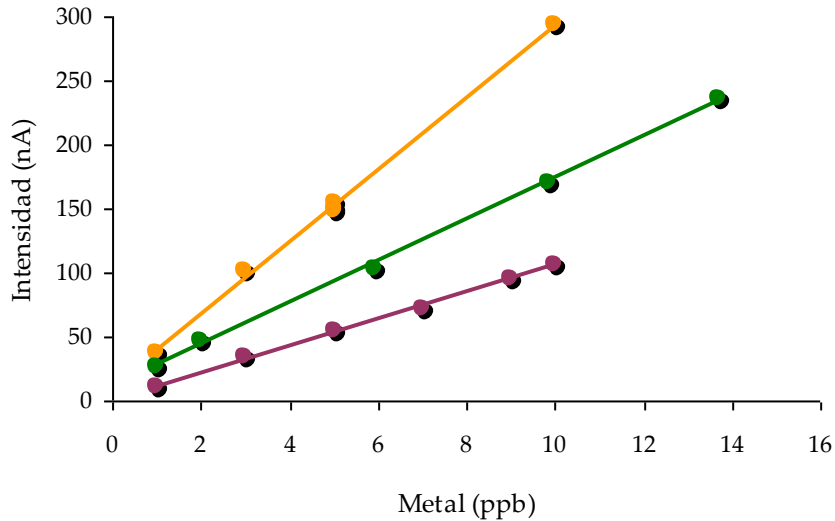


Figura 3.19. Curvas de calibración para el análisis simultáneo de Cd(II), Pb(II) y Bi(III) a pH 9

Los datos de la calibración se muestran en la tabla 3.10. Las curvas de calibración fueron lineales en el rango estudiado de 0,5 - 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ para cadmio y plomo y 0,5 - 14 $\mu\text{g L}^{-1}$ para bismuto, con límites de detección de 0,032; 0,018 y 0,173 $\mu\text{g L}^{-1}$ para cadmio, plomo y bismuto, respectivamente. Las pendientes del análisis individual fueron del mismo orden de magnitud que aquellas obtenidas mediante análisis simultáneo.

Tabla 3.10. Parámetros analíticos obtenidos para el análisis simultáneo de Cd(II), Pb(II) y Bi(III)

Determinación simultánea:	pH ^a	Pendiente ($\text{nA}\cdot\mu\text{g}^{-1}\text{L}$)	Ordenada en el origen (nA)	R ²	Rango lineal ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Límite de detección ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
Cd(II)	9	10,54	+1,11	0,996	0,5 - 10	0,032
Pb(II)		28,11	+11,89	0,995	0,5 - 10	0,018
Bi(III)		16,39	+10,79	0,998	0,5 - 14	0,173

a: Tampón: $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ 0,3 mol L^{-1}

Finalmente, se presenta el voltamperograma obtenido con los picos de respuesta de estos tres metales en la figura 3.20.

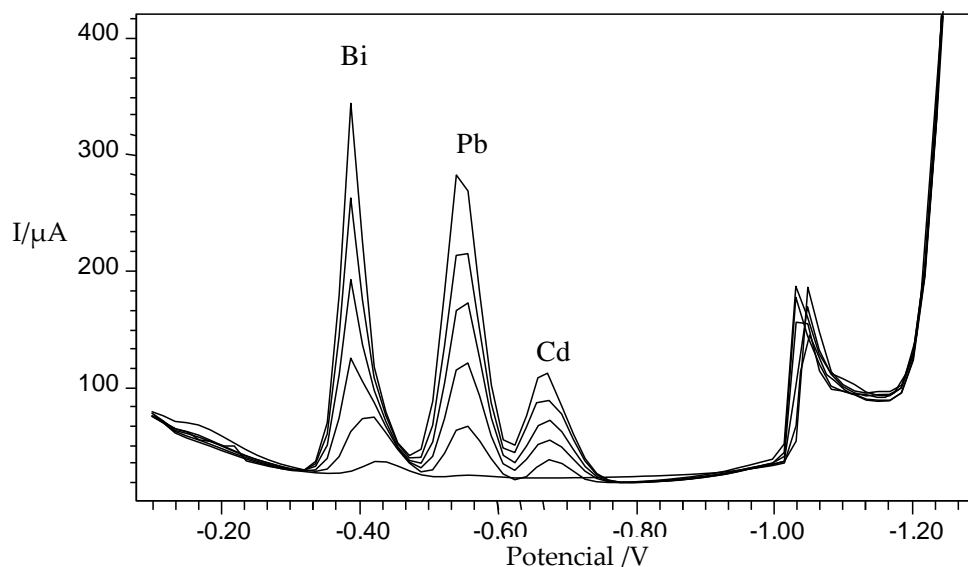


Figura 3.20. Voltamperogramas obtenidos para el análisis simultáneo de Cd(II)-Pb(II)-Bi(III) (a pH 9)

3.8. Interferencias

Con objeto de estudiar las posibles interferencias de otros metales en la señal voltamperométrica de redisolución catódica adsorbtiva de cadmio, plomo, bismuto y cobre, se realizó la adición de posibles iones interferentes, tales como zinc y níquel, los cuales son capaces también de formar complejo con la 2-HBBH. Los resultados mostraron que el método estaba libre de interferencias metálicas.

La única interferencia ya mencionada en estas determinaciones, fue la presencia simultánea de cobre y bismuto, con solapamiento de los picos de ambos en los voltamperogramas. Esto implica que no es posible la determinación simultánea de estos dos metales uno en presencia del otro por el método electroanalítico propuesto. Sin embargo, la determinación de Cu(II) en presencia de Bi(III) ha sido resuelta usando el electrolito a pH 4 y el Bi(III) puede ser evaluado por diferencia. Este problema ya ha sido mencionado en otros artículos

de la bibliografía. Por ejemplo, existe un método para la determinación de bismuto en presencia de cobre basado en la acumulación de Bi(III) sobre la superficie de un electrodo modificado químicamente conteniendo 1-(2-piridilazo)-2-naftol [Dong, 1991]. También, mediante la adición de un exceso de yodina, la interferencia de cobre puede ser superada, aunque en tales métodos no resuelven la determinación de ambos. Por el contrario, con el método propuesto en este artículo, se puede determinar Cu(II) en presencia de Bi(III) sólo mediante la modificación del pH del electrolito.

3.9. Aplicabilidad del método

La validación del método propuesto mediante AdCSV usando 2-HBBH fue evaluada mediante el análisis de una muestra de referencia certificada (CRW): agua enriquecida del lago Ontario (TMDA-62). Esta muestra contiene diferentes metales incluyendo Cu(II), Pb(II), Cd(II) y Bi(III), entre otros. Para resolver la presencia simultánea de cobre y bismuto, el método propuesto fue aplicado, como se ha indicado anteriormente, mediante el uso de dos etapas: en primer lugar, la concentración de Cu(II) fue evaluada a pH 4, y a continuación, se analizaron de forma simultánea las señales de Bi(III)+Cu(II), Pb(II) y Cd(II) a pH 9. La concentración de Bi(III) en la muestra fue determinada por diferencia con la concentración de Cu(II). Se analizaron cuatro réplicas del material de referencia después de su digestión UV con peróxido de hidrógeno al 30% Suprapur (Merck, Darmstadt, Germany).

Además, el método fue aplicado a la determinación de dos muestras sintéticas diferentes:

- 1) Muestra sintética A: con Cu(II)-Pb(II)-Cd(II)
- 2) Muestra sintética B: con Bi(III)-Pb(II)-Cd(II)

Puede comprobarse en los resultados mostrados en la tabla 3.11 como los datos obtenidos en el análisis de la muestra de CRW y de las muestras sintéticas, presentaron buenas recuperaciones de los iones metálicos, mostrando la aplicabilidad satisfactoria del método propuesto.

Tabla 3.11. Determinación de Cd(II), Pb(II), Cu(II) y Bi(III) en una muestra de referencia certificada y en muestras de agua sintéticas (n=4)

Muestra	Concentración certificada/adicionada				Concentración encontrada			
	(µg L ⁻¹)				(µg L ⁻¹)			
	Cd(II)	Pb(II)	Cu(II)	Bi(III)	Cd(II)	Pb(II)	Cu(II)	Bi(III)
TMDA-62 ^a	89,9±8,69	98,7±10,9	106±10,7	50 ^b	95,1±4,9	89,3±7,2	100,6±1,6	47,8±7,1
Muestra sintética 1	2,0	1,2	0,8	---	1,84±0,09	1,71±0,91	0,78±0,05	---
Muestra sintética 2	1,0	0,6	---	0,4	1,13±0,09	0,63±0,07	---	0,45±0,04

a: Muestra de referencia certificada (agua enriquecida del lago Ontario)

b: Valor estimado

Como puede comprobarse, todas las concentraciones encontradas mediante el método propuesto se encuentran dentro de los intervalos reales o certificados. La tabla 3.12 incluye los errores relativos del análisis de la muestra de referencia certificada.

Tabla 3.12. Errores relativos (%) entre el valor real y el obtenido para la muestra de referencia

Muestra	Errores relativos (%)			
	Cd(II)	Pb(II)	Cu(II)	Bi(III)
TMDA-62	5,78	-9,50	-5,14	-4,3

Cobre, cadmio y plomo presentan errores relativos ligeramente elevados, por lo que se ha estudiado si existe una diferencia estadística significativa entre las medias de los resultados reales y los calculados. Para ello se ha procedido de la misma manera que en el capítulo 2 mediante la estimación de la *t de Student*, comparándola con el valor de la *t tabulada* para un 5% de probabilidad y 1 grado de libertad (ya que se han realizado 2 repeticiones para cada muestra). En la tabla

3.13 pueden observarse los resultados obtenidos para el caso de la muestra de referencia.

Tabla 3.13. Valores de la *t* de Student calculados y tabulados para la muestra TMDA-62

TMDA-62	t calculado	t ₁ tabulado (5%)
Cu(II)	4,95	12,71
Pb(II)	0,37	12,71
Cd(II)	1,50	12,71

Grados de libertad = 2-1=1

Para todos los metales la *t* calculada es mucho menor que la *t* tabulada, por lo que no se rechaza la hipótesis nula (*H*₀: la media muestral y la media de la población son iguales), no hay evidencia de error sistemático o también se puede decir que la diferencia observada no es estadísticamente significativa.

Para el resto de muestras analizadas, tanto por los errores relativos como por la comparación de medias, podemos decir que tampoco existe diferencia significativa entre ambos valores, corroborándose así la exactitud y aplicabilidad del método propuesto.

3.10. Comparación del método

Debido a la importancia y toxicidad de los metales Cu(II), Pb(II), Cd(II) y Bi(III) y su presencia cada vez mayor en los compartimentos medioambientales, ha crecido en los últimos años el número de métodos enfocados en su determinación simultánea. A esto hay que sumarle el interés que existe por determinar Cu(II) y Bi(III) a la vez, ya que las señales de ambos metales aparecen solapadas. Es por ello por lo que existen diferentes métodos por AdCSV recogidos en la bibliografía para analizar simultáneamente algunos de estos metales (Cu, Pb y Cd) (tabla 3.14) y para determinar muestras de Cu y Bi en presencia uno del otro (tabla 3.15). En estas tablas se recogen algunos de los métodos más recientes comparándolos con el que se propone en esta Tesis.

En la primera tabla se puede observar como el método propuesto aporta uno de los límites de detección más bajos y buenos intervalos de linealidad.

El método de Van den Berg de 1986, [Van den Berg, 1986] para la determinación simultánea de Cu(II), Pb(II) y Cd(II) empleando oxina como ligando orgánico quelatante, presenta también unos buenos límites de detección, pero hay que destacar como la interferencia del Cu afecta en gran medida a la señal del Pb. Además, este método puede llegar a alcanzar tiempos de deposición que alargan demasiado los análisis. Collado-Sánchez y colaboradores presentaron en 1996 un método para el análisis de estos tres metales reduciendo los tiempos de análisis.

Un año más tarde se propuso un método para el análisis multielemental de Cu(II), Pb(II), Cd(II) y Ni(II) en muestras de agua de mar empleando una mezcla de ligandos [Colombo, 1997]. Los límites de detección son $0,02 \mu\text{g L}^{-1}$ para Cu(II), $0,04 \mu\text{g L}^{-1}$ para Pb(II), $0,012 \mu\text{g L}^{-1}$ para Cd(II) y $0,013 \mu\text{g L}^{-1}$ para Ni(II), obtenidos usando una mezcla de dimetilglioxima y 8-hidroxiquinolina como ligando orgánico quelatante mediante AdCSV. Sin embargo, los intervalos de linealidad de aplicación son excesivamente pequeños para algunos de los metales estudiados.

El método de Ensafi del 2000 que emplea amonio 2-amino-ciclopentano ditiocarboxilato para detectar Co(II), Cd(II) y Ni(II), aporta buenos rangos lineales de aplicación, pero se puede observar como el límite de detección para Cd(II) es muy alto $1,29 \mu\text{g L}^{-1}$ [Ensafi, 2000].

Con el fin de desarrollar un método alternativo para el análisis simultáneo de Cu(II), Zn(II) y Pb(II), Shams y col., presentaron en 2004 un método por AdCSV y electrodo HMDE empleando morina como ligando orgánico quelatante [Shams, 2004]. El método propuesto fue aplicado de manera satisfactoria para la determinación simultánea de estos tres metales con buenos límites de detección y amplios intervalos de linealidad para los metales estudiados. Sin embargo, hay que destacar que el electrolito necesario para llevar a cabo los análisis, requiere de un pH ácido que puede alterar los equilibrios químicos.

Uno de los más recientes es el de Ensafi y col., del 2006 [Ensafi, 2006] con el que desarrollaron un método para la determinación de Pb(II) y Cd(II) empleando naranja de xilenol como ligando orgánico aplicándolo de manera satisfactoria en muestras de agua de río y agua potable con amplios intervalos de linealidad pero límites de detección altos como $0,98 \mu\text{g L}^{-1}$ para Pb(II) y $1,18 \mu\text{g L}^{-1}$ para Cd(II).

Tabla 3.14. Comparación de métodos descritos en la bibliografía para la determinación simultánea de Cu(II), Pb(II) y Cd(II) por AdCSV

Referencias	Reactivo (L)	Metal	Electrolito	Parámetros Electroquímicos	Límite Detección	Intervalo de linealidad	Validación/ Aplicación
Van den Berg, 1986	Oxina ^a	Cu, Pb, Cd	[L]: 8-20 μ M pH: 7,5-8	Ea: -1,1 V ta: 1-10 min	0,015 μ g L ⁻¹ Cu 0,062 μ g L ⁻¹ Pb 0,013 μ g L ⁻¹ Cd	0-5,7 μ g L ⁻¹ Cu 0-12,4 μ g L ⁻¹ Pb 0-2,81 μ g L ⁻¹ Cd	Agua de mar
Collado-Sánchez y col., 1996	Oxina ^a	Cu, Pb, Cd	[L]: 8 μ M pH: 7,6	Ea: -1,3 V ta: 120 seg	0,03 μ g L ⁻¹ Cu 0,01 μ g L ⁻¹ Pb 0,004 μ g L ⁻¹ Cd	---	Agua de mar
Colombo y col., 1997	DMG ^b y Oxina ^a	Cu, Pb, Cd, Ni	[L]: DMG: 200 μ M Oxina: 20 μ M pH: 7,7	Ea: -0,80 V ta: 60 seg	0,02 μ g L ⁻¹ Cu 0,04 μ g L ⁻¹ Pb 0,012 μ g L ⁻¹ Cd 0,013 μ g L ⁻¹ Ni	0-19 μ g L ⁻¹ Cu 0-0,5 μ g L ⁻¹ Pb 0-4,1 μ g L ⁻¹ Cd 0-20,5 μ g L ⁻¹ Ni	Agua de mar
Ensafi y col., 2000	AADC ^c	Cd, Ni, Co	[L]: 3,2 μ M pH: 6	Ea: -0,80 V ta: 60 seg	1,29 μ g L ⁻¹ Cd 0,5 μ g L ⁻¹ Ni 0,02 μ g L ⁻¹ Co	1,49-199 μ g L ⁻¹ Cd 0,5-50 μ g L ⁻¹ Ni 0,05-5 μ g L ⁻¹ Co	Agua de río, agua subterránea y agua potable
Shams y col., 2004	Morina ^d	Cu, Pb, Zn	[L]: 2 μ M pH: 4,0	Ea: -0,5 V ta: 60 seg	0,06 μ g L ⁻¹ Cu 0,08 μ g L ⁻¹ Pb 0,06 μ g L ⁻¹ Zn	1-60 μ g L ⁻¹ Cu 0,3-80 μ g L ⁻¹ Pb 1-70 μ g L ⁻¹ Zn	Agua potable
Ensafi y col., 2006	Naranja de xilenol (XO)	Pb, Cd	[L]: 4 μ M pH: 5,5	Ea: -0,50 V ta: 30 seg	0,98 μ g L ⁻¹ Pb 1,18 μ g L ⁻¹ Cd	5,0-150 μ g L ⁻¹ Pb 5,0-150 μ g L ⁻¹ Cd	Agua de río y agua potable
Este trabajo	2-HBBH^e	Cu, Pb, Cd	[L]: 5,48 μM pH: 9,5	Ea: -0,8 V ta: 120 seg	0,053 μg L⁻¹ Cu 0,170 μg L⁻¹ Pb 0,107 μg L⁻¹ Cd	0,5-9 μg L⁻¹ de Cu 0,5-10 μg L⁻¹ de Pb 0,5-10 μg L⁻¹ de Cd	Agua de lago

a: 8-hidroxiquinolina; b: dimetilglioxima; c: amonio 2-amino ciclopentano ditiocarboxilato; d: 2',3,4',5,7-pentahidroxiflavona; e: 2-hidroxibenzaldehido benzoilhidrazona

En la segunda tabla se compara con otros métodos más recientes para determinar Cu(II) y Bi(III) en presencia el uno del otro mediante AdCSV y electrodo HMDE.

Tabla 3.15. Comparación de métodos descritos en la bibliografía para la determinación simultánea de Cu(II) y Bi(III) por AdCSV

Referencias	Reactivo (L)	Metal	Electrolito	Parámetros Electroquímicos	Límite Detección	Intervalo de linealidad	Validación/ Aplicación
Hajian y col., 2003	Morina ^a	Cu, Bi	[L]: 0,6 μ M	Ea: -0,3 V ta: 60 seg	0,1 μ g L ⁻¹ Cu 3,4 μ g L ⁻¹ Bi	0,2-130 μ g L ⁻¹ Cu 5-50 μ g L ⁻¹ Bi	Agua potable
Gholivand y col., 2006	Rojo nuclear rápido ^b	Cu, Bi	[L]: 80 μ M pH: 2,8	Ea: -0,3 V ta: 180 seg	0,2 μ g L ⁻¹ Cu 1,2 μ g L ⁻¹ Bi	1-100 μ g L ⁻¹ Cu 5-60 μ g L ⁻¹ Bi	Agua potable
Khaloo y col., 2007	Cromazurol-S	Cu, Bi	[L]: 4 μ M pH: 3,7	Ea: -0,2 V ta: 60 seg	0,05 μ g L ⁻¹ Cu 0,10 μ g L ⁻¹ Bi	0,1-32,0 μ g L ⁻¹ Cu 0,1-30,0 μ g L ⁻¹ Bi	Agua potable y de río
Este trabajo	2-HBBH ^b	Cu, Bi	[L]: 5,48 μ M pH: 4 y 9	Ea: -0,8 V ta: 120 seg	0,038 μ g L ⁻¹ Cu (a pH 4) 0,173 μ g L ⁻¹ Bi (a pH 9)	0,5-12 μ g L ⁻¹ Cu (a pH 4) 0,5-14 μ g L ⁻¹ Bi (a pH 9)	Agua de lago

a: 2',3,4',5,7-pentahidroxiflavona, *b*: sal monodisódica de ácido 2-antracenosulfónico, 4-amino-9,10-dihidro-1,3-dihidroxi-9,10-dioxo; *b*: 2-hidroxibenzaldehído benzoilhidrazona

Uno de los primeros métodos desarrollados para la determinación simultánea de Cu(II) y Bi(II), fue el de Hajian y col., del 2003 [Hajian, 2003] en el que empleaba morina como agente quelatante. Se trata de un método rápido aplicable a agua potable, con buenos rangos lineales de aplicación, pero se trabaja con altos límites de detección (0,1 μ g L⁻¹ de Cu y 3,4 μ g L⁻¹ de Bi) además necesita de dos potenciales de acumulación para realizar los análisis.

En relación al método propuesto por Gholivand y col., en 2006, cabe citar su amplio intervalo de aplicación para Cu(II) y Bi(III), pero presenta una serie de limitaciones como un tiempo de deposición de 3 min, requiere de concentraciones elevadas de reactivo (80 μ M) y un pH muy ácido que puede desplazar los equilibrios. Además los límites de detección son aproximadamente 7 veces más que los aportados por el método propuesto.

Khaloo y col., en 2007 presentaron un método alternativo para la determinación simultánea de estos dos elementos empleando una transformación matemática (Continuous Wavelet Transform: CWT) para separar los voltamperogramas de ambos elementos. Con este método se llegaron a alcanzar límites de detección similares a los presentados por el método de la 2-HBBH.

De aquí se puede concluir que con el método propuesto se pueden determinar de manera simultánea Cu(II) y Bi(II) simplemente por cambio del pH, alcanzándose unos límites de detección muy bajos así como buenos intervalos lineales de aplicación.

3.11. Conclusiones y perspectivas futuras

Si con el método del capítulo anterior, se alcanzó el objetivo de aplicar las aroilhidrazonas para la determinación de un metal pesado como es el plomo en AdCSV. En este capítulo, se ha conseguido dar un paso más, estudiando la aplicabilidad de la hidrazona 2-HBBH en la determinación simultánea de metales pesados de gran interés medioambiental.

Las principales aportaciones de este estudio se encuentran en la buena sensibilidad alcanzada tanto en los análisis individuales como simultáneos, y en la posible solución al problema que presenta la interferencia común Cu(II)-Bi(III), ya que debido a sus características aparecen solapados en el voltamperograma, dificultando su determinación en muestras reales en las que estén presentes ambos metales a la vez.

Teniendo en cuenta la buena sensibilidad alcanzada en el caso del Cu(II), sería de gran interés aprovechar estos resultados y avanzar en el estudio del sistema 2-HBBH y Cu(II).

Se plantean como futuras líneas de trabajo, las que se presentan a continuación:

A. Desarrollar un nuevo método voltamperométrico de redisolución para la determinación individual de cobre a niveles nanomolares en aguas naturales. Para ello, se pretende realizar una optimización de los parámetros químicos e instrumentales que afectan al proceso, así como un estudio más exhaustivo de las interferencias y su aplicación a muestras reales con matrices diferentes.

B. Investigar la aplicación de otros reactivos orgánicos pertenecientes a la familia de las aroilhidrazonas, como la 2-APBH, 2-HBSH, PSH, etc., para el desarrollo de nuevos métodos, individuales y/o simultáneos por AdCSV para otros metales de interés medioambiental.

C. Aplicar los resultados obtenidos al desarrollo de estudios de especiación metálica de plomo en aguas naturales (las fracciones de plomo biodisponibles) mediante los métodos de complejación por competición entre ligandos.

Referencias

Ainscough, E.W., Brodie, A.M., Ranford, J.D., Waters, J.M., **1995**. Hexafluorosilicate coordination to the antitumour copper(II) salicylaldehyde benzoylhydrazone (H₂L) system: single-crystal X-ray structure of [(Cu(HL)(H₂O)₂SiF₆)]·2H₂O. *Inorganica Chimica Acta* 236, 83-88.

Ainscough, E.W., Brodie, A.M., Dobbs, A.J., Ranford, J.D., Waters, J.M., **1998**. Antitumour copper(II) salicylaldehyde benzoylhydrazone (H₂sb) complexes: physicochemical properties and the single-crystal X-ray structures of [(Cu(H₂sb)(CCl₃CO₂)₂)]₂ and [(Cu(Hsb)(ClO₄)(C₂H₅OH)]₂ and the related salicylaldehyde acetylhydrazone (H₂sa) complex, [Cu(Hsa)Cl(H₂O)]·H₂O. *Inorganica Chimica Acta* 267, 27-38.

Collado-Sánchez, C., Pérez-Peña, J., Gelado-Caballero, M.D., Herrera-Melian, J.A., Hernández-Brito, J.J., **1996**. Rapid determination of copper, lead and cadmium in unpurged seawater by adsorptive stripping voltammetry. *Analytica Chimica Acta* 320, 19-30.

Colombo, C., van der Berg, C. M. G., **1997**. Simultaneous determination of several trace metals in seawater using cathodic stripping voltammetry with mixed ligands. *Analytica Chimica Acta* 337, 29-40.

Cordier, C., Vauthier, E., Adenier, A., Lu, Y., Massat, A., Cossé-Barbi, A., **2004**. Salicylaldehyde benzoylhydrazone : Isomerization due to water. A structural analysis using a combination of NMR, IR, and theoretical investigations. *Structural Chemistry* 15, 295-307.

Dong, K. L., Kryeger, L., Christensen, J. K., Thomsen, K. N., **1991**. Preconcentration and determination of Bismuth (III) at a chemically modified electrode containing 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol. *Talanta* 38, 101-105.

Ensafi, A. A., Zarei, K., **2000**. Simultaneous determination of trace amounts of cadmium, nickel and cobalt in water samples by adsorptive voltammetry using ammonium 2-amino-cyclopentene dithiocarboxylate as a chelating agent. *Talanta* 52, 435-440.

Ensafi, A.A., Khayamian, T., Benvidi, A., Mirmomtaz, E., **2006**. Simultaneous determination of copper, lead and cadmium by cathodic adsorptive stripping voltammetry using artificial neural network. *Analytica Chimica Acta* 561, 225-232.

Gholivand, M.B., Romiani, A.A., **2006**. Application of adsorptive stripping voltammetry to the simultaneous determination of bismuth and copper in the presence of nuclear fast red. *Analytica Chimica Acta* 571, 99-104.

Hajian, R., Shams, E., **2003**. Application of adsorptive stripping voltammetry to the determination of bismuth and copper in the presence of morin. *Analytica Chimica Acta* 491, 63-69.

Jiang, C.Q., Tang, B., Fu, H.Y., Wang, R.Y., **1997**. *Huaxue Shiji*, 19, 353-355.

Jurado-González, J. A., Galindo-Riaño, M. D., García-Vargas, M., **2003**. Experimental designs in the development of a new method for the sensitive determination of cadmium in seawater by adsorptive cathodic stripping voltammetry. *Analytica Chimica Acta* 487, 229-241.

Khaloo, S.S., Ensafi, A.A., Khayamian, T., **2007**. Determination of bismuth and copper using adsorptive stripping voltammetry couple with continuous wavelet transform. *Talanta* 71, 324-332.

Limson, J., Nyokong, T., **1997**. Substituted catechols as complexing agents for the determination of bismuth, lead, copper and cadmium by adsorptive stripping voltammetry. *Analytica Chimica Acta* 344, 87-95.

Liu, J., Zhang, B., Wu, B., Liu, Y., Yu, X., **2006**. Spectrofluorimetric determination of trace amounts of cadmium with 2,4-dihydroxyacetophenone benzoylhydrazone. *Rare Metals* 25(2), 184-189.

Locatelli, C., Torsi, G., **2000**. Determination of Se, As, Cu, Pb, Cd, Zn and Mn by anodic and cathodic stripping voltammetry in marine environmental matrices in the presence of reciprocal interference. Proposal of a new analytical procedure. *Microchemical Journal* 65, 293-303.

Lu, Y.H., Lu, Y.W., Wu, C.L., Shao, Q., Chen, X.L., Biboum Bimbong, R.N., **2006**. UV-visible spectroscopic study of the salicylaldehyde benzoylhydrazone and its cobalt complexes. *Spectrochimica Acta Part A* 65, 695-701.

Sazanovich, I.V., Balakumar, A., Muthukumar, K., Hidin, E., Kirmaier, C., Diers, J.R., Lindsey, J.S., Bocian, D.F., Holten, D., **2003**. Excited-State Energy-Transfer Dynamics of Self-Assembled Imine-Linked Porphyrin Dyads. *Inorganic Chemistry* 42, 6616-6628.

Shams, E., Babaei, A., Soltaninezhad, M., **2004**. Simultaneous determination of copper, zinc and lead by adsorptive stripping voltammetry in the presence of Morin. *Analytica Chimica Acta* 501, 119-124.

Sreeja, P.B., Prathapachandra-Kurup, M.R., **2005**. Synthesis and spectral characterization of ternary complexes of oxovanadium(IV) containing some acid hydrazones and 2,2'-bipyridine. *Spectrochimica Acta Part A* 61, 331-336.

Suciu, P., Vega, M., Roman, L., **2000**. Determination of cadmium by differential pulse adsorptive stripping voltammetry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 23, 99-106.

Temerk, Y.M., Issa, I.M., Abu Zuhri, A.Z., **1979**. *Trans SAEST*, 14, 17.

Van den Berg, C.M.G., **1986**. Determination of copper, cadmium and lead in seawater by cathodic stripping voltammetry of complexes with 8-hydroxyquinoline. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 215, 111-121.

Yuan, Y., Cao, Z., Fu, N., Wang, J., Weng, L., de Carvalho, A. B., Peppe, C., **2001**. Preparation, characterization, electrochemical studies and crystal structure determination of salicylaldehyde-arylohydrazone, ferrocenyl-arylohydrazone and salicylaldehyde-ferrocenylhydrazone complexes of indium. *Journal of Organometallic Chemistry* 637-639, 631-641.

Zidan, A. S. A., **2003**. Mixed Ligand Complexes of Nickel (II) Dialkyldithiophosphates with 2-Acetylpyridine Semicarbazone and 2-Acetylpyridine Benzoylhydrazone. *Phosphorus, Sulfur and Silicon* 178, 567-582.

Zidan, A.S.A., **2004**. Synthesis and investigation of mixed-ligand transition metal complexes of alkyl dithiocarbonate and benzoylhydrazine or benzoylhydrazone derivatives. *Synthesis and reactivity in inorganic and metal-organic chemistry* 34, 743-762.

Anexos Parte A

Anexo A.1: Equipos instrumentales empleados

Anexo A.2: Características instrumentales del equipo de voltamperometría Metrohm

Anexo A.3: Protocolos de laboratorio

Anexo A.4: Procedimiento de síntesis de la 2-APSH

Anexo A.5: Procedimiento de síntesis de la 2-HBBH

Anexo A.6: Reactivos y disoluciones empleadas en Capítulo 2

Anexo A.7: Reactivos y disoluciones empleadas en Capítulo 3

Anexo A.1: Equipos instrumentales empleados

- El equipo empleado para la determinación de Pb (Capítulo 2) y para la determinación simultánea de Cu, Pb, Cd y Bi (Capítulo 3) fue un equipo de Polarografía 757 VA Computrace Stand, de Metrohm. La técnica voltamétrica empleada es la Voltametría de impulso diferencial, para lo que el equipo dispone de un electrodo de gota colgante de mercurio (HMDE). El manejo del equipo se realiza con el software de control 757 VA Computrace versión 2.0. Copyright 2001, así como el tratamiento de los voltamperogramas y el procesamiento de los datos de intensidades de la señal. Por otro lado, para la puesta a punto de la metodología de plomo, se hizo uso también de otro equipo de Polarografía, 747 VA Stand de Metrohm, acoplado a un microprocesador de datos tipo 746 VA Trace Analyzer, también de la marca Metrohm.



Figura A.1 1. Equipos de voltamperometría empleados para la investigación (Metrohm)

- La determinación de la estequiometría del complejo metal-ligando se realizó mediante un espectrofotómetro UV-Vis, Unicam y otro marca Pharmacia Biotech.

- Para la digestión de las muestras reales de agua se utilizó un digestor UV modelo 705 UV Digester, de la marca Metrohm (Fig.A.1.2).

- El pH fue medido con un pH-metro modelo 2001 de Crison, calibrado mediante patrones de pH 4 y 7.

Anexo A.2: Características instrumentales de los equipos de voltamperometría Metrohm

Tabla A.2.1. Componentes principales de los equipos de análisis electroquímico Metrohm utilizados para el desarrollo de los métodos propuestos

Componentes	Modelo Metrohm
Módulo procesador	757 VA Computrace versión 2.0. ^a 746.0020 VA Trace Analyzer ^b
Módulo de medida	757 VA Computrace Stand [6.2155.000] ^a 747 VA Stand [747.0010] ^b
Electrodo de trabajo	Electrodo Multi-Modo (MME) [6.1246.020] Capilar de vidrio [6.1226.030]
Electrodo auxiliar	Electrodo de Pt [6.0343.000]
Electrodo de referencia	Ag/AgCl/c(KCl)=3 mol·L ⁻¹ Sistema de referencia Ag/AgCl [6.0728.020] Recipiente de electrolito [6.1245.010] Diafragma cerámico de 3 mm de diámetro
Vaso de medida	Vaso de vidrio borosilicato sin plomo 3.3 Volumen de trabajo: 10-90 mL [6.1415.210]
Sistema de agitación	Agitador PTFE [6.1204.090]

^a: Equipo de Polarografía, 757 VA Stand, de Metrohm.

^b: Equipo de Polarografía, 747 VA Stand, de Metrohm.

Tabla A.2.2. Características principales del módulo Metrohm 747 VA Stand para el modo de medida diferencial de pulsos (DP)

Potenciostato	Voltaje de salida	± 12 V
	Corriente de salida	Modo "rápido": ± 15 mA Modo "lento": $\pm 1,5$ mA
	Impedancia de entrada	$R > 5 \cdot 10^{11} \Omega$
Fuente de potencial	Intervalo de barrido	± 3 V
	Incrementos de potencial	2, 4, 6, 8, 10, 12 mV
	Velocidad de barrido	$0,2 \dots 240 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$
	Amplitudes de pulso	-100 ... 100 mV
Medida de corriente	Corriente mínima	2,4 pA
	Corriente máxima	1,2 mA
	Tiempos de integración	1..32 ms
	Intervalo de medida	0,05...9,9 s
Amplificador de medida	Resolución	24 pA
Sistema de agitación	Velocidad rotacional	200, 400...3000 rpm
	Constancia de velocidad	$\pm 2\%$

Tabla A.2.3. Características principales del módulo Metrohm 757 VA Stand para el modo de medida diferencial de pulsos (DP)

Potenciostato	Voltaje de salida	± 12 V
	Corriente de salida	± 35 mA
	Impedancia de entrada	$R > 1 \cdot 10^{10} \Omega$
Fuente de potencial	Intervalo de barrido	± 3 V
	Incrementos de potencial	2, 4, 6, 8, 10, 12 mV
	Velocidad de barrido	$0 \dots 0,5 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$
	Amplitudes de pulso	-1 ... 1 V
Medida de corriente	Corriente mínima	5 pA
	Corriente máxima	35 mA
	Tiempos de integración	0,1..20 ms
	Intervalo de medida	0,05...9,9 s
Amplificador de medida	Resolución	24 pA
Sistema de agitación	Velocidad rotacional	200, 400, 600,...3000 rpm
	Constancia de velocidad	$\pm 5\%$

Tabla A.2.4. Parámetros instrumentales e intervalos de valores de los equipos Metrohm para el análisis por Voltamperometría de Redisolución con electrodo HMDE

Parámetro	Intervalo de valores	Significado
t_a: tiempo de preconcentración o deposición	1...999 s	Tiempo de la etapa de preconcentración o deposición
E_a: potencial de deposición	-3000...3000 mV	Potencial al cual se realiza la preconcentración o deposición
P: Amplitud de impulso	-100...-1, 1...100 mV	Amplitud del impulso de potencial superpuesto
t_s: Intervalo de tiempo para el salto de potencial	0,05 ... 9,9 s	Intervalo de tiempo tras el cual el potencial del barrido es aumentado o disminuido la cantidad U _s . Debe cumplirse la condición: t _s > t _p + t _m + 30 ms
t_m: tiempo de medida	1...32 ms	Tiempo durante el cual se mide la intensidad de corriente. En Europa (50 Hz) suele aplicarse t _m =20 ms
t_p: tiempo de impulso	1...330 ms	Intervalo de tiempo durante el cual el impulso es superpuesto al voltaje directo. En Europa (50 Hz) suele aplicarse t _p =40 ms Condición: t _p > t _m + 2 ms
U_s: Salto de potencial	2, 4, 6, 8, 10, 12 mV	Incremento de potencial en la rama de corriente directa
d_s: Tamaño de gota	1...9 u.a. (0,15 mm ² ...0,60 mm ²)	Tamaño de la gota del electrodo HMDE u.a.: unidades arbitrarias
v_{ag}: Velocidad de agitación	0, 200, 400...3000 rpm	Velocidad de rotación del cilindro de agitación (PTFE) durante la etapa de preconcentración (rpm)

Anexo A.3: Protocolos de laboratorio

La metodología de trabajo aplicada utiliza una técnica de elevada sensibilidad como es la voltamperometría, y por otro lado, la determinación de metales en muestras medioambientales requiere analizar a nivel de trazas. Por ello, el extremo cuidado en la limpieza del material y equipos, así como evitar la posible contaminación de muestras y reactivos, son puntos de enorme interés en este trabajo de investigación.

- La preparación de las disoluciones de metales siempre se ha llevado a cabo en el interior de cabinas de flujo laminar Crumair tipo 9005-FL a 220V y 50Hz, equipadas con un filtro absoluto (ULPA) capaces de retener, con una eficacia del 99,999%, todas las partículas de polvo superiores a 0,3 micras, todo ello con el fin de evitar la contaminación de las muestras. Por otro lado, las disoluciones fueron preparadas en matraces aforados de teflón, para evitar la pérdida del metal por adsorción en las paredes de recipientes de vidrio.

- Para la preparación de disoluciones y durante la manipulación de muestras y reactivos de elevada calidad, se trabajó en el interior de la campana de flujo laminar con guantes de polietileno.

- Las disoluciones de reactivo fueron almacenadas en recipientes de plástico (polietileno de baja densidad o poliestireno).

- Todas las puntas, recipientes,... se guardaron en bolsas de plástico para evitar la posible contaminación de los mismos por el ambiente del laboratorio.

- El agua usada en todo momento ha sido purificada por ósmosis inversa en un equipo Elix 3 (Millipore) seguido de desionización con un equipo Milli-Q⁵⁰ (Millipore).

- Debido a que el electrodo de trabajo empleado en esta técnica es un electrodo de gota colgante de mercurio, el cual se trata de un metal de elevadísima toxicidad, fue convenientemente gestionado, siguiendo las especificaciones determinadas por el protocolo de gestión de residuos de la Universidad de Cádiz.

El **protocolo de limpieza** de material seguido en estos estudios, es muy laborioso y requiere de mucho tiempo, pero se hace imprescindible al trabajar con niveles de metales excesivamente bajos.

Consta de los siguientes pasos:

- 1) Todos los recipientes y celdas de análisis se lavan con detergente y se enjuagan con abundante agua.
- 2) Posteriormente, se sumergen en unos recipientes que contienen HNO_3 2 M al menos 24 horas.
- 3) Se retiran del recipiente enjuagándolos con agua purificada por ósmosis inversa en un equipo Elix 3 (Millipore) y agua desionizada por un equipo Milli-Q⁵⁰ (Millipore).
- 4) Por último, se mantienen sumergidos durante un par de días en otro recipiente de HNO_3 2 M, para conseguir así el mayor grado de limpieza posible. Este recipiente se encuentra en el interior de unas campanas extractoras que mantienen el baño aislado del ambiente del laboratorio.
- 5) Cuando se vaya a utilizar el material y como paso final del proceso, se enjuagarán con agua Milli-Q.

Anexo A.4: Procedimiento de síntesis de la 2-APSH

Este reactivo se ha preparado mediante la condensación de la 2-acetilpiridina (Aldrich) y de la saliciloilhidrazida (Sigma), siguiendo el procedimiento que se detalla a continuación [García-Vargas, 1987]:

En un matraz de fondo redondo de 250 mL se añaden 20 mL de etanol y una cantidad equimolar ($4 \cdot 10^{-3}$ M) de 2-acetilpiridina (0,50 mL) y de saliciloilhidrazida (0,60 g). El contenido se mezcla hasta homogeneización y se mantiene a reflujo durante aproximadamente 30 minutos en caliente gracias a la ayuda de una manta calefactora. Transcurrido ese tiempo se obtiene un precipitado de color amarillo que se filtra por gravedad arrastrado con ayuda de etanol. Una vez realizado esto, se procede a la recristalización del reactivo, disolviéndolo en la mínima cantidad de etanol posible, con ayuda de aplicación de calor para favorecer la disolución en caliente del mencionado reactivo, para posteriormente obtener la precipitación a bajas temperaturas. El reactivo de color amarillento se filtrará a vacío para posteriormente secarlo en estufa durante 20 minutos aproximadamente a 110° C. Finalmente se obtiene la 2-APSH en forma de polvo blanco-amarillento de aspecto filamentososo.

Las disoluciones madre de 2-APSH se han preparado habitualmente a una concentración $2 \cdot 10^{-4}$ M en etanol manteniéndose en la oscuridad y a 4° C cuando no se encontraba en uso, siendo su estabilidad de aproximadamente una semana.

En la tabla A.4.1 se muestran las características de los reactivos empleados para la síntesis de la 2-APSH.

Tabla A.4.1. Reactivos empleados para la síntesis de la 2-APSH

Nombre	Fórmula	Peso Fórmula (g·mol ⁻¹)	Pureza	d (g·mL ⁻¹)	Marca / Ref
2-Acetilpiridina ó metil-2-piridilcetona	C ₇ H ₇ NO	121,14	99%	1,082	Sigma-Aldrich / W325104
Saliciloilhidrazida	C ₇ H ₈ N ₂ O ₂	152,2	-	Sólido	Sigma-Aldrich / S1385
Etanol	C ₂ H ₆ O	46,07	99,9%	0,79	MERCK / 100983

Anexo A.5: Procedimiento de síntesis de la 2-HBBH

Se disuelven 1,11 g de benzoilhidracida (BH) en 30 mL de agua desionizada (MQ) y se añaden 20 mL de etanol conteniendo 1 mL de 2-hidroxibenzaldehido (salicilaldehido) (2HB). El contenido se mezcla hasta homogeneización y se deja reposar a temperatura ambiente hasta obtención de un precipitado blanco que se filtra a continuación por el sistema de vacío. El reactivo recuperado se recrystaliza dos veces en etanol/agua (1:1) y se deja a 4°C durante 24 horas para conseguir una buena recrystalización que permite eliminar el exceso de los reactivos de partida. Tras la última recrystalización se obtiene un producto amarillo claro que se seca en la estufa durante aproximadamente 6 horas a 50 °C para eliminar toda la humedad y finalmente se obtiene la 2-HBBH en forma de polvo de aspecto filamentoso cristalino. El esquema de la reacción de condensación de la 2-HBBH se muestra a continuación (figura A.5.1).

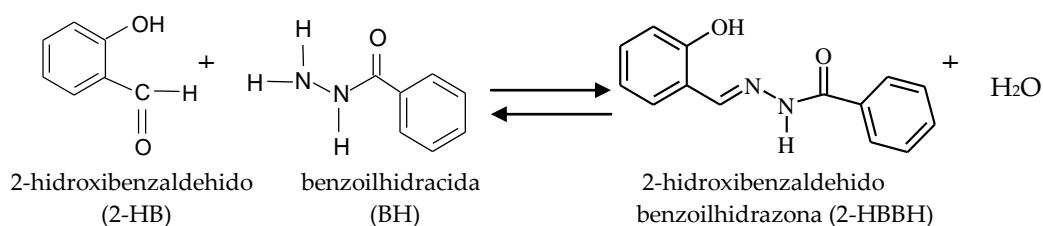


Figura A.5.1. Síntesis de la 2-HBBH

En la tabla A.5.1 se muestran las características de los reactivos empleados para la síntesis de la 2-HBBH.

Tabla A.5.1. Reactivos empleados para la síntesis de la 2-HBBH

Nombre	Fórmula	Peso Fórmula (g·mol ⁻¹)	Pureza	d (g·mL ⁻¹)	Marca / Ref
Benzoilhidracida	C ₇ H ₈ ON ₂ O	136,15	98%	Sólido	Sigma-Aldrich/ B13071
2-hidroxibenzaldehido	C ₇ H ₆ O ₂	122,12	98%	1,146	Sigma-Aldrich/ S356
Etanol	C ₂ H ₆ O	46,07	99,9%	0,79	MERCK / 100983

Anexo A.6: Reactivos y disoluciones empleadas en Capítulo 2

a) Disoluciones reguladoras de pH:

- Para el estudio de la influencia del pH en el intervalo de pH de 2 a 12 se ha hecho uso de disoluciones reguladoras Britton-Robinson preparadas tomando como base los cálculos de concentraciones recogidos en un trabajo publicado por C. Mongay y V. Cerdá usando ácido o-bórico, ácido o-fosfórico, ácido acético e hidróxido sódico [Mongay, 1977]. En este trabajo se especifican las cantidades de las sales correspondientes para elaborar disoluciones reguladoras Britton-Robinson a diferentes valores de pH pero con igual fuerza iónica. Dado que el procedimiento de ajuste del pH para las disoluciones de medida en AdCSV consistía en la adición de una alícuota de disolución reguladora a una cierta cantidad de muestra, se optó por aumentar las concentraciones de cada una de las sales especificadas en dicho artículo 10 veces, con objeto de aumentar su fuerza tamponante respetando los valores de pH, de forma que su dilución en la muestra de medida permitiese mantener una fuerza tamponante suficiente al pH especificado.

Con objeto de minimizar la contaminación de las disoluciones reguladoras, éstas fueron preparadas utilizando los reactivos de elevada pureza que se muestran en la tabla A.6.1 y tomando en todo momento las precauciones necesarias para evitar su contaminación tanto por recipientes como por su manipulación y conservación. Todas las disoluciones fueron preparadas utilizando agua desionizada Milli-Q.

Las cantidades utilizadas de cada una de las sales, así como su valor de pH medido experimentalmente se muestran en la tabla A.6.2.

En el estudio de optimización de variables se realizó un diseño factorial de Plackett-Burman inicial y una posterior optimización por el Método Simplex Modificado, para los cuales se hacía necesario preparar disoluciones reguladoras Britton-Robinson a diferentes pH: 5, 6, 7 y 8.

Tabla A.6.1. Reactivos utilizados para la disolución reguladora Britton-Robinson.

Reactivos		Peso Fórmula (g·mol ⁻¹)	% Pureza	d (g·mL ⁻¹)
Hidróxido sódico (PA Merck)	NaOH	40,00	99	-
Ácido acético (PA Merck)	CH ₃ COOH	60,05	100	1,05
Ácido ortofosfórico (PA Merck)	H ₃ PO ₄	98,00	85	1,71
Ácido bórico (PA Merck)	H ₃ BO ₃	61,83	99,8	-
Cloruro potásico (PA Merck)	KCl	74,56	99,5	-

La manera de preparar los diferentes tampones fue la siguiente:

Por un lado se prepararon reguladoras con pH extremos, una a un pH muy ácido y otra a un pH muy básico, tomando las cantidades y volúmenes reflejados en la tabla A.6.2. Por otro lado, se prepararon disoluciones reguladoras de pH intermedios entre 5 y 8 para posteriormente ajustar el pH exacto con las reguladoras de pH extremos preparadas inicialmente.

Para conseguir una fuerza iónica constante en todas las disoluciones reguladoras, se ha utilizado KCl 1,5 M de calidad Suprapur (Merck).

- Posteriormente a estos estudios previos de optimización, el estudio se centró en la región de pH en torno a 5,6, por lo que se empleó como reguladora para esta zona la disolución de acetato amónico y ácido clorhídrico, usando ácido acético glacial 100% (Suprapur), amoníaco en solución al 25% (Suprapur) y ácido clorhídrico (Suprapur), mediante el siguiente procedimiento:

Primero se preparó acetato amónico 1 M mediante ácido acético glacial (100%) 1 M y amoníaco en solución (25%) 1 M, ambos de calidad Suprapur, y por otro lado, ácido clorhídrico 0,5 M Suprapur para el ajuste del pH a 5,6.

Tabla A.6.2. Cantidades empleadas para la preparación de las disoluciones reguladoras Britton-Robinson de 1,5 M de fuerza iónica y un volumen total de 100 mL [Mongay, 1977]

pH	NaOH		CH ₃ COOH			H ₃ PO ₄			H ₃ BO ₃		I ^a	KCl ^b	
	g	M	g	mL	M	g	mL	M	g	M	M	g	M
1,81	0,000	0,000	2,402	2,288	0,400	4,612	2,697	0,471	2,478	0,401	0,134	10,236	1,366
5,02	2,095	0,524	1,779	1,694	0,296	3,416	1,998	0,349	1,836	0,297	0,506	7,449	0,994
6,09	2,410	0,603	1,686	1,606	0,281	3,236	1,893	0,330	1,739	0,281	0,603	6,722	0,897
7	2,782	0,695	1,575	1,500	0,262	3,024	1,768	0,309	1,625	0,263	0,758	5,560	0,742
8,36	3,108	0,777	1,478	1,408	0,246	2,838	1,659	0,290	1,525	0,247	0,993	3,799	0,507
11,98	4,040	1,010	1,201	1,144	0,200	2,306	1,348	0,235	1,239	0,200	1,28	1,649	0,22

a: Fuerza iónica proporcionada por las sales antes de añadir KCl

b: Cantidad de KCl añadida para completar la fuerza iónica hasta I = 1,5 M

b) Disolución patrón de plomo: Las disoluciones de plomo empleadas fueron preparadas por dilución de patrones de plomo de 1000 mg·L⁻¹ (Merck) enrasando con agua desionizada Milli-Q. Cabe destacar que a todas las disoluciones de metal se les añade HNO₃ para su conservación, en una relación de 4 µL de HNO₃ concentrado Suprapur por cada mL de disolución.

Anexo A.7: Reactivos y disoluciones empleadas en Capítulo 3

a) Disoluciones reguladoras de pH:

- Para el estudio de la influencia del pH en el intervalo de pH de 2 a 10 se ha hecho uso de disoluciones reguladoras Britton-Robinson 1,5 M preparadas de la misma forma que se ha explicado para el capítulo 2 empleando ácido bórico, ácido ortofosfórico, ácido acético e hidróxido sódico (Merck, Darmstadt, Germany), con una fuerza iónica constante conseguida mediante la adición de KCl (Merck, Darmstadt, Germany).

- Además de la reguladora Britton-Robinson se emplearon otras disoluciones reguladoras dependiendo del rango de pH estudiado: 0,5 M HEPES (para pH 7 y 8) preparada a partir de N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etano ácido sulfónico (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) y amoníaco suprapur (Merck, Darmstadt, Germany); 0,5 M PIPES (para pH 7) a partir de piperazina-N,N'-bis(ácido etanosulfónico) y amoníaco suprapur (Merck, Darmstadt, Germany); 6 M cloruro amónico/amoníaco (para el rango de pH 7 - 10) (Merck, Darmstadt, Germany); y 6 M ácido acético/acetato sódico (para pH 4 - 5,5).

b) Disoluciones de metales: Las disoluciones de Cu, Pb, Cd y Bi fueron preparadas por dilución de patrones de plomo de 1000 mg·L⁻¹ (Merck) enrasando con agua desionizada Milli-Q. Igual que en el apartado anterior, a todas las disoluciones de metal se les añade HNO₃ para su conservación, en una relación de 4 µL de HNO₃ concentrado Suprapur por cada mL de disolución.

Referencias:

Mongay, C., Cerda, V., 1977. A Britton-Robinson buffer of known ionic strength. *Annali di Chimica* 64, 23.

García-Vargas, M., Milla, M., Hidalgo, J.L., Bautista Rodriguez, J.M., 1987. Spectral (u.v.-vis, i.r. and MS), electrochemical and metallochromic properties of 2-hydroxy-benzoylhydrazones of acetylpyridines. *Spectrochimica Acta* 43, 355-360.

Parte B



*Desarrollo de nuevos sistemas
de análisis empleando
sensores ópticos*



Capítulo 4:

Sensores químicos ópticos

Capítulo 4:

Sensores químicos ópticos

4.1. Introducción

En el campo del medioambiente, especialmente en la evaluación y el control de metales, el disponer de técnicas sencillas, rápidas y de bajo coste, que requieran un mínimo mantenimiento, fáciles de usar, y que proporcionen una respuesta inmediata, ha despertado un gran interés en los últimos años.

Por otro lado, los métodos convencionales para medir metales pesados en aguas medioambientales requieren de largas e intensas etapas tanto de muestreo como de tratamiento, siendo posible la existencia de focos de contaminación. Además, la muestra es analizada días e incluso semanas más tarde de su recogida, por lo que el uso de aditivos se hace imprescindible para su conservación. Por lo que, a pesar del cuidado que se puede poner a la hora de muestrear, siempre existe la posibilidad de que durante el proceso de recogida y almacenaje se pueda alterar la muestra y con ello la concentración real del analito [Zuki, 2009].

Así pues, una de las mejores estrategias para solucionar este problema es realizar los análisis *in-situ* y en tiempo real empleando dispositivos altamente miniaturizados para así poder desarrollar los análisis con un mínimo gasto tanto energético como de reactivos químicos, y además ser más respetuosos con el medioambiente [Clement, 2001; Fukuba, 2005].

De acuerdo con los 12 principios de la química verde propuestos por Anastas y Warner [Anastas, 2000], algunas de las acciones necesarias para conseguir una química analítica verde incluyen:

- Eliminar o minimizar el uso de reactivos químicos, particularmente disolventes orgánicos.
- Eliminar reactivos químicos con un alto grado de toxicidad.

- Reducir los requerimientos energéticos todo lo posible intentando llevar a cabo los métodos a temperatura y presión ambientales.
- Y reducir el impacto de las sustancias químicas en la salud humana.

Por otro lado, como se ha comentado, una de las tendencias básicas actuales en la química analítica es la miniaturización, la cual juega un papel importante en las metodologías “verdes”. Los principales objetivos de la miniaturización son [Namiesnik, 2010]:

- Mejorar metodologías ya existentes.
- Proporcionar soporte en la automatización y la simplificación.
- Reducir el consumo de disolventes y reactivos (mínimo riesgo).
- Reducir el consumo energético.
- Reducir las dimensiones de los dispositivos de medida analíticos.

Uno de los campos de investigación que cumple estos requisitos y que más atención está recibiendo en los últimos años, es el de los sensores químicos, los cuales constituyen una herramienta muy útil para el estudio y control de la contaminación, ya que pueden proporcionar información de un determinado analito de una manera rápida y en tiempo real mediante el empleo de instrumentación sencilla, de bajo coste y fácil de usar [Narayanaswamy, 2004] permitiendo al analista llevar el laboratorio a la muestra en lugar de la muestra al laboratorio [Cámara, 1995].

El actual interés por diseñar sensores químicos, puede comprobarse revisando la gran cantidad de libros y artículos publicados en la última década sobre sensores químicos aplicados entre otros, al control y evaluación de ecosistemas acuáticos, los cuales describen una gran variedad de metodologías para realizar medidas *in-situ* de especies químicas disueltas [Buffle, 2000; Varney, 2000; Johnson, 2000; McDonagh, 2008].

4.2. Sensores químicos

En términos generales, un sensor es un dispositivo capaz de proporcionar de forma directa, continua y reversible información de su entorno, ya sea la concentración de un analito o algún parámetro físico. Si la señal procede de una

reacción (bio)química, se habla de sensor (bio)químico. Si por el contrario se evalúa una propiedad física, se llama sensor físico [Cámara, 1995; Janata, 2009].

Cuando se habla de sensores químicos se está haciendo referencia a dispositivos o instrumentos de uso sencillo, capaces de determinar especies atómicas, moleculares e iónicas cualitativa y/o cuantitativamente.

4.2.1. Definición de sensor químico

De esta forma, un sensor químico puede definirse como un dispositivo capaz de transformar información química, desde la concentración de un componente específico de una muestra hasta un análisis de la composición total, en una señal analítica útil [Hulanicki, 1991].

Una de las definiciones más extendida es la que considera a los sensores químicos como “dispositivos miniaturizados capaces de proporcionar información en tiempo real y *on-line* de la presencia de compuestos específicos o iones en muestras complejas” [Wolfbeis, 2006; Baldini, 2006; Narayanaswamy, 2004; Orellana, 2005].

El componente clave de un sensor químico es la **fase reactiva**, que consiste en un reactivo químico o indicador inmovilizado sobre un material soporte adecuado capaz de interactuar con el analito en cuestión, modificando alguna de las propiedades del sistema.

Sin embargo, hay que destacar como para algunos autores el término sensor hace referencia al ligando receptor o indicador capaz de interactuar con el analito produciendo un cambio detectable en la señal [Anslyn, 2007].

4.2.2. Clasificación de los sensores químicos

Los sensores químicos pueden clasificarse atendiendo a diferentes criterios, siendo el más general el que se basa en la naturaleza de la señal analítica que se genera y se mide en la fase reactiva. Según este criterio se puede clasificar a los sensores químicos en [Casado-Terrones, 2007]:

- *Sensores electroquímicos*, los cuales miden cambios en alguna propiedad eléctrica del sistema la cual es proporcional a la concentración del analito. Dentro de este tipo de sensores se pueden citar: sensores conductimétricos, potenciométricos, amperométricos, impedimétricos, etc.

- *Sensores térmicos*, los cuales miden calores de reacción o cambios en la temperatura del sistema.

- *Sensores piezoeléctricos*, que cuantifican cambios de masa, de viscosidad, etc.

- Y *sensores ópticos*, los cuales producen cambios en alguna propiedad óptica del sistema: absorción, reflectancia, colorimetría, refractometría, transmitancia, fluorescencia y fosforescencia, espectroscopía Raman, turbidimetría, elipsometría, polarimetría o espectroscopía fotoacústica, entre otras [Boisdé, 1996].

Existen otro tipo de sensores empleados en menor medida basados en otro tipo de detección, como son: los sensores magnéticos y los de ondas acústicas de superficie.

Ésta es una de las múltiples clasificaciones que se pueden encontrar para los sensores químicos. Pero existen muchas otras, como por ejemplo, atendiendo al tipo de analito determinado (sensores de pH, para iones metálicos o para determinar oxígeno u otros gases, etc.), o bien atendiendo al tipo de proceso, si se trata de un proceso reversible o no. En el caso de los biosensores pueden diferenciarse según el elemento biológico usado como receptor: organismos, tejidos, células, órganos, membranas, enzimas, anticuerpos, etc.

4.2.3. Sensores químicos ópticos

Como se ha visto en el apartado anterior, los sensores químicos pueden ser llevados a cabo mediante diferentes estrategias. En particular, los sensores químicos ópticos ofrecen una serie de ventajas adicionales con respecto al resto, incluyendo versatilidad, alta sensibilidad, selectividad, capacidad de reutilización, bajo coste, inmunes a ambientes hostiles, libre de interferencias eléctricas y de pequeño tamaño [Narayanaswamy, 1993].

Debido a que muy pocos analitos presentan la capacidad de interactuar directamente con la luz, la mayoría de los sensores químicos ópticos requieren de la presencia de un reactivo cuyas propiedades ópticas (absorción, fluorescencia, reflectancia, etc) se modifican al interactuar con el analito [Gangaiya, 2008; McDonagh, 2008].

4.3. Sensores químicos de fibra óptica

Cuando la conducción de la radiación se realiza a través de una fibra óptica, se habla de un **sensor químico de fibra óptica**. A estos dispositivos se les conoce también con el nombre de optodos (del griego “camino óptico”) u optodos por su similitud con los electrodos clásicos, siendo el primer término el que se va a usar a lo largo de esta parte de la Tesis.

Los optodos y los métodos espectroscópicos clásicos emplean el mismo equipo con la principal diferencia de que en los optodos la luz es guiada fuera del espectrofotómetro usando una fibra óptica, permitiendo así la interacción con la fase reactiva, y posteriormente re-introducida en el instrumento para su detección.

Los sensores químicos de fibra óptica u optodos, constan de una fase reactiva que puede ser inmovilizada directamente en el extremo de la fibra óptica, o bien puede ser inmovilizada sobre un material soporte adecuado el cual se pondrá en contacto con la fibra óptica [Gangaiya, 2008]. La interacción del analito de interés con el reactivo inmovilizado producirá una variación en alguna de las propiedades ópticas del sistema (absorbancia, reflectancia o fluorescencia, por ejemplo), que se transmite al detector a través de la fibra óptica.

Estos sensores de fibra óptica son, en general, dispositivos sencillos y baratos que se miniaturizan fácilmente los cuales permiten el análisis de un amplio rango de aniones, cationes, gases, y compuestos orgánicos, tanto en disolución como en fase gaseosa [Narayanaswamy, 2004; Orellana, 1998].

4.3.1. Componentes de un optodo

La instrumentación de un optodo es relativamente sencilla y barata, estando formado por los siguientes componentes [Narayanaswamy, 1993; Orellana, 1998] (fig. 4.1):

- Fuente de luz
- Selectores de longitud de onda
- Fibra óptica
- Fase reactiva (Indicador + material soporte)
- Amplificador de la señal
- Detector
- Ordenador

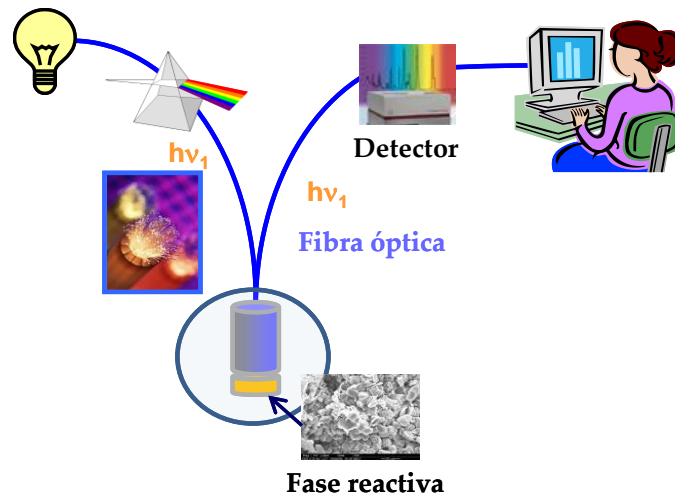


Figura 4.1. Diagrama esquemático de un sensor químico de fibra óptica

La luz procedente de una fuente adecuada es guiada con la ayuda de una fibra óptica hacia la región donde interacciona con la fase reactiva. La fase reactiva es generalmente un reactivo inmovilizado específico para un analito en particular. Al interaccionar ambos se producen cambios en alguna propiedad óptica del sistema, codificada con información química, la cual aporta una representación cuantitativa y cualitativa del analito. La información es recibida en el detector por la misma o una fibra óptica diferente. Dependiendo del sistema de medida y los

principios ópticos empleados, la señal óptica puede ser de diferente tipo, siendo las técnicas más comúnmente empleadas, la absorción y la fluorescencia.

Al verse modificadas las propiedades ópticas de la fase reactiva, de una manera indirecta estas modificaciones van a ser indicativas de las especies químicas presentes en la muestra. Por lo tanto, estos sensores pueden ser usados para determinar analitos de forma rápida y sencilla.

4.3.1.1. Fibras ópticas

Antes de entrar en detalle sobre la parte fundamental de un sensor químico de fibra óptica (*fase reactiva*), se hace necesario dar una breve descripción de las principales características de una fibra óptica. Aunque originariamente fueron empleadas en la industria de la comunicación, a finales de la década de los sesenta empezaron a aparecer instrumentos analíticos que contenían fibras ópticas para transmitir la radiación y las imágenes de un componente a otro del instrumento [Skoog, 2001].

Las fibras ópticas son finas hebras de vidrio o plástico capaces de transmitir la radiación a distancias de varios centenares de metros o incluso más. Las radiaciones electromagnéticas generalmente viajan en línea recta, pero en una fibra óptica siguen otro tipo de trayectorias guiadas por la fibra debido a la *reflexión interna total de la luz* [Crisp, 1998; Krohn, 1992].

Para que se produzca la reflexión interna total, es necesario recubrir la fibra óptica con un material que tenga un índice de refracción algo menor que el del material con el que se construye la fibra. Por tanto, la fibra óptica consiste en un centro o núcleo transparente, de alto índice de refracción (n_1), el cual es rodeado por un material de bajo índice de refracción (n_2), y este conjunto es cubierto de un polímero, el cual actúa como un abrigo protector y está usualmente compuesto de cloruro de polivinilo (Fig. 4.2).

Cuando un rayo de luz atraviesa un medio de índice de refracción n_1 más grande que el índice de refracción del medio con el que se encuentra n_2 , el

rayo refractado presenta un ángulo mayor que le aleja de la normal. En el caso de que el rayo incidente presente un ángulo de incidencia mayor que un determinado valor crítico θ_c se refracta de tal modo que no es capaz de atravesar la superficie de separación reflejándose completamente [Boisdé, 1996] (Fig. 4.2).

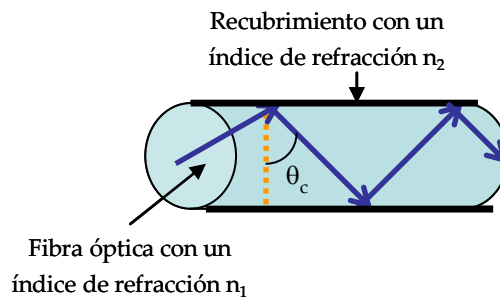


Figura 4.2. Reflexión interna total de la luz [Gangaiya, 2008]

4.3.1.2. Indicador óptico

La parte clave de un sensor de fibra óptica es el **indicador**. Como ya se ha comentado, un gran número de iones y moléculas no presentan las características ópticas adecuadas para ser fácilmente medibles por sí solas [McDonagh, 2008]. Por su parte, los indicadores son especies químicas cuyo espectro electrónico cambia bajo los efectos de determinadas concentraciones iónicas, por lo que puede servir para detectar las concentraciones de dichos iones. En términos generales, un indicador consiste en un sistema aceptor-donador en el que ambas formas presentan diferente color o propiedades ópticas bajo la influencia de un protón, electrón o ion metálico [Boisdé, 1996].

El indicador debe ser muy selectivo para el analito de interés y debe presentar una gran sensibilidad, es decir, debe producirse un gran cambio en el espectro en respuesta a pequeñas variaciones en la concentración de los analitos. Además debido a que el propósito de toda fase reactiva es el de proporcionar un enlace rápido y reversible con el analito de interés, estas características deben también tenerse en cuenta a la hora de buscar reactivos adecuados para actuar como indicadores o moléculas quimiosensoras en el desarrollo de un sensor óptico [Rogers, 2002].

Los indicadores más comúnmente empleados son los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH), compuestos de carbono y oxígeno como la fluoresceína, o de carbono y nitrógeno como los derivados "azo" en los que el grupo "azo" (-N=N-) actúa como un fuerte cromóforo, etc. Otros compuestos que pueden emplearse como indicadores fotométricos en los optodos por su alta capacidad para formar complejos con muchos metales son las ferroínas, las triacinas y las **hidrazonas** [Boisdé, 1996].

4.3.1.3. Material soporte

El éxito en la construcción de un optodo se encuentra en seleccionar la reacción química entre reactivo y analito cuya especificidad, sensibilidad y estabilidad sean las adecuadas para determinar el analito en el medio ambiente. Y una vez que se elige la reacción química, se procede al estudio del soporte sólido más adecuado para su inmovilización [Cámara, 1995]. El material soporte sirve para retener al reactivo de tal forma que se impidan las pérdidas del mismo a la vez que sea accesible al analito [Baldini, 1998; McDonagh, 2008]. El soporte sólido ideal debe cumplir las siguientes características: estabilidad, selectividad hacia el analito investigado, y por consiguiente sin interferencias, reversibilidad y alta sensibilidad.

Dos de los soportes más comúnmente empleados son las *matrices de sol-gel* y las *matrices poliméricas*.

El método sol-gel es un proceso químico en el que a partir de una disolución de óxidos metálicos se lleva a cabo la polimerización y formación de gel generando una matriz rígida porosa en la que el reactivo puede ser atrapado y donde las moléculas de analito pueden difundir [McDonagh, 2008]. El proceso de preparación de este tipo de soporte conlleva tres etapas:

- Mezcla de los precursores en disolución.
- Polimerización y formación del gel en disolución, normalmente catalizada por agua.
- Aplicación de calor para eliminar los productos de condensación y formar la superficie sólida [Boisdé, 1996].

La porosidad de la estructura final determina tanto la capacidad de mantener atrapado al reactivo como el tiempo de respuesta del optodo [Baldini, 1998].

Las matrices poliméricas han sido ampliamente usadas como material soporte en la fase reactiva de los sensores ópticos. Mientras que los polímeros no son tan fotoquímicamente estables como el sol-gel, son más adecuados para trabajar a altas temperaturas. Los materiales poliméricos más empleados incluyen poliestireno (PS), cloruro de polivinilo (PVC), metacrilato de polimetilo (PMMA), polidimetilsiloxanos (PDMS) y politetrafluoroetilenos (PTFE) y derivados de celulosa tales como etil celulosa [McDonagh, 2008].

4.3.2. Métodos de inmovilización

Una vez seleccionado el indicador óptico más idóneo para la fabricación del optodo mediante un completo estudio de sus propiedades en disolución, se hace necesario inmovilizar al mismo sobre un soporte sólido adecuado. Se puede decir que la inmovilización del indicador sobre el soporte sólido es una etapa esencial en la construcción de un sensor óptico. El polímero soporte puede ser vidrio, gel de sílice, celulosa u otro tipo de polímero orgánico. La inmovilización puede llevarse a cabo mediante métodos físicos o químicos, siendo los más destacados: *atrapamiento, adsorción, atracción electrostática y enlace covalente* [Narayanaswamy, 2001] (Fig. 4.3).

Los procedimientos físicos son simples y económicos pero no producen matrices muy estables. Los métodos químicos por el contrario producen enlaces más firmes entre reactivo y soporte, pero normalmente requieren de complicadas reacciones químicas que implican la modificación de las estructuras del reactivo indicador y/o el soporte para conseguir la inmovilización [Gangaiya, 2008; Narayanaswamy, 2001].

I. Inmovilización física: Los métodos físicos de inmovilización pueden incluir (a) atrapamiento, (b) adsorción y (c) atracción electrostática (Fig. 4.3).

- En el *atrapamiento* la molécula de reactivo atraviesa la membrana polimérica quedando atrapada dentro de los huecos intersticiales. Este método se asocia normalmente a especies de alto peso molecular que reaccionan con analitos de bajo peso molecular que atraviesan el soporte sólido.

- El proceso de *adsorción* es una inmovilización físico-química en la que se forman atracciones electrostáticas débiles y fuerzas de Van der Waals, entre las moléculas de reactivo y la superficie del sólido soporte. En este caso, el reactivo es inmovilizado en soportes sólidos como las resinas poliméricas. Se trata de una técnica sencilla pero que puede presentar el inconveniente de una progresiva pérdida del reactivo en el soporte. Sin embargo, la técnica de adsorción está muy generalizada ya que permite la inmovilización de un gran número de reactivos químicos diferentes [Baldini, 1998].

- La *inmovilización electrostática* ocurre cuando la superficie del soporte sólido posee grupos iónicos cargados tales como grupos sulfonados o grupos de amonio cuaternario, permitiendo que el material enlace con especies de carga opuesta. El enlace se produce debido a la interacción electrostática entre el reactivo cargado y los grupos funcionales de carga opuesta de la superficie del soporte, dando lugar a un enlace bastante fuerte. Esta técnica tiene la ventaja de que es fácil de preparar y reproducible.

II. Inmovilización química: La inmovilización química se lleva a cabo mediante la formación de un enlace covalente entre la molécula de reactivo y la superficie del soporte polimérico. Este método produce la unión más firme del reactivo con el soporte sólido, pero para ello se requieren una serie de etapas para que, entre otros aspectos, el soporte o polímero posea suficientes funciones reactivas para la inmovilización (Fig. 4.3).

La elección del tipo de inmovilización a emplear, estará determinada por la facilidad de uso, reproducibilidad, coste, así como al número de etapas requeridas para la inmovilización en el sensor [Wolfbeis, 1991; Narayanaswamy, 1993; Dacres, 2004].

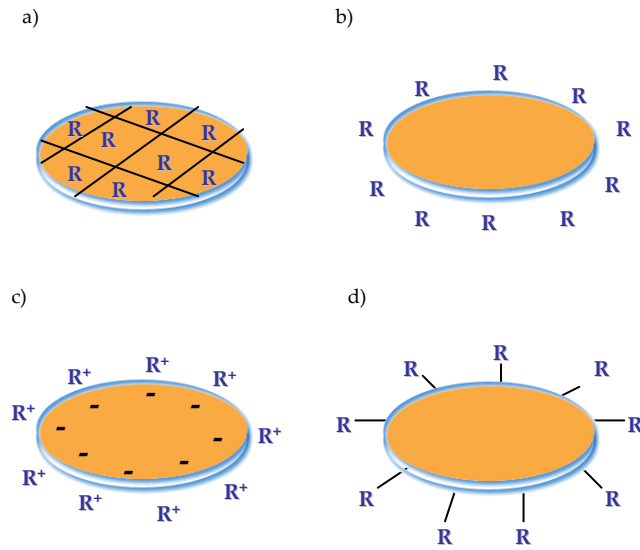


Figura 4.3. Distintos tipos de inmovilización: a) Atrapamiento; b) Adsorción; c) Atracción electrostática; d) Enlace covalente [Narayanaswamy, 1993]

4.3.3. Ventajas e inconvenientes de un optodo

Los optodos ofrecen una serie de ventajas con respecto a otros dispositivos convencionales, como son [Narayanaswamy, 1993]:

- No están sujetos a interferencias eléctricas y magnéticas, y debido a la ausencia de conectores eléctricos, se consideran más seguros que los sensores electroquímicos.
- No requieren de electrodo de referencia.
- El reactivo inmovilizado no tiene que estar en contacto directo con la fibra óptica.
- Resistentes a la corrosión pudiendo trabajar en ambientes industriales hostiles y duros.
- Las fibras ópticas permiten la transmisión de la luz a largas distancias.
- Son seguros ya que están envueltos y no son eléctricos al menos en las regiones sensibles.
- Son geoméricamente flexibles, fácilmente miniaturizados y baratos.
- Capaces de analizar muestras en tiempo real.

- Tienen la posibilidad del desarrollo de sensores múltiples en una sola unidad instrumental empleando varios reactivos inmovilizados.
- Se pueden desarrollar sensores para análisis clínicos, industriales y medioambientales.

Pero los optodos también presentan algunas desventajas:

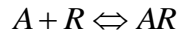
- Posibles interferencias de la luz ambiental. Por ello los sensores de este tipo deben ser usados en ambientes oscuros o bien la señal óptica tiene que ser modulada para evitar esta interferencia.
- Sólo trabajará adecuadamente si se emplea el reactivo apropiado.
- La estabilidad del sensor está sujeta a problemas de inestabilidad del reactivo, debido a efectos de fotodegradación y de pérdidas del mismo.
- Como el reactivo químico y el analito se encuentran en diferentes fases, la etapa de transferencia de masa necesaria para alcanzar el equilibrio químico, limita los tiempos de respuesta.
- Presentan un rango dinámico limitado de medida para las concentraciones del analito, en comparación con los sensores electroquímicos. No obstante, Gangaiya y Mahendra [Gangaiya, 2008] no lo consideran una limitación, ya que en algunas situaciones medioambientales el poder trabajar con sensores dentro de un rango estrecho de concentraciones puede ser de interés.
- Pueden existir interferencias debidas a posibles gases presentes en el ambiente del sensor, dando propiedades químicas similares.
- La irreversibilidad del proceso puede ser un inconveniente en el caso de trabajar con un reactivo costoso.
- etc.
-

A pesar de las limitaciones, los optodos proporcionan una alternativa útil a los sistemas convencionales de medida, debido a las múltiples ventajas que estos aportan a las medidas analíticas. Debido al desarrollo de nuevos reactivos y mejoras en los métodos de inmovilización, los sensores químicos de fibra óptica han sido aplicados a una gran cantidad de áreas, como los procesos industriales, alimentos, aplicaciones clínicas y, por supuesto, en medioambiente.

Una de las características más atractivas de los sensores químicos de fibra óptica es que pueden ser fácilmente miniaturizados.

4.4. Principios ópticos en los optodos

La función de respuesta en sensores químicos de fibra óptica depende de la manera en la que el analito interacciona con la fase reactiva. Por ejemplo, un reactivo (R) que reacciona con la especie analítica (A) y forma un producto (AR) puede ser representado como:



Bien R o AR pueden producir una señal óptica, y pueden por lo tanto, ser medidos ópticamente. El reactivo empleado es normalmente selectivo, produciendo un cambio en la señal dada debido a su interacción con la especie analítica A . La transducción química se basa normalmente en el equilibrio establecido durante la reacción química entre A y R , y ese equilibrio puede ser descrito como:

$$K = \frac{[AR]}{[A] \cdot [R]} \quad (4.1)$$

donde K es la constante de equilibrio y los corchetes indican la concentración en el equilibrio de las especies involucradas.

Durante la reacción química, el reactivo R se consume y por lo tanto, puede disminuir la señal óptica que produce, o bien como se está formando el producto AR , puede que su señal sea la que aumente. De uno u otro modo, el cambio en la propiedad óptica de R o AR puede ser relacionado con su concentración y por consiguiente con la concentración del analito A que provoca los cambios en la propiedad óptica.

Las propiedades ópticas más empleadas en los sensores químicos de fibra óptica son la absorción y la fluorescencia. Pero, como todas, presentan tanto ventajas como inconvenientes. La espectroscopía UV-Vis es una técnica muy sencilla y requiere de poco gasto energético, pero carece de una gran sensibilidad y selectividad para medidas directas. Por otro lado, los sensores luminiscentes presentan una alta sensibilidad para pequeñas cantidades de analito, pero también son muy sensibles a las fluctuaciones de la temperatura y de otros factores medioambientales [Wilson, 2001].

4.4.1 Absorción/Reflectancia

La **espectroscopía de absorción molecular UV-Vis** ha sido ampliamente estudiada en Química Analítica y aplicada en sensores ópticos. Las bases para el análisis se basan en el hecho de que el indicador que reacciona con el analito, absorbe luz. Este fenómeno se describe matemáticamente por la Ley de Lambert-Beer:

$$A = \log \frac{I_0}{I_t} = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (4.2)$$

donde A es la absorbancia, c es la concentración de las especies absorbentes, I_0 y I_t son las intensidades de la luz incidente y transmitida respectivamente, ε es la absorptividad molar de las especies, y l es el paso de luz de las especies absorbentes. Tras la interacción con el analito de interés, las propiedades ópticas del reactivo varían dependiendo de la concentración de la especie a analizar. Debido a que I_t se mide en espectroscopía de absorción, el medio que contiene al analito debe ser transparente [Baldini, 1998].

Sin embargo, si el medio es ópticamente denso o incluso opaco, la absorción produciría una alta señal de fondo, en cuyo caso la técnica alternativa sería la **espectroscopía de reflectancia** que estudia la luz reflejada por la muestra [Narayanaswamy, 2001].

La reflexión tiene lugar cuando la luz se encuentra con dos medios con diferentes constantes dieléctricas. En espectroscopia de reflectancia se presentan dos tipos de reflexión: *reflexión especular* y *reflexión difusa*. La *reflexión especular*, como la de un espejo, ocurre en la interfase de un medio que no permite la transmisión a través de él, produciendo la reflexión con el mismo ángulo que la radiación incidente. La reflexión total interna es un ejemplo de reflexión especular. La *reflexión difusa*, en la que la reflexión procede de una estructura no pulida, la luz penetra en el medio y a continuación reaparece en la superficie después de una absorción parcial, transmisión y dispersión (scattering) dentro del mismo [Narayanaswamy, 2001; Skoog, 2001].

Las medidas de reflectancia, en condiciones normales, contienen las dos componentes de la reflexión. La componente especular contiene muy escasa información sobre la composición, por lo que puede ser minimizada o eliminada a través de la preparación adecuada de la muestra. La componente difusa es la que aporta información útil acerca de la muestra y depende de la composición del sistema, por lo que es la base de las medidas que se realizan con esta técnica.

Entre los varios modelos teóricos que han sido propuestos para la reflectancia difusa, el más ampliamente usado es el de Kubelka-Munk [Kubelka, 1931]. En esta teoría se asume que la radiación incidente sufre tanto un proceso de absorción como de dispersión al contacto con el medio dispersante, de forma que el valor absoluto de la reflectancia (R) está relacionado con el coeficiente de absorción (K) y el coeficiente de dispersión (S) mediante la ecuación:

$$F(R_{\infty}) = \frac{(1 - R_{\infty})^2}{2R_{\infty}} = \frac{K}{S} \quad (4.3)$$

donde $F(R_{\infty})$ es conocida como la función de Kubelka-Munk en términos de reflectancia absoluta.

Sin embargo, en la práctica se emplean valores de reflectancia relativa (R), (Eq. 4.4) comparando el espectro de la luz reflejada por las muestras con el espectro de la luz reflejada por estándares estables, con una alta reflectividad, en un amplio intervalo de longitudes de onda. Los estándares más comúnmente utilizados son el oro coloidal, sulfato de bario y teflón (politetrafluoroetileno) [Rubinson, 2000].

$$F(R) = \frac{(1 - R)^2}{2R} = \frac{K}{S} \quad (4.4)$$

K puede ser expresada en términos de absorptividad molar ε y la concentración c de las especies absorbentes, de tal manera que:

$$K = \varepsilon \cdot c \quad (4.5)$$

Además, al asumir que S es independiente de la concentración, la ecuación quedaría de la siguiente forma:

$$F(R) = \frac{(1 - R)^2}{2R} = \frac{\varepsilon \cdot c}{S} = k \cdot c \quad (4.6)$$

Donde k es una constante de proporcionalidad.

Como se puede observar, la ecuación obtenida es análoga a la relación de Lambert-Beer, siendo válida dentro de un rango determinado de concentraciones [Narayanaswamy, 2001].

En el método desarrollado en el capítulo 6 de esta Tesis, el equipo detectará la radiación reflejada por la muestra en términos de reflectancia difusa o transmitancia (matemáticamente equivalentes), mediante la ayuda de una sonda de fibra óptica. Esta señal será comparada con la radiación incidente y el equipo proporcionará una respuesta similar a la absorbancia en espectroscopia de absorción molecular. Como estándar se utiliza el mismo material del disco empleado.

4.4.2. Fluorescencia

Dentro de los diferentes sensores ópticos existentes, los basados en medidas de fluorescencia son los que atraen un interés especial debido a su gran selectividad, sensibilidad, bajo coste, simplicidad y versatilidad [Prodi, 2000; Martínez-Máñez, 2003].

4.4.2.1. Fluorescencia: Fundamento

Cuando una especie química absorbe radiación electromagnética, pasa a un estado electrónico excitado. Muchas sustancias en ese estado excitado disipan el exceso de energía emitiendo calor (como resultado de las colisiones entre moléculas vecinas) y sólo una minoría (generalmente hidrocarburos poliaromáticos y heterociclos) llamados fluoróforos son capaces de emitir calor y radiación electromagnética, de distinta frecuencia a la absorbida, y que puede utilizarse con fines analíticos.

Un estado electrónico molecular en el cual todos los espines de los electrones están apareados, se llama estado singulete fundamental. Cuando un electrón pasa de este estado a un estado energético superior, puede ocurrir que se conserve su espín o que se produzca un cambio en el valor de éste. En el primer caso tenemos un estado singulete excitado y en el segundo un estado triplete.

El proceso de emisión de un fotón desde el estado singulete excitado hasta el estado singulete fundamental recibe el nombre de **fluorescencia**. Este proceso ocurre inmediatamente después de la excitación, por lo que no es posible percibir visualmente la emisión de fluorescencia una vez eliminada la fuente de radiación; el tiempo de vida medio para el estado singulete excitado es de 10^{-5} a 10^{-8} segundos. Si este proceso fuera desde el estado triplete excitado, recibe el nombre de fosforescencia, con tiempos de vida mayores.

4.4.2.2 Fluorescencia: Etapas

El proceso de fluorescencia está gobernado por tres etapas importantes (Fig. 4.4):

1) *Absorción y excitación*: A temperatura ambiente, la mayoría de las moléculas ocupan el nivel vibracional más bajo dentro del estado electrónico fundamental (S_0). Cuando un fotón de energía $h\nu_{\text{EX}}$ (suministrado por una fuente externa) es absorbido por el fluoróforo, provoca la excitación de la molécula a un determinado nivel vibracional dentro del estado electrónico excitado singulete (S_2).

2) *Relajación vibracional y conversión interna*: Pueden ocurrir algunos procesos después de la absorción de un fotón, pero lo más probable es que ocurra la relajación a un estado de energía vibracional más bajo dentro del primer nivel excitado (S_2). A este proceso se le conoce como *relajación vibracional* (pérdida de energía en ausencia de emisión de luz) y generalmente ocurre en pico-segundos o menos. La relajación vibracional se ve incrementada por el contacto físico entre moléculas, la cual puede ser transferida como calor. Cuando dos niveles de energía electrónicos están lo suficientemente próximos como para que haya un solapamiento de los niveles de energía vibracional, se produce la *conversión interna*. El término conversión interna describe los procesos intermoleculares por los cuales la molécula pasa a un estado electrónico de más baja energía (S_1) sin emisión de radiación [Skoog, 2001].

3) *Emisión*: La molécula permanece en el estado excitado más bajo singulete (S_1) unos nano-segundos. Desde este nivel, la molécula vuelve a cualquier nivel

vibracional del estado fundamental (S_0), emitiendo un fotón de energía $h\nu_{EM}$ en forma de fluorescencia.

Debido a la disipación de energía durante el tiempo de vida medio en el estado excitado, la energía del fotón emitido es menor, por lo que la longitud de onda es mayor que la del fotón de excitación, $h\nu_{EX}$.

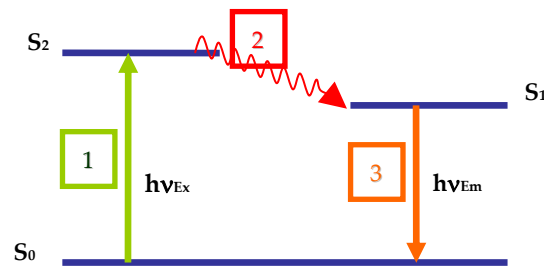


Figura 4.4. Etapas en un proceso de fluorescencia obtenida del diagrama de Jablonski: 1) Absorción; 2) Conversión interna; 3) Fluorescencia [Lakowicz, 2006]

4.4.2.3. Métodos para la detección de fluorescencia

Para la detección de iones metálicos mediante fluorescencia, hay tres formas de observar el cambio de la emisión de fluorescencia del fluoróforo.

a) *Aumento de la fluorescencia*: En este caso, el reactivo orgánico empleado como indicador presenta muy poca o ninguna fluorescencia en ausencia del analito, mientras que se hace más fluorescente en presencia del metal o analito de interés.

b) *Atenuación de fluorescencia o "quenching"*: En este caso, el reactivo presenta una alta fluorescencia en ausencia del metal de interés, mientras que cuando el analito está presente se reduce mucho la fluorescencia o incluso desaparece totalmente.

c) *Cambio del máximo de emisión*: En este procedimiento se produce un cambio en la posición del máximo del pico de emisión dependiendo si el analito está presente o no [Zuki, 2009] (fig 4.5).

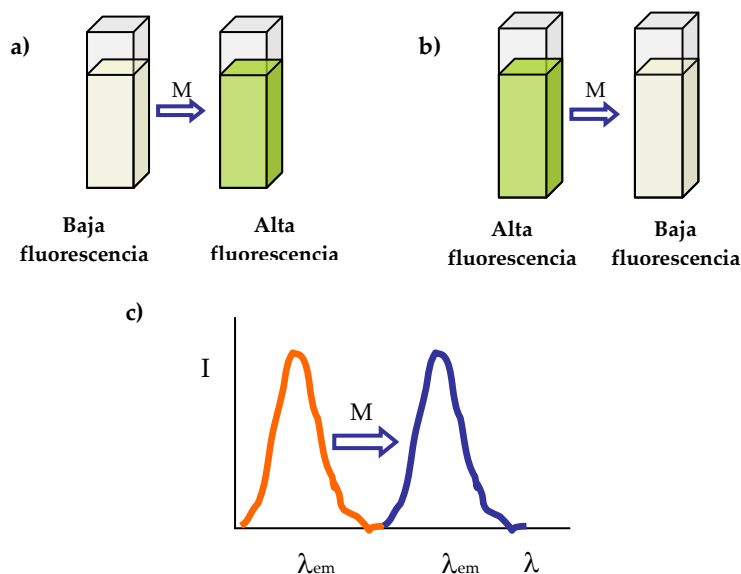


Figura 4.5. Métodos de detección por fluorescencia: a) Aumento de la fluorescencia; b) Atenuación de la fluorescencia; c) Cambio del máximo de emisión

4.4.2.3.1. Atenuación de fluorescencia o “quenching”

La atenuación de fluorescencia se refiere a cualquier proceso en el que se produce una disminución de la intensidad de fluorescencia de una determinada muestra.

Un gran número de interacciones moleculares pueden dar lugar a este tipo de atenuación, tales como, reacciones en estado excitado, reorganizaciones moleculares, procesos de transferencia de energía, formación de complejos en estado fundamental o atenuación estática, y atenuación colisional. Los dos tipos de atenuación más estudiados son la *atenuación dinámica o colisional* y la *atenuación estática* [Lakowicz, 2006].

La *atenuación dinámica o colisional* es debida a colisiones entre el fluoróforo y la especie atenuadora al difundir por la disolución, mientras que en el caso de la *atenuación estática*, las dos moléculas enlazan una con la otra formando un complejo no fluorescente [Albani, 2004].

Para que tanto la atenuación estática como la dinámica tengan lugar, el fluoróforo o especie fluorescente y el atenuador deben tener contacto molecular.

En el caso de la atenuación colisional, el atenuador debe difundir hacia el fluoróforo durante el tiempo de vida que éste permanece en el estado excitado. Al ponerse en contacto, el fluoróforo vuelve al estado fundamental, sin la emisión de ningún fotón. Se puede decir que la atenuación ocurre sin un cambio permanente en las moléculas, es decir, las especies no se ven alteradas químicamente en este proceso. En cambio, en la atenuación estática, se forma un complejo entre el fluoróforo y la especie atenuadora, siendo este nuevo complejo no-fluorescente. Este proceso tiene lugar en el estado fundamental y no necesita de difusión ni de colisiones moleculares.

La atenuación colisional de fluorescencia puede ser analizada mediante la relación de Stern-Volmer, la cual viene dada por la siguiente ecuación (Eq. 4.7):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q] \quad (4.7)$$

Donde F y F_0 son las intensidades de fluorescencia del reactivo en presencia y ausencia del atenuador, respectivamente; $[Q]$ es la concentración del atenuador ("quencher"); k_q es la constante cinética de reacción entre el estado excitado y el "quencher"; τ_0 es el tiempo de vida del fluoróforo en ausencia de "quencher" y K_D es la constante de atenuación de Stern-Volmer. Esta constante indica la sensibilidad del fluoróforo hacia el atenuador. Por ejemplo, un fluoróforo inmerso en una macromolécula es normalmente inaccesible para especies atenuadoras en disolución, por lo que el valor de K_D es bajo. Por el contrario, K_D presenta valores altos en el caso de que el fluoróforo se encuentre libre en disolución o en la superficie de una biomolécula, siendo más accesible para la especie atenuadora [Lakowicz, 2006].

Si el sistema sigue la relación de Stern-Volmer, la representación de F_0/F frente a $[Q]$ debería ser lineal, pero es importante destacar que eso no demuestra que la atenuación sea dinámica, ya que la atenuación estática también puede dar lugar a una representación lineal (Eq. 4.8):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_S [Q] \quad (4.8)$$

aunque con la diferencia de que en este caso la constante se denomina de asociación, en vez de constante de atenuación.

Para diferenciar entre un tipo u otro de atenuación, se puede emplear la temperatura (provoca una mayor difusión de moléculas y por lo tanto aumenta la probabilidad de choque) o bien mediante la formación de nuevas bandas de absorción (en el caso de la formación de complejo en el estado fundamental). Pero el método más efectivo para diferenciarlos es mediante los tiempos de vida de fluorescencia, ya que un quencher estático no afecta la vida media de fluorescencia, como lo hace uno dinámico.

Sin embargo, en muchas ocasiones no se observa un gráfico lineal, sino que presenta cierta desviación positiva (cuando F_0/F es mayor que lo esperado a $[Q]$ grandes), debido a que el mismo atenuador provoca tanto colisiones como enlaces con el fluoróforo. En tales casos la fluorescencia (F_0/F) se debe tanto a la fracción no enlazada como a la fracción no atenuada por colisiones.

Para resolver la no linealidad debida a una **combinación de ambos tipos de atenuación**, se suele emplear una relación modificada de Stern-Volmer [Koneswaran, 2009; Chen, 2006]. Para ello, la atenuación estática se explica introduciendo un factor adicional C en la ecuación lineal S-V (Eq. 4.9), empleando el logaritmo de la ecuación así obtenida (Eq. 4.10):

$$F_0 / F = (1 + K_{SV}[Q]) / C \quad (4.9)$$

$$\log (F_0 / F) = K_{SV}[Q] + C \quad (4.10)$$

En el capítulo 5, se hará un estudio más detallado de estas expresiones.

4.5. Actualidad de los optodos y quimiosensores moleculares

A lo largo de estos años, en el desarrollo de sensores químicos de fibra óptica para la determinación de iones metálicos, se han empleado diferentes materiales poliméricos, destacando el empleo de matrices intercambiadoras de aniones o cationes (Sephadex QAE A-25, Sephadex DEAE, Amberlita CG-400,

Amberlita XAD-2, XAD-4, XAD-7, Duolite C20, Dowex 1X2, Nafion 117), o el entrapamiento en geles (sol-gel, hidrogeles de poliuretano D4) o en matrices hidrofóbicas de PVC, y combinaciones híbridas de estos compuestos. El empleo de la inmovilización física de ligandos complejantes suele ser más frecuente que la inmovilización química al igual que suele ser más adecuado la detección por luminiscencia. Algunos ejemplos recientes de estos sensores fluorimétricos se han desarrollado para Cu(II) empleando un intercambiador aniónico (DEAE-Sephadex), amarillo Lucifer como indicador y un complejo de Ru como luminóforo de referencia inerte [Mayr, 2002]; para Al(III) (en matriz de XAD-4 + reactivo purpurina) [Ahmad, 2002]; para Al(III) y Be(II) (en matriz de Sephadex QAE 25 + reactivo morina) [Ruedas-Rama, 2004]; como sensor de reflectancia para Cu(II) (con Sulfon negro F inmovilizado sobre XAD-7) [Mahendra, 2002] o como el multisensor de reflectancia de Zn(II), Cd(II) y Hg(II) en agua (en matrix de XAD-4 + 2-(5-bromo-2-pyridilazo)5-dietilaminofenol) [Raimundo Jr, 2003].

Recientemente, el empleo de algunos de estos materiales adsorbentes en configuración de membrana (o filtros de disco) ha supuesto destacadas ventajas. El uso de la inmovilización de los reactivos sobre discos mediante extracción en fase sólida permite la detección directa sobre su superficie mediante fibra óptica.

Presenta como ventajas el procesado de un menor volumen de muestra, el incremento de la superficie de contacto entre el inmovilizado y el analito, y la disminución de los desechos del análisis [Gazda, 2004]. Para ello se pueden emplear filtros de disco de octadecil sílice (C₁₈), de poliestireno divinilbenceno (SDB), de intercambio iónico (con grupos funcionales sulfónicos o aminas cuaternarias) o quelatantes (de SDB con grupos funcionales iminodiacéticos). El empleo de discos C₁₈, que permite la retención de diversos reactivos orgánicos tiene el inconveniente de ser inestable a valores de pH inferiores a 2 y superiores a 8, por lo que está limitado su uso en la detección de metales por complejación a valores de pH básicos, en cuyo caso es más adecuado el empleo de polímeros porosos, como SDB que son estables a cualquier pH [Poole, 2003]. La modificación de estos soportes mediante el empleo de adecuados reactivos permite el desarrollo de excelentes sensores para metales [Khorrami, 2006]. Así, se ha descrito un sistema sensor de reflectancia difusa (con discos de intercambio iónico) para la especiación de Cr(III) y Cr(VI) [Steiner, 2006]. También se ha descrito un sensor de Fe basado en discos de intercambio aniónico donde se retiene el complejo de Fe(SCN)₆³⁻

aplicable a aguas naturales [Pons, 2005]. Igualmente, se han utilizado diversos reactivos para la modificación de discos de SDB y posterior medida por reflectancia difusa, como por ejemplo dimetilglioxima para la determinación de Ni(II), con 5-(p-dimetilaminobencilideno rodanina) para Ag(I), con dietilditiocarbamato para Cu(II) y con ácido 8-hidroxi-7-(6-sulfo-2-naftilazo)5-quinolin sulfónico para Fe(III) [Gazda, 2004; Arena, 2003; Fritz, 2003].

Los reactivos de tipo imino son muy buenos agentes quelatantes cromóforos y fluoróforos de los metales de transición. Algunos son muy selectivos y otros reaccionan con varios metales, pudiendo ser utilizados como reactivos en mono- o multi- sensores, respectivamente. Además, su inmovilización en materiales poliméricos puede transformarlos en sustancias más selectivas y sensibles [Hassanien, 2007]. Igualmente, el desarrollo de un sensor fluorimétrico de flujo basado en la retención sobre C₁₈ del complejo de Al(III) con la picolinoil hidrazona del salicilaldehído [Cañizares, 1994] demuestran las posibilidades de estos reactivos.

Debido a que la fase reactiva es considerada el corazón de los sensores ópticos, la mayor parte del progreso en este campo se dirige a la búsqueda de nuevos indicadores o moléculas quimiosensoras altamente selectivos así como el soporte adecuado para ser inmovilizados [Narayanaswamy, 2001].

Es de destacar como recientemente ha crecido el interés por encontrar nuevas moléculas quimiosensoras adecuadas para ser empleadas como indicadores en la fase reactiva de estos sensores para la detección de metales pesados en muestras acuosas, especialmente para metales esenciales y peligrosos como son el Cu, Fe, Zn, Hg, Cd y Al, entre otros. Se pueden encontrar en la bibliografía, diferentes quimiosensores moleculares selectivos de elementos esenciales como el Cu, en los que se puede observar un cambio en la fluorescencia [Zhao, 2009; Li, 2009a] así como otros en los que la detección es debida a cambios en la absorbancia [Chen, 2008; Xiang, 2008; Wang, 2008]. Existen también sensores de este tipo, para metales como Fe o Zn. Para el caso del Fe se pueden encontrar tanto sistemas fluorescentes como colorimétricos [Yao, 2009; Wang, 2010]. En el caso del Zn existen sensores con los que se puede trabajar con ambos cambios de propiedades, debido a los cambios de fluorescencia y de color provocados al

interaccionar el metal con el reactivo [Wang, 2009; Li, 2009b]. También existen varios sensores publicados en la bibliografía para el análisis de Hg empleando cambios en la fluorescencia [Li, 2010; Ma, 2010] así como cambios en la absorbancia [Tan, 2008; Nuriman, 2009]. Se pueden además destacar la existencia de moléculas indicadoras para la detección de metales de gran interés por su toxicidad, como Cd y Al [Luo, 2007; Zhao, 2006].

La importancia de este tipo de moléculas se debe fundamentalmente a sus múltiples aplicaciones en el campo de la bioquímica, medicina, biología celular, química analítica y medioambiente [Bargossi, 2000; Gholivand, 2005].

En definitiva, los sensores químicos de fibra óptica u optodos han supuesto una contribución importante al análisis in-situ permitiendo los análisis espectroscópicos en el sitio de interés. Estos sistemas han permitido al analista llevar el laboratorio a la muestra en lugar de la muestra al laboratorio [Cámara, 1995].

Por ello, en este bloque de la Tesis se ha abordado en primer lugar la búsqueda de un indicador o quimiosensor molecular adecuado que puede ser inmovilizado y aplicado en el desarrollo de un sensor químico de fibra óptica. Así, en el capítulo 5, se ha desarrollado un **quimiosensor molecular fluorescente (indicador) selectivo para cobre basado en la atenuación de fluorescencia de una base de Schiff**. Y en el capítulo 6, se ha inmovilizado este reactivo en un soporte sólido adecuado (discos SDB), y se ha empleado la técnica de fibra óptica para conducir la señal analítica hasta el detector, desarrollando un **sensor químico de fibra óptica para la determinación de cobre**.

Referencias

Ahmad, M., Narayanaswamy, R., 2002. Optical fibre Al(III) sensor based on solid surface fluorescence measurement. *Sensors and Actuators B: Chemical* 81, 259-266.

Albani, J.R., 2004. *Structure and dynamics of macromolecules: Absorption and Fluorescence studies*. Amsterdam. Elsevier.

Anastas, P.T., Warner, J.C., 2000. *Green Chemistry: Theory and Practice*. New York. Oxford University Press.

- Ansllyn, E.V., **2007**. Supramolecular Analytical Chemistry. *Journal of Organic Chemistry. Perspective* 72, 687-699.
- Arena, M.P., Porter, M.D., Fritz, J.S., **2003**. Rapid, low level determination of silver(I) in drinking water by colorimetric–solid-phase extraction. *Analytica Chimica Acta* 482, 197–207.
- Baldini, F., Bracci, S., **1998**. Adsorption-based optical transduction in optical fibre chemical sensors for environmental and industrial applications. *Adsorption and its Applications in Industry and Environmental Protection Studies in Surface Science and Catalysis* 120, 925-948.
- Baldini, F., Chester, A.N., Homola, J., Martellucci, S., **2006**. *Optical Chemical Sensors*; NATO Science Series 224. New York. Springer.
- Bargossi, C., Fiorini, M.C., Montalti, M., Prodi, L., Zaccheroni, N., **2000**. Recent developments in transition metal ion detection by luminescent chemosensors. *Coordination Chemistry Reviews* 208, 17-32.
- Boisdé, G., Harmer, A., **1996**. *Chemical and Biochemical Sensing with Optical Fibers and Waveguides*. Norwood. Artech House Publishers.
- Buffle, J., Tercier-Waeber, M.L., **2000**. In situ voltammetry: concepts and practice for trace analysis and speciation, in: J. Buffle, G. Hoarvai (Eds.), *In situ Monitoring of Aquatic Systems; Chemical Analysis and Speciation*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, West Sussex, UK, pp. 279-405.
- Cámara, C., Pérez-Conde, C., Moreno-Bondi, M.C., Rivas, C., **1995**. *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry* 17, 165-193.
- Casado-Terrones, S., Tesis Doctoral **2007**. Desarrollo de sensores ópticos y métodos separativos como herramientas actuales en Química Analítica. Comparación metodológica. Universidad de Granada.
- Cañizares, P., Luque de Castro, M.D., Valcárcel, M. **1994**. Flow-through fluorimetric sensor for the determination of aluminium at the nanogram per milliliter level. *Analytical Letters* 27, 247-262.
- Chen, J., Gao, Y., Xu, Z., Wu, G., Chen, Y., Zhu, C., **2006**. A novel fluorescent array for mercury (II) ion in aqueous solution with functionalized cadmium selenide nanoclusters. *Analytica Chimica Acta* 577, 77–84.
- Chen, X., Li, Z., Xiang, Y., Tong, A., **2008**. Salicylaldehyde fluorescein hydrazone: a colorimetric logic chemosensor for pH and Cu(II). *Tetrahedron Letters* 49, 4697-4700.
- Clement, R.E., Yang, P.W., **2001**. Environmental analysis. *Analytical Chemistry* 73, 2761-2790.
- Crisp, J., **1998**. *Introduction to Fibre Optics*. Oxford. Newnes.
- Dacres, H., PhD Thesis., **2004**. Investigation of reagent systems in the development of an optical nitric oxide sensor. University of Manchester.
- Fritz, J.S., Arena, M.P., Steiner, S.A., Porter, M.D., **2003**. Rapid determination of ions by combined solid-phase extraction–diffuse reflectance spectroscopy. *Journal of Chromatography A* 997, 41–50.
- Fukuba, T., Imhof, A., Matsunaga, M., Takagi, N., Yamamoto, T., Okamura, K., Naganuma, T., Fujii, T., **2005**. Development of miniaturized In Situ Analysis Devices for Biological and Chemical Oceanography,

- Proceedings of the 3rd Annual International IEEE EMBS Special Topic Conference on Microtechnologies in Medicine and Biology, Kahuhu, Oahu, Hawaii, 12-15 May 2005.
- Gangaiya, P., Mahendra, N., **2008**. Chapter 24: The application of fibre optic chemical sensors for heavy metal monitoring in contaminated environments. *Developments in Soil Science* 32, 589-600.
- Gazda, D.B., Fritz, J.S., Porter, M.D., **2004**. Determination of nickel(II) as the nickel dimethylglyoxime complex using colorimetric solid phase extraction. *Analytica Chimica Acta* 508, 53-59.
- Gholivand, M.B., Niroomandi, P., Yari, A., Joshagani, M., **2005**. Characterization of an optical copper sensor based on *N,N'*-bis(salicylidene)-1,2-phenylenediamine. *Analytica Chimica Acta* 538, 225-231.
- Hassanien, M.M., Kenawy, I.M., El-Menshawly, A.M., El-Asmy, A.A., **2007**. Separation and Preconcentration of Gallium(III), Indium(III), and Thallium(III) Using New Hydrazone-modified Resin. *Analytical Sciences* 23, 1403-1408.
- Hulanicki, A., Glab, S., Ingman, F., **1991**. Chemical Sensors definitions and classification. *Pure and Applied Chemistry* 63, 1247-1250.
- Janata, J., **2009**. *Principles of Chemical Sensors*. 2nd Edition. New York. Springer.
- Johnson, K.S., Elrod, V.A., Nowicki, J.L., Coale, K.H., Zamzow, H., **2000**. Continuous flow techniques for on site and in situ measurements of metals and nutrients in sea water, in: J. Buffle, G. Hoarvai (Eds.), *In situ Monitoring of Aquatic Systems; Chemical Analysis and Speciation*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, West Sussex, UK, pp. 223-252.
- Khorrami, A.R., Hashempur, T., Mahmoudi, A., Karimi, A.R., **2006**. Determination of ultra trace amounts of cobalt and nickel in water samples by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry after preconcentration on modified C₁₈-silica extraction disks. *Microchemical Journal* 84, 75-79.
- Koneswaran, M., Narayanaswamy, R., **2009**. L-Cysteine-capped ZnS quantum dots based fluorescence sensor for Cu²⁺ ion. *Sensors and Actuators B: Chemical* 139, 104-109.
- Krohn, D.A., **1992**. *Fibre Optic Sensors: Fundamentals and Application*, 2nd Edition. Research Triangle Park, NC, USA. Instrument Society of America.
- Kubelka, P., Munk, F., **1931**. An Article on Optics of Paint Layers. *Zeitschrift für Technische Physik* 12, 593-601.
- Lakowicz, J.R., **2006**. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Third Edition. New York. Springer.
- Li, H.G., Yang, Z.Y., Qin, D.D., **2009a**. A new Schiff-base type selective fluorescent chemosensor for Cu²⁺. *Inorganic Chemistry Communications* 12, 494-497.
- Li, H.Y., Gao, S., Xi, Z., **2009b**. A colorimetric and "turn-on" fluorescent chemosensor for Zn(II) based on coumarin Schiff-base derivative. *Inorganic Chemistry Communications* 12, 300-303.
- Li, C.Y., Xu, F., Li, Y.F., **2010**. A fluorescent chemosensor for silver ions based on porphyrin compound with high selectivity. *Spectrochimica Acta Part A*. In Press. Accepted manuscript.

- Luo, H.Y., Jiang, J.H., Zhang, X.B., Li, C.Y., Shen, G.L., Yu, R.Q., **2007**. Synthesis of porphyrin-appended terpyridine as a chemosensor for cadmium based on fluorescent enhancement. *Talanta* 72, 575–581.
- Ma, T.H., Zhang, A.J., Dong, M., Dong, Y.M., Peng, Y., Wang, Y.W., **2010**. A simple and highly selective “turn-on” type fluorescent chemosensor for Hg²⁺ based on chiral BINOL-Schiff’s base ligand. *Journal of Luminescence* 130, 888–892.
- Mahendra, N., Gangaiya, P., Sotheeswaran, S., Narayanaswamy, R., **2002**. Investigation of an optical fibre Cu(II) sensor using Fast Sulphon Black F (FSBF) immobilised onto XAD-7. *Sensors and Actuators* 181, 196–201.
- Martinez-Máñez, R., Sancenón, F., **2003**. Fluorogenic and chromogenic chemosensors and reagents for anions. *Chemical Reviews* 103, 4419–4476.
- Mayr, T., Klimant, I., Wolfbeis, O.S., Werner, T., **2002**. Dual lifetime referenced optical sensor membrane for the determination of copper(II) ions. *Analytica Chimica Acta* 462, 1–10.
- McDonagh, C., Burke, C.S., MacCraith, B.D., **2008**. Optical Chemical Sensors. *Chemistry Reviews* 108, 400–422.
- Namiesnik, J., Szefer, P., **2010**. *Analytical Measurements in Aquatic Environments*. Londres. Taylor & Francis Group.
- Narayanaswamy, R., **1993**. Optical Chemical Sensors: Transduction and signal processing. Tutorial Review. *Analyst*, 118, 317–322.
- Narayanaswamy, R., **2001**. Absorbance based sensors, Chapter in *Encyclopedia of Ocean Sciences*, Ed. J.H.Steele, S.A.Thorpe & K.K.Turekian, Academic Press, pp. 6–12.
- Narayanaswamy, R., Wolfbeis, O.S., **2004**. *Optical Sensors: Industrial, Environmental and Diagnostic Applications*. Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors. Germany. Springer, Heidelberg.
- Nuriman, Kuswandi, B., Verboom, W., **2009**. Selective chemosensor for Hg(II) ions based on tris[2-(4-phenyldiazenyl)phenylaminoethoxy]cyclotriveratrylene in aqueous samples. *Analytica Chimica Acta* 655, 75–79.
- Orellana, G., García-Fresnadillo, D., Marazuela, M.D., Moreno-Bondi, M.C., Delgado, J., Sicilia, J.M., **1998**. Fibre-optic chemical sensors: From molecular engineering to environmental analytical chemistry in the field. *Monitoring of Water Quality* 103–115.
- Orellana, G., Moreno-Bondi, M.C., **2005**. *Frontiers in Chemical Sensors: Novel Principles and Techniques*. New York. Springer.
- Pons, C., Forteza, R., Cerdá, V., **2005**. The use of anion-exchange disks in an optrode coupled to a multi-syringe flow-injection system for the determination and speciation analysis of iron in natural water samples. *Talanta* 66, 210–217.
- Poole, C.F., **2003**. New trends in solid-phase extraction. *Trends in Analytical Chemistry* 22, 362–373.

- Prodi, L., Bolletta, F., Montalti, M., Zaccheroni, N., **2000**. Luminescent chemosensors for transition metal ions. *Coordination Chemistry Reviews* 205, 59-83.
- Raimundo Jr, I.M., Narayanaswamy, R., **2003**. Simultaneous determination of Zn(II), Cd(II) and Hg(II) in water. *Sensors and Actuators B* 90, 189-197.
- Rogers, C.W., Wolf, M.O., **2002**. Luminescent molecular sensors based on analyte coordination to transition-metal complexes. *Coordination Chemistry Reviews* 233-234, 341-350.
- Rubinson, K.A., Rubinson, J.F., **2000**. *Análisis instrumental*. Madrid. Prentice-Hall.
- Ruedas-Rama, M.J., Ruiz-Medina, A., Molina-Díaz, A., **2004**. Implementation of flow-through multi-sensors with bead injection spectroscopy: fluorimetric renewable surface biparameter sensor for determination of berillium and aluminum. *Talanta* 62, 879-886.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., **2001**. *Principios de Análisis Instrumental*. 5ª Edición. Madrid. McGraw-Hill.
- Steiner, S.A., Porter, M.D., Fritz, J.S., **2006**. Ultrafast concentration and speciation of chromium(III) and (VI). *Journal of Chromatography A* 1118, 62-67.
- Tan, J., Yan, X.P., **2008**. 2,1,3-Benzoxadiazole-based selective chromogenic chemosensor for rapid naked-eye detection of Hg²⁺ and Cu²⁺. *Talanta* 76, 9-14.
- Varney, M.S., **2000**. *Chemical Sensors in Oceanography*. Ocean Science and Technology (A series of books in oceanography, Volume 1). Amsterdam. Gordon and Breach Science Publishers.
- Wang, Z., Fan, X., Li, D., Feng, L., **2008**. A highly selective and colorimetric naked-eye chemosensor for Cu²⁺. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 71, 1224-1227.
- Wang, J., Ha, C.S., **2009**. A colorimetric and fluorescent turn-on chemosensor for Zn²⁺ based on an azobenzene- containing compound. *Tetrahedron* 65, 6959-6964.
- Wang, S., Gwon, S.Y., Kim, S.H., **2010**. A highly selective and sensitive colorimetric chemosensor for Fe²⁺ based on fluoran dye. *Spectrochimica Acta Part A*. In Press. Accepted Manuscript.
- Wilson, D.M., Hoyt, S., Janata, J., Booksh, K., Obando, L., **2001**. *IEEE Sensors Journal* 1, 4, 256-274.
- Wolfbeis, O.S., **1991**. *Fiber-Optic Chemical Sensors and Biosensors, Volume I*, USA. CRC Press Inc.
- Wolfbeis, O.S., **2006**. *Fiber-Optic Chemical Sensors and Biosensors*. *Analytical Chemistry* 78, 3859-3874.
- Xiang, Y., Li, Z., Chen, X., Tong, A., **2008**. Highly sensitive and selective optical chemosensor for determination of Cu²⁺ in aqueous solution. *Talanta* 74, 1148-1153.
- Yao, J., Dou, W., Qin, W., Liu, W., **2009**. A new coumarin-based chemosensor for Fe³⁺ in water. *Inorganic Chemistry Communications* 12, 116-118.
- Zhao, Y., Lin, Z., Liao, H., Duan, C., Meng, Q., **2006**. A highly selective fluorescent chemosensor for Al³⁺ derivated from 8-hydroxyquinoline. *Inorganic Chemistry Communications* 9, 966-968.

Zhao, M., Yang, X.F., He, S., Wang, L., 2009. A rhodamine-based chromogenic and fluorescent chemosensor for copper ion in aqueous media. *Sensors and Actuators B: Chemical* 135, 625-631.

Zuki, H.M., PhD Thesis December 2009. Optical multi-metal ion sensing systems based on immobilised fluorescent reagents. University of Manchester.

Capítulo 5:

*Químiosensor molecular
fluorescente (indicador) selectivo
para cobre basado en la
atenuación de fluorescencia de
una base de Schiff*

Capítulo 5: Químiosensor molecular fluorescente (indicador) selectivo para cobre basado en la atenuación de fluorescencia de una base de Schiff

Resumen

En este capítulo se ha estudiado la capacidad que tiene la base de Schiff 2-hidroxibenzaldehído benzoilhidrazona (2-HBBH) para ser aplicada como **químiosensor molecular fluorescente (indicador)** de iones Cu(II) en disolución acuosa. La formación del complejo 2-HBBH-Cu(II) provoca la atenuación (“quenching”) de la fluorescencia del reactivo, la cual depende de la concentración del metal en la muestra.

La relación de Stern-Volmer modificada fue aplicada para obtener la calibración lineal de esta atenuación en medio agua/etanol (53% v/v) y acidez controlada con disolución reguladora de fosfato (pH 7). El rango dinámico de aplicabilidad del sensor obtenido llegó hasta una concentración metálica de 157,4 μM , con un límite de detección de 5,6 μM y una desviación estándar relativa de 5,2% para una concentración de cobre de 78,7 μM . Por último, se evaluó la influencia de otros iones metálicos tanto en la fluorescencia de la base de Schiff como en la respuesta del sensor durante la determinación de cobre. La presencia de iones tales como Al^{3+} , Ca^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Na^+ , Pb^{2+} o Zn^{2+} no afectaron ambos procesos.

Los resultados obtenidos mostraron que la *interacción metal-ligando sensor* era rápida, reversible, sensible y selectiva, capaz de producirse en disoluciones neutras y potencialmente aplicable en el desarrollo de dispositivos sensores ópticos con aplicaciones biológicas y medioambientales.

5.1. Introducción

La mayoría de los métodos de análisis de metales pesados que detectan por espectrometría de absorción atómica (AAS) o mediante el empleo de electrodos selectivos de iones (ISE) requieren de grandes cantidades de muestra, son relativamente caros o no permiten el análisis en continuo o *in-situ*. Así pues, se hace necesario el desarrollo de métodos analíticos capaces de detectar los iones metálicos de una manera sensible, selectiva y rápida [Nuriman, 2009].

Actualmente, la detección de metales mediante ligandos sensores en disolución juega un papel importante, debido a sus potenciales aplicaciones en varias áreas. Este tipo de sensores suelen emplear moléculas orgánicas que generan una señal analítica como respuesta al enlace entre el indicador y el analito de interés [Safari, 2004; Kuswandi, 2006].

Normalmente, los metales de transición son relativamente fáciles de quelatar por ligandos orgánicos cromóforos o fluoróforos. No obstante, los complejos formados suelen tener baja solubilidad en disoluciones acuosas, lo que limita su aplicabilidad [Suresh, 2010]. Además, para reactivos fluorescentes los cambios en la señal sólo pueden ser observados en la mayoría de los casos en disolventes no acuosos, limitando en gran medida sus aplicaciones a muestras reales. De hecho, hay pocos sensores químicos para iones metálicos en disolución que puedan trabajar en medios acuosos u otros medios respetuosos con el medioambiente como es el etanol [Zhao, 2009; Chen, 2008].

Por ello, tiene gran interés el desarrollo de nuevos ligandos sensores que, además de elevada sensibilidad y selectividad, puedan operar en disoluciones acuosas siendo robustos frente a los cambios de pH, lo que facilitaría su aplicación en muestras biológicas y medioambientales [Beltramello, 2001].

La detección de metales mediante quimiosensores moleculares fluorescentes y colorimétricos, ha sido ampliamente estudiada en los últimos años debido a sus numerosas aplicaciones.

En particular, los sensores para la determinación de los metales más contaminantes o esenciales tales como Hg, Cd, Cu o Zn, han recibido especial atención [Gholivand, 2005] pudiéndose comprobar por la gran cantidad de artículos publicados recientemente en este campo [Zhao, 2009; Li, 2009a; Yao, 2009; Wang, 2010; Wang, 2009; Li, 2009b; Li, 2010; Ma, 2010].

El cobre juega un papel importante no sólo como elemento esencial en los sistemas biológicos sino que a su vez representa una gran preocupación medioambiental cuando se encuentra en cantidades incontroladas, pudiendo provocar intoxicaciones graves e incluso letales [Prodi, 2000; Fu, 2007]. Este metal es un elemento de gran relevancia en geoquímica que puede ser fácilmente liberado de silicatos, sulfitos y óxidos mediante erosión, pasando al agua. Por otro lado, el aumento de la concentración de cobre en el medioambiente también puede provenir del procesado de metales y de la industria minera, vertidos, refinerías, y del uso de cobre como compuesto base en pinturas anti-incrustamiento [Duffus, 1983]. La ingestión diaria de cobre es indispensable para la salud. Sin embargo, grandes cantidades de este metal pueden ser dañinas, causando irritación en la nariz y garganta, náusea, vómitos y diarrea. Altas dosis de cobre pueden causar daños en el hígado y riñones. El hombre está expuesto al cobre por el agua de bebida, el aire, la comida, e incluso a través de la piel por contacto con compuestos que contienen este metal [Aksuner, 2008].

En la última década, se han empleado diversos ligandos orgánicos como fluoróforos y reactivos colorimétricos para el análisis de cobre.

En 2001, Kim y colaboradores [Kim, 2001] propusieron un método para la determinación espectrofluorimétrica de Cu(II) mediante el empleo del ácido 4,5-dihidroxi-1,3-bencenodisulfónico (Tiron) como reactivo fluorescente. Observaron que a medida que el Cu(II) era complejado por el reactivo, la intensidad de la fluorescencia disminuía proporcionalmente con la concentración del metal (efecto "quenching"). Con este sistema se obtuvo un buen límite de detección de 0,38 μM y un rango lineal de aplicación de 0,5-10 μM de cobre. Se encontró que el Co(II) producía una gran interferencia a la hora de determinar Cu(II), la cual fue eliminada añadiendo oxalato a la disolución.

En el mismo año, Beltramello y colaboradores [Beltramello, 2001] desarrollaron un sensor fluorescente para Cu(II) en agua empleando 2,4,6-triamino-1,3,5-trihidroxiciclohexano (TACI) a pH 7 y sin ninguna interferencia de otros iones metálicos divalentes. La capacidad de este sensor para trabajar a pH neutros y con poca dependencia a pequeñas variaciones de pH, le hacen adecuado para aplicaciones reales en biología y medioambiente.

Zhou y colaboradores en 2004, [Zhou, 2004] publicaron un sensor fluorescente para la detección de Cu(II) empleando un derivado de la piridina. Los resultados mostraron la gran capacidad de este ligando para formar compuestos específicos con el Cu(II) sin la interferencia de otros iones metálicos. La explicación a este hecho la atribuye a la geometría cíclica que presenta este compuesto en disolventes polares como la dimetilformamida (DMF).

También se han empleado reactivos orgánicos más comunes, como es el caso del sensor propuesto por Mei y colaboradores [Mei, 2006]. Estos investigadores emplearon un derivado de 8-hidroxiquinolina (oxina) para la determinación selectiva y sensible de Cu(II) en un medio agua:dioxano.

En 2006, Wu y colaboradores [Wu, 2006] sintetizaron un nuevo ligando fluorescente, aminonaftol, para la detección selectiva de Cu(II) en disolución acuosa dentro de un amplio rango de pH. Debido a que no se observaron grandes cambios en la disminución de la fluorescencia al variar la acidez del medio dentro del rango de pH de 5-9, este sensor podía ser aplicado para el análisis de cobre en aguas residuales, procedentes de la industria, etc.

Un año más tarde, en 2007, se publicaron algunos artículos en este campo. Cabe citar el sensor fluorescente estudiado por Liang y colaboradores [Liang, 2007]. Este nuevo sensor para Cu(II) se basa un interesante mecanismo mediante el empleo de luz ultravioleta y visible para activar o desactivar a la molécula fluorescente de calix[4]areno, respectivamente.

Weng y colaboradores [Weng, 2007] estudiaron 5-(p-N,N'-bis(2-piridil)amino)fenil-10,15,20-tris(p-metoxifenil)porfirina zinc como fluoróforo para la detección selectiva de Cu(II). Se trata de un ligando complejo que presenta dos grupos funcionales importantes en la molécula, por un lado el grupo que flourece y por otro el que enlaza con el metal. En este sensor basado en el fenómeno "quenching", se observa como la adición de AEDT recupera la fluorescencia, permitiendo así la creación de sensores reversibles químicamente.

No sólo existen sensores químicos basados en cambios de fluorescencia, sino que también se pueden encontrar en la bibliografía sensores para la detección de cobre mediante medidas de absorción molecular UV-vis.

Lee y colaboradores [Lee, 2007], desarrollaron en el 2007 un sensor colorimétrico selectivo para Cu(II) basado en receptores de azobenceno en un medio con acetonitrilo. La interacción de esta molécula con el Cu(II) daba lugar a un cambio de color de rojo a amarillo apreciable a simple vista. En este mismo artículo se propuso la inmovilización de la molécula receptora sobre gel de sílice para la detección de este metal.

En 2008, Wang y colaboradores [Wang, 2008] diseñaron un sensor colorimétrico para la detección de Cu(II). En presencia de este metal, el reactivo empleado 3-nitro-4-etilendiamido-nitrobenzoceno provocaba un cambio de color de amarillo a rojo claramente apreciable a simple vista. Todas las experiencias se llevaron a cabo en medio metanol/agua a pH 7,6.

Koneswaran y colaboradores [Koneswaran, 2009] estudiaron nanopartículas semiconductoras conocidas como "*quantum dots*" (QDs) como moléculas fluorescentes para este tipo de sensores de Cu(II). Estos autores describen el "quenching" de fluorescencia de "L-cisteína-ZnS quantum dots" provocado por iones Cu(II) en medio acuoso a pH 5. El límite de detección del sistema fue de 7,1 μM y con un rango de aplicación amplio de 0 a 260 μM de Cu(II). Sólo Ag(I) y Fe(III) causaron mínimas interferencias a concentraciones elevadas.

Zhao y colaboradores [Zhao, 2009] han propuesto recientemente un sensor basado en el aumento de la fluorescencia de 1-(rodamina B)lactamiosemicarbazida en presencia de Cu(II). Presenta un límite de detección muy bueno (0,041 μM de Cu(II)) y el rango de aplicación va desde 0,5 hasta 10 μM de Cu(II). Desafortunadamente, la limitación de este sistema radica en la interferencia del Hg(II) y el de no ser aplicable en muestras acuosas u otros medios respetuosos con el medioambiente.

Además, es de destacar como la mayoría de este tipo de sensores para el análisis de cobre requieren de moléculas complejas y caras como materiales de partida para la síntesis del ligando o quimiosensor molecular.

Por lo que se hace todavía necesario el estudio de nuevos ligandos sensores fluorescentes para cobre. Actualmente la mayor parte de las investigaciones en este área van dirigidas a encontrar nuevos agentes quelatantes selectivos de iones metálicos para el desarrollo de este tipo de sensores.

En esta línea, las hidrazonas han mostrado interesantes resultados en la separación y preconcentración de metales pesados. En concreto, las aroilhidrazonas son bases de Schiff con una gran capacidad para formar complejos con iones metálicos de transición debido al carácter donador del *N* adicional y frecuentemente el *O*. La estructura de las bases de Schiff proporciona una geometría adecuada para la complejación, produciendo una notable selectividad, sensibilidad y estabilidad para un ion metálico específico [Aksuner, 2009]. Sin embargo, estos reactivos han sido empleados como indicadores en sensores colorimétricos o fluorescentes en contadas ocasiones [Xiang, 2008; Chen, 2008; Li, 2009a].

Xiang y colaboradores en 2008 [Xiang, 2008] investigaron un sensor selectivo para Cu(II) empleando salicilaldehído hidrazona y rodamina 6G como reactivo colorimétrico el cual pasa de incoloro a naranja en presencia de Cu(II) en la disolución. Este sensor permite trabajar con medios respetuosos con el medioambiente (agua/etanol) así como a pH neutro. El rango de trabajo fue establecido desde 0,05 hasta 5 μM de Cu(II) y un límite de detección de 0,01 μM de Cu(II).

Por otro lado, Chen y colaboradores [Chen, 2008] emplearon salicilaldehído fluoresceína hidrazona como reactivo orgánico colorimétrico para la determinación selectiva de Cu(II) siendo a su vez un excelente sensor de pH debido a que los cambios en las propiedades ópticas del sistema respondían tanto a la variación de Cu(II) en el medio como al pH.

Con carácter más reciente, se ha empleado 1-fenil-3-metil-5-hidroxipirazol-4-carbaldehído (benzoil)hidrazona para la detección de Cu(II) [Li, 2009a]. Li y

colaboradores observaron como este reactivo orgánico sufría una disminución de la fluorescencia en presencia de Cu(II) debido a la afinidad termodinámica de estos iones metálicos por ligandos con N y O quelatantes.

La 2-hidroxibenzaldehído benzoilhidrazona (2-HBBH) es una aroilhidrazona que ha sido descrita como agente quelatante con una notable relevancia biológica tanto en la formación de complejos de cobre como de hierro. Este reactivo destaca por sus interesantes propiedades, tales como actividad antitumoral y antibacteriana relacionadas con la inhibición de la síntesis de ADN y crecimiento celular, en quimioterapia, y como agente terapéutico [Chan, 1995; Jhonson, 1982]; además es sintetizado a partir de compuestos de bajo coste. Puede reaccionar con una amplia variedad de cationes metálicos de transición y formar un gran número de complejos [Liu, 2006; Zidan, 2003]. Se pueden encontrar en la literatura diversos estudios acerca de la relación entre la estructura de los complejos metálicos sólidos y su actividad biológica [Ainscough, 1999], pero rara vez se ha empleado este ligando como cromóforo o reactivo analítico fluorescente [Lu, 2006; Sreeja, 2005].

Así pues, el principal objetivo del trabajo descrito en este capítulo es desarrollar un sensor molecular fluorescente selectivo para cobre usando un ligando común y fácil de preparar, como es la 2-HBBH.

5.2. 2-Hidroxibenzaldehído benzoilhidrazona (2-HBBH)

La 2-HBBH es una importante base de Schiff la cual posee tres grupos con capacidad para formar enlaces de coordinación con cationes metálicos de transición: el grupo hidroxilo del fenol, el nitrógeno del grupo azometino, y el grupo carbonilo de la amida (fig. 5.1). La reactividad del grupo hidroxilo fenólico depende fuertemente del medio, y no participa en la coordinación con metales en medios ligeramente ácidos ($pK_{a1(aq)} = 6,77$). Así pues, el carbonilo de la amida y el nitrógeno del grupo azometino juegan un papel más importante en la coordinación que el oxígeno fenólico cuando el grupo hidroxilo no está ionizado y la reacción de complejación se ve altamente influenciada por el pH [Lu, 2006].

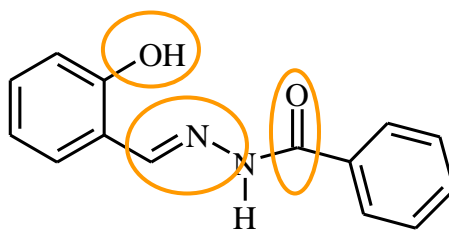


Figura 5.1. Estructura de la molécula 2-HBBH

El reactivo orgánico empleado (2-HBBH) fue obtenido de acuerdo con la síntesis descrita anteriormente en el Anexo A (ver Anexo A.5) mediante la reacción entre 2-hidroxibenzaldehído (2-HB) y benzoihidrazona (BH) (Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania)).

La disolución acuoetanólica de la 2-HBBH presenta buenas propiedades espectrales tanto en absorción como en emisión las cuales se ven modificadas cuando se forma el complejo ligando-Cu²⁺. La gran afinidad termodinámica de los iones Cu²⁺ por los ligandos con "N" u "O" como elemento quelatante y la adecuada cinética del proceso de enlace de esta reacción (según la *regla de Irving-Williams*, que se comentará en este capítulo), hacen adecuado el estudio de este ligando como quimiosensor molecular para este metal.

5.2.1. Características espectrales de la 2-HBBH y Cu-2-HBBH

La 2-HBBH fue caracterizada ópticamente mediante *espectroscopía de absorción UV-Vis y fluorimetría*, con el fin de observar los cambios producidos por la presencia de cobre y por consiguiente de su interacción con la 2-HBBH.

Los espectros de absorción de la 2-HBBH en disolución acuoetanólica fueron llevados a cabo añadiendo diferentes concentraciones de iones Cu²⁺ a disoluciones de pH controlado con una concentración fija de reactivo de 47,6 μM.

En el espectro de absorción de la 2-HBBH en ausencia de metal se puede comprobar como el reactivo presenta cuatro transiciones importantes, las cuales se observan a 204 nm, 235 nm, un pico con dos hombros a 288 nm y 298 nm, y finalmente otro a 326 nm, respectivamente (Fig. 5.2).

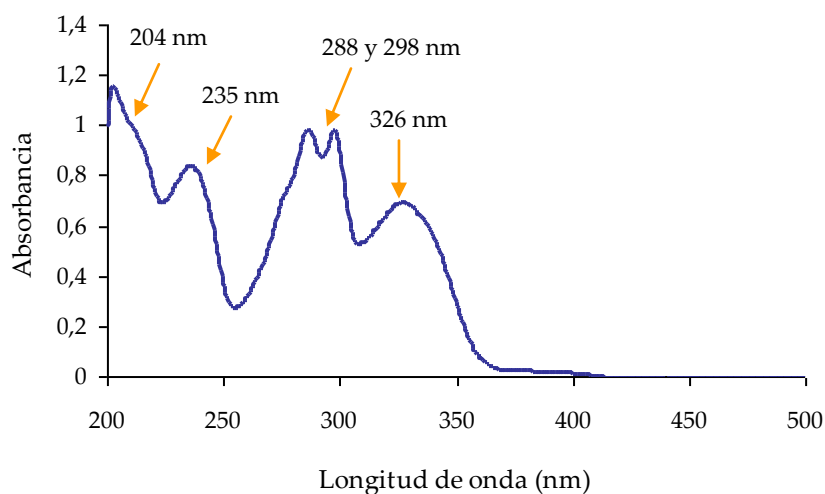


Figura 5.2. Espectro de absorción UV-vis de la 2-HBBH en disolución acuotánolica en ausencia de cobre. Condiciones: : pH=6,5 y $C_{2\text{-HBBH}} = 47,6 \mu\text{M}$

Cuando se añade la disolución de metal, la absorbancia de los picos del reactivo pueden modificarse de diferente manera (puede crecer, decrecer, aparecer nuevos picos y/o sufrir algún tipo de desplazamiento la longitud de onda del pico). En este caso, todos los picos citados decrecían al añadir cobre a la disolución, excepto el pico a 235 nm que aumentaba con las adiciones. A su vez, un nuevo pico apareció a 380 nm aproximadamente, el cual crecía con el aumento de la concentración de ion Cu^{2+} . El estudio de la evolución del espectro indica que se forma el complejo Cu^{2+} -2-HBBH alcanzando el nuevo pico un máximo de intensidad cuando se llega al volumen de equivalencia, es decir, cuando las concentraciones de ligando y metal son aproximadamente iguales (ver figura 5.3).

Con el fin de evaluar la capacidad de otros metales de formar también complejo con la 2-HBBH, se realizaron estos mismos estudios previos en disolución mediante medidas de absorbancia con la 2-HBBH para diferentes iones metálicos de interés medioambiental: Zn^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , etc.

De todas las experiencias realizadas en el estudio de la reaccionabilidad del ligando con distintos cationes, se observó como sólo al añadir Zn(II) a pH 8,5 y Ni(II) a pH 10 se detectaba un nuevo pico bien definido que crecía con las

adiciones en la región alrededor de 400 nm, el cual podía ser atribuido al complejo formado entre la 2-HBBH y dichos metales (fig. 5.4 y fig. 5.5).

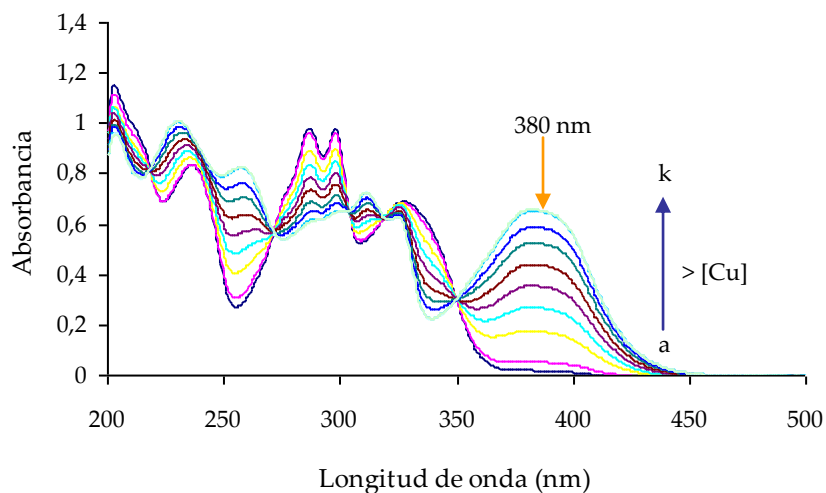


Figura 5.3. Espectro de absorción UV-vis de la 2-HBBH en disolución acuoetanólica en presencia de diferentes cantidades de cobre. Condiciones: : pH=6,5; $C_{2-HBBH} = 47,6 \mu\text{M}$; $C_{Cu^{2+}} (\mu\text{M})$: (a) 0; (b) 6,3; (c) 12,6; (d) 18,9; (e) 25,2; (f) 31,5; (g) 37,8; (h) 44,1; (i) 50,4; (j) 56,7; (k) 63,0

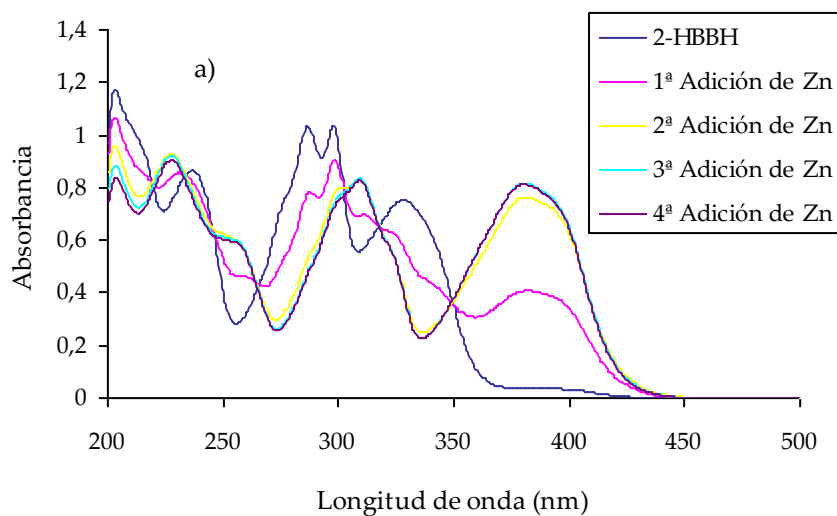


Fig. 5.4. Espectros de absorción UV-Vis de 2-HBBH $4,76 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ en presencia de diferentes adiciones de Zn $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ a pH=8,5

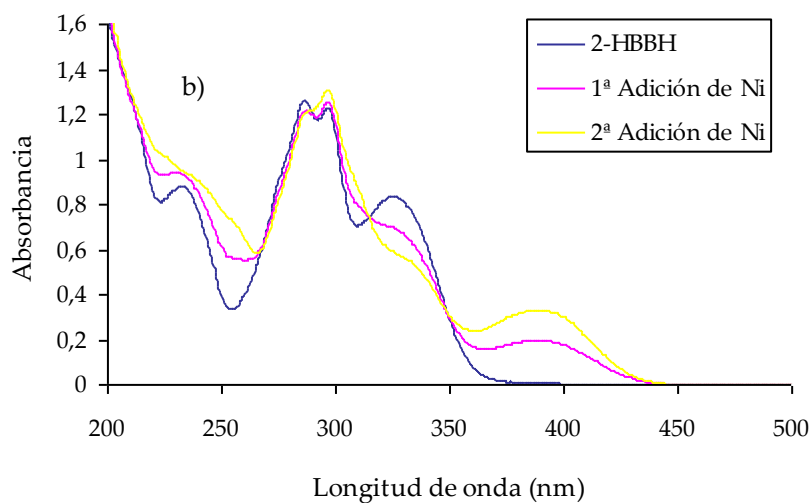


Fig. 5.5. Espectros de absorción UV-Vis de 2-HBBH $4,76 \cdot 10^{-5}$ M en presencia de diferentes adiciones de Ni $2,5 \cdot 10^{-5}$ M a pH=10

- Por otro lado, se llevaron a cabo estudios de los espectros de fluorescencia de la 2-HBBH a pH 7 en disolución acuoetanólica con una concentración fija de reactivo de $94 \mu\text{M}$ (fig. 5.6).

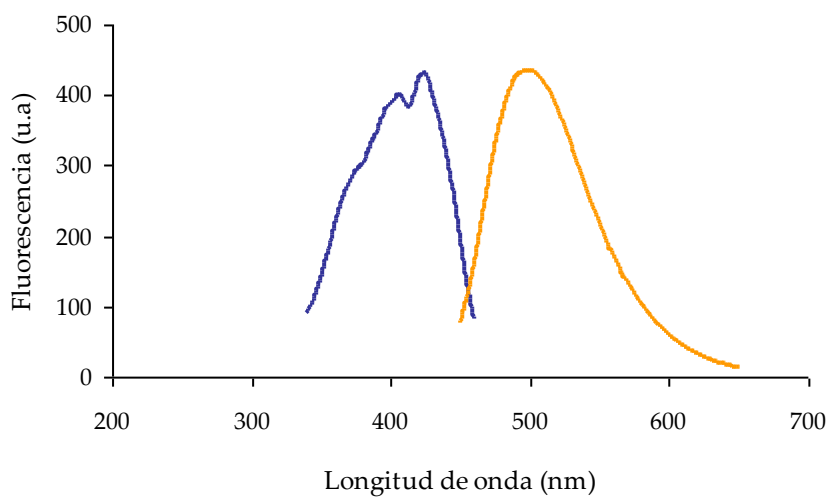


Figura 5.6. Espectro de excitación y emisión de la 2-HBBH a pH=7 en disolución acuoetanólica ($C_{2-HBBH} = 94 \mu\text{M}$)

El espectro de fluorescencia de la 2-HBBH en disolución acuoetanólica mostró una banda a 490 nm mediante excitación a 424 nm. De estos estudios se detectó como a medida que iba aumentando la concentración de cobre, se producía una disminución de la fluorescencia de manera significativa. Este efecto ocurría cuantitativamente con el aumento de la concentración metálica y sin un cambio significativo en la posición del máximo de emisión como se puede observar en la figura 5.7.

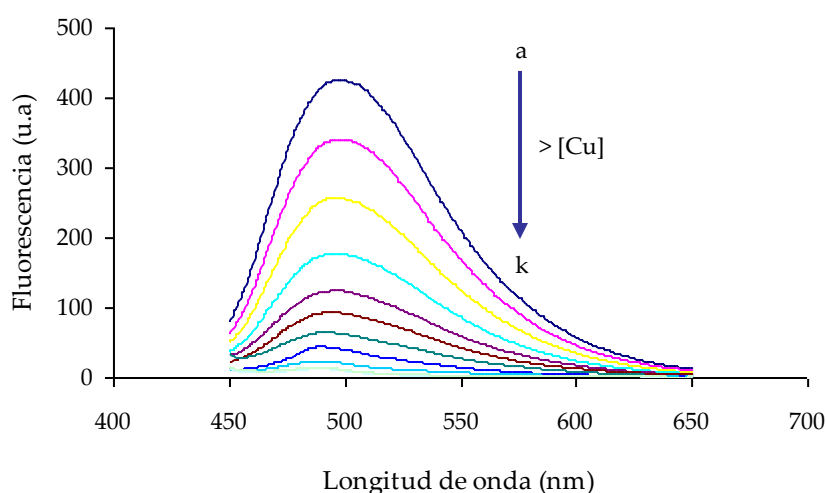


Figura 5.7. Espectro de emisión de fluorescencia de la 2-HBBH en presencia de diferentes concentraciones de Cu^{2+} en disolución acuoetanólica. Condiciones: $C_{2\text{-HBBH}} = 180 \mu\text{M}$; $C_{\text{Cu}^{2+}} (\mu\text{M})$: (a) 0; (b) 15,7; (c) 31,4; (d) 47,1; (e) 62,8; (f) 78,5; (g) 94,2; (h) 109,9; (i) 125,6; (j) 141,3; (k) 157; $\lambda_{\text{Ex}} = 424$ y $\lambda_{\text{Em}} = 490$ nm; pH= 7

Este fenómeno puede ser debido a la interacción del cobre (especie desactivadora o “quencher”) y la 2-HBBH (fluoróforo o sensor molecular fluorescente). El cobre es un ion paramagnético con un orbital d vacío el cual puede provocar una fuerte disminución de la fluorescencia del fluoróforo [Gunnlaugsson, 2004]. La desactivación o atenuación de la molécula fluorescente puede ser debida a una transferencia de energía electrónica o a una transferencia de electrón involucrando al cobre y al ligando orgánico excitado, tal y como se detecta en otros sensores de ion Cu^{2+} [Boiocchi, 2003; Bolletta, 1999]. Así, el desarrollo de este sensor crea un procedimiento simple y selectivo para la detección de cobre.

La desactivación mediante transferencia de energía electrónica se produce cuando se transfiere la energía del estado excitado a otra de las especies en su estado fundamental. Muchos sensores fluorescentes para oxígeno gas se basan en este tipo de desactivación, donde la presencia de oxígeno es detectada mediante la disminución de la fluorescencia. El otro principio para el proceso de atenuación implica la desactivación del estado excitado mediante la eliminación o adición de un electrón desde o hacia uno de los estados excitados de alguno de los orbitales ocupados con un solo electrón. Esta transferencia de electrón fotoinducida deja al fluoróforo en un estado oxidado o reducido que no le permite emitir radiación [Rogers, 2002].

5.2.2. Efecto del pH en la formación del complejo Cu-2-HBBH

El pH es una variable muy importante que afecta en gran medida a la formación del complejo. Para delimitar la zona óptima, se registró el espectro de absorción del complejo metálico 2-HBBH con Cu(II), empleando Hydrion-buffer en el rango de pH de 3 a 11, para la longitud de onda de máxima absorción a 380 nm.

Las disoluciones se prepararon adicionando 3,2 mL de Hydrion buffer (pH 3-11) a una disolución acuotánolica (68% v/v) conteniendo 2-HBBH $3,2 \times 10^{-5}$ M y Cu^{2+} $3,2 \times 10^{-5}$ M, llevándose a un volumen final de 5 mL.

Puede observarse en la figura 5.8 el amplio rango de pH de trabajo del complejo. Las absorbancias más altas indicaron que el pH óptimo para llevar a cabo la determinación de Cu(II), se encontraba entre 5 y 8,5, por lo que, para futuros experimentos se seleccionó pH 7 como valor óptimo.

Ese amplio rango de pH hace que este sistema sea muy útil para diversas aplicaciones en disoluciones acuosas, tales como la detección de iones cobre en aguas residuales, industriales, agua de mar, etc., debido a que el pH no es una limitación considerable [Wu, 2006].

Además, dentro de ese amplio rango de pH del sensor, es de destacar que la mayor respuesta de cobre se encuentra a valores neutros de pH, los cuales están dentro del rango apropiado para aplicaciones biológicas y medioambientales.

A valores de pH muy altos se observa una disminución brusca de la absorbancia la cual puede atribuirse a la competición del complejo Cu-2-HBBH con la precipitación del hidróxido de cobre [Kim, 2001].

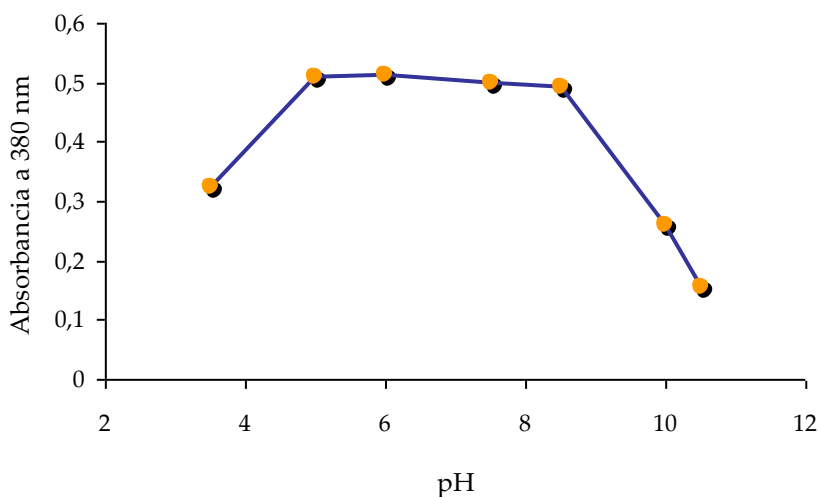


Figura 5.8. Efecto del pH sobre la absorbancia del complejo de Cu-2-HBBH a 380 nm en disolución acuotánolica ($C_{2-HBBH} = 32 \mu M$; $C_{Cu^{2+}} = 32 \mu M$)

5.2.3. Determinación de la estequiometría del complejo Cu-2-HBBH

Una vez seleccionado el valor óptimo de pH para trabajar con el complejo Cu-2-HBBH, se pasó a determinar la estequiometría del mismo en disolución, empleando dos métodos diferentes: el **método de las variaciones continuas** y el **método de la relación molar**.

En primer lugar se realizó el **método de las variaciones continuas** o **método de Job**, empleando concentraciones diferentes, para bajas y altas concentraciones de las disoluciones de partida de reactivo y metal. En este método, se van mezclando sistemáticamente en diferentes proporciones disoluciones de catión y ligando, de igual concentración analítica, de forma que el volumen total y

los moles totales de reactivos de todas las mezclas sea constante [Kirkbright, 1965; Job, 1928].

Se prepararon una serie de disoluciones en las cuales la suma del número de moles de ligando más la suma del número de moles de metal se mantiene constante. Mientras la suma permanezca constante, los agregados pueden variar. Las disoluciones se preparan de la siguiente manera: 2 mL de Hydrion buffer a pH 6,5 se adicionan a una disolución acuoetanólica (75% v/v) conteniendo concentraciones de 2-HBBH y Cu^{2+} de 0 a 3×10^{-5} M para la primera aplicación del método de Job a bajas concentraciones, y de 0 a $9,7 \times 10^{-5}$ M para el segundo estudio a altas concentraciones, siendo el volumen total de 4 mL. Para cada caso, las disoluciones contenían un volumen constante de etanol (mediante adición de la disolución acuoetanólica de 2-HBBH o etanol absoluto) con el fin de mantener un valor fijo de la constante dieléctrica entre ellas. Las medidas espectrofotométricas se registraron al máximo de absorción de 380 nm y se representaron frente a la fracción molar de metal.

La composición de cada una de las disoluciones empleadas para la determinación de la estequiometría del complejo Cu-2-HBBH, además de la proporción de Cu, aparecen a continuación en las tablas 5.1 y 5.2.

Tabla 5.1. Composición en volumen de las disoluciones empleadas en la determinación de la estequiometría del complejo Cu(II)-2-HBBH por el método de las variaciones continuas para bajas concentraciones. (Volumen final=4 mL)

Muestras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tampón (pH 6,5)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Cu(II) $1,2 \cdot 10^{-4}$ M	0	0,063	0,125	0,188	0,250	0,313	0,375	0,500	0,625	0,750	0,875	1
2-HBBH $1,2 \cdot 10^{-4}$ M (en etanol)	1	0,937	0,875	0,812	0,750	0,687	0,625	0,500	0,375	0,250	0,125	0
Etanol	0	0,063	0,125	0,188	0,250	0,313	0,375	0,500	0,625	0,750	0,875	1
Agua	1	0,937	0,875	0,812	0,750	0,687	0,625	0,500	0,375	0,250	0,125	0
X_{Cu}	0	0,063	0,125	0,188	0,250	0,313	0,375	0,500	0,625	0,750	0,875	1

Los volúmenes están expresados en mL

Tabla 5.2. Composición en volumen de las disoluciones empleadas en la determinación de la estequiometría del complejo Cu(II)-2-HBBH por el método de las variaciones continuas para altas concentraciones. (Volumen final=4 mL)

Muestras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tampón (pH 6,5)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Cu(II) $3,9 \cdot 10^{-4}$ M	0	0,063	0,125	0,188	0,250	0,313	0,375	0,500	0,625	0,750	0,875	1
2-HBBH $3,9 \cdot 10^{-4}$ M (en etanol)	1	0,937	0,875	0,812	0,750	0,687	0,625	0,500	0,375	0,250	0,125	0
Etanol	0	0,063	0,125	0,188	0,250	0,313	0,375	0,500	0,625	0,750	0,875	1
Agua	1	0,937	0,875	0,812	0,750	0,687	0,625	0,500	0,375	0,250	0,125	0
X_{Cu}	0	0,063	0,125	0,188	0,250	0,313	0,375	0,500	0,625	0,750	0,875	1

Los volúmenes están expresados en mL

Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 5.9 y 5.10. Como se aprecia en ambos casos, el cruce de las dos líneas que se obtienen por regresión lineal de los puntos delimita un punto de corte que corresponde al valor de fracción molar X_{Cu} característico del complejo ($X_{Cu} = 0,5$), representando por tanto una relación estequiométrica de 1:1.

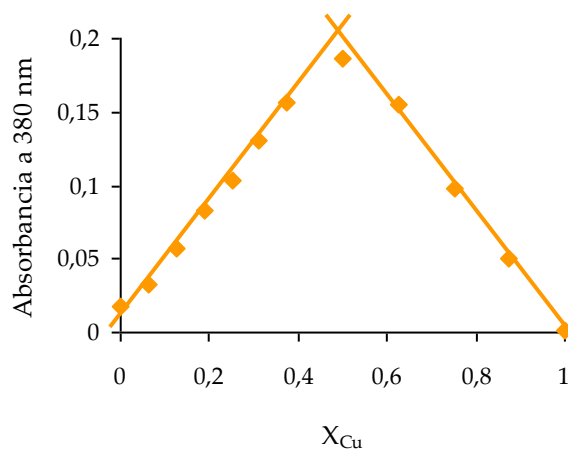


Figura 5.9. Aplicación del método de las variaciones continuas en el cálculo de la estequiometría de Cu-2-HBBH empleando disoluciones diluidas

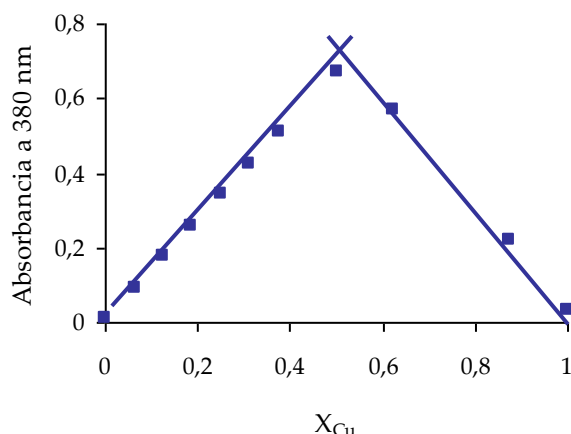


Figura 5.10. Aplicación del método de las variaciones continuas en el cálculo de la estequiometría de Cu-2-HBBH empleando disoluciones concentradas

En segundo lugar, se aplicó el **método de la relación molar**, el cual consiste en la medición de la señal espectrofotométrica del complejo metal-ligando en una serie de disoluciones en las que se mantiene constante la concentración analítica de uno de los reactivos, mientras que se varía la del otro [Skoog, 2005; Yoe, 1944]. En este caso, se mantuvo constante la concentración de reactivo, la 2-HBBH, y se fue variando la concentración de Cu(II); este estudio sólo se realizó en este caso para un nivel de concentración.

Para este método, se adicionaron 2 mL de Hydrion buffer de pH 6,5 a una disolución acuoetanólica (80% v/v) conteniendo 2×10^{-5} M de 2-HBBH y diferentes concentraciones de Cu²⁺ variando desde 5×10^{-6} hasta 4×10^{-5} M, siendo el volumen total de 5 mL. También en este caso las disoluciones contenían el mismo volumen constante de etanol y las medidas espectrofotométricas se registraron a 380 nm.

La composición de cada una de las disoluciones empleadas así como los resultados obtenidos aparecen en la tabla 5.3 y en la figura 5.11.

Como se puede observar con el punto de corte entre las rectas, los resultados coinciden con los obtenidos por el método anterior, confirmando que la estequiometría del complejo Cu-2-HBBH es **1:1**.

Tabla 5.3. Composición en volumen de las disoluciones empleadas en la determinación de la estequiometría del complejo por el método de la relación molar. (Volumen final=5 mL)

Muestras	1	2	3	4	5	6	7	8
Tampón (pH 6,5)	2	2	2	2	2	2	2	2
Cu (II) 10 ⁻⁴ M	0,25	0,50	0,75	1	1,25	1,50	1,75	2
2-HBBH 10 ⁻⁴ M (en etanol)	1	1	1	1	1	1	1	1
Agua	1,75	1,5	1,25	1	0,75	0,50	0,25	0
Mol catión por mol ligando Cu/2-HBBH	0,25	0,5	0,75	1	1,25	1,5	1,75	2

Los volúmenes están expresados en mL

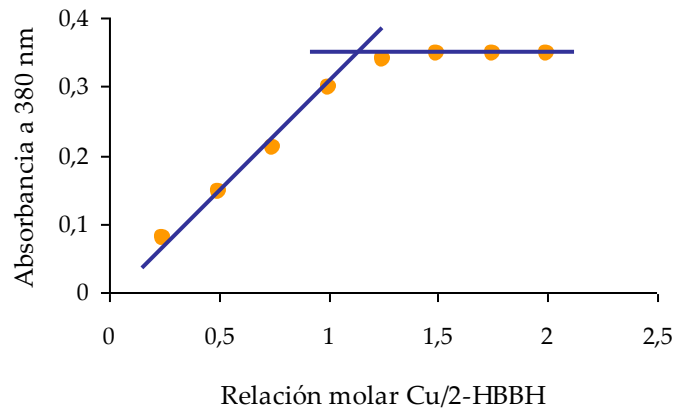


Figura 5.11. Aplicación del método de la relación molar en el cálculo de la estequiometría de Cu-2-HBBH

5.2.4. Determinación de la constante de formación del complejo

La formación de un complejo determinado ML , a partir de un ligando L y un ion central M , es una reacción reversible, definida como:



cuya constante de equilibrio:

$$K = \frac{[ML]}{[M][L]} \quad (5.2)$$

se denomina constante de formación o constante de estabilidad del complejo. Es decir, cuanto mayor es el valor de la constante de formación de un complejo, más favorecida está su formación a partir de sus componentes (metal y ligando), y por tanto el complejo es más estable.

Para determinar la constante de formación del complejo estudiado se han llevado a cabo dos procedimientos. Por un lado, se han empleado las dos curvas obtenidas por el método de las variaciones continuas a diferentes concentraciones [Job, 1928; Kirkbright, 1965] y por otro empleando el método de la relación molar [Yoe, 1944; Skoog, 2005].

a) *Cálculo de K mediante el método de las variaciones continuas:* Se representan en una misma gráfica los valores obtenidos mediante el método de las variaciones continuas (Fig. 5.12).

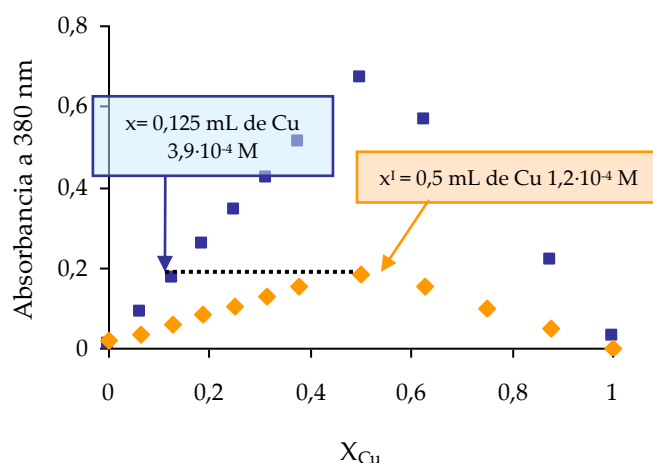


Figura 5.12. Aplicación del método de las variaciones continuas con diferentes concentraciones para el cálculo de la constante de formación del complejo de Cu-2-HBBH. (◆) $C_{inicial} = 1,2 \cdot 10^{-4} M$; (■) $C_{inicial} = 3,9 \cdot 10^{-4} M$

A un determinado punto x de la curva, le corresponde una determinada concentración del complejo C_x . Por lo que la constante de formación se puede expresar de la siguiente manera:

$$K = \frac{C_x}{(M - C_x) \cdot (D - C_x)} \quad (5.3)$$

donde M y D representan la concentración total de metal y ligando inicial, y considerando la estequiometría del complejo 1:1.

Si elegimos otro punto, x' con la misma absorbancia, bien en el lado opuesto al máximo dentro de la misma curva o bien a la misma altura en una curva con diferente concentración (la cual es la opción que se ha seguido en este caso), la ecuación anterior para el cálculo de la constante de formación puede ser completada con este nuevo punto:

$$K = \frac{C_{x'}}{(M - C_{x'}) \cdot (D - C_{x'})} \quad (5.4)$$

Igualando las expresiones 5.3 y 5.4:

$$K = \frac{C_x}{(M - C_x) \cdot (D - C_x)} = \frac{C_{x'}}{(M' - C_{x'}) \cdot (D' - C_{x'})} \quad (5.5)$$

y teniendo en cuenta que C_x y $C_{x'}$ son iguales, ya que han sido seleccionadas para los puntos x y x' a la misma absorbancia, se llega a la siguiente expresión tras una serie de cálculos:

$$C_x = \frac{MD - M'D'}{(M + D) - (M' + D')} \quad (5.6)$$

Por otro lado, del gráfico se pueden calcular las concentraciones de M y D en ambos puntos, ya que se trata de valores conocidos (Tabla 5.4).

Tabla 5.4. Valores de M , D , M' y D'

Absorbancia	M	D	M'	D'
0,2	$1,22 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	$8,53 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	$1,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	$1,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

Por lo que, al introducir estos valores en la expresión 5.6, se obtiene el valor de C_x . A continuación, al sustituir C_x en la expresión inicial 5.3, se llega al valor de la constante de formación: $K = 6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$.

b) *Cálculo de K mediante el método de la relación molar*: Otra manera sencilla de determinar la constante de formación del complejo es aprovechando la curvatura existente en la representación del método de la relación molar. Para llevar a cabo la determinación de esta constante, se necesita:

- La pequeña diferencia o "GAP" de absorbancia entre el punto de intersección teórico de las dos rectas que se obtienen por el ajuste lineal de los puntos y el punto correspondiente para la misma relación molar metal/ligando de la curva experimental (fig. 5.13):

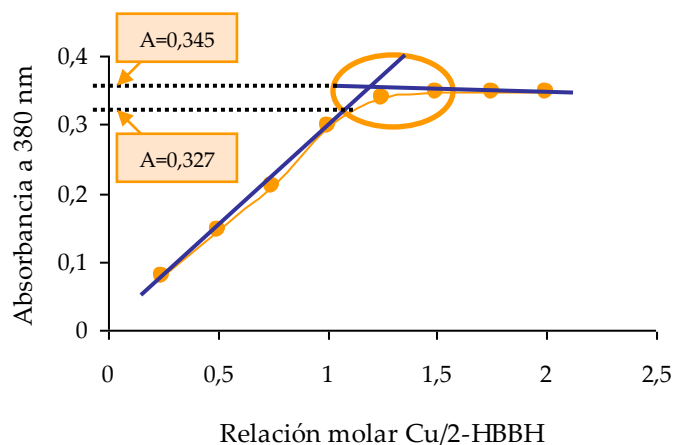
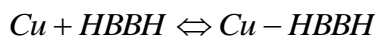


Figura 5.13. Aplicación del método de la relación molar para el cálculo de la constante de formación del complejo de Cu-2-HBBH

- Teniendo en cuenta que la estequiometría del complejo metal-ligando es 1:1, según la reacción:



- Y que se cumple la ley de Beer:

$$A = l \cdot c \cdot \varepsilon \quad (5.7)$$

Por lo que mediante una serie de cálculos sencillos, se puede estimar el valor de la constante de formación del complejo.

De todo esto se deduce que, $K = 6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ confirmando el resultado anterior y mostrando un complejo bastante estable.

5.2.5. Estudio de las características del complejo Zn-2-HBBH

Dado que el Zn(II) es un metal que suele encontrarse a mayores concentraciones que el resto de los metales traza en las muestras ambientales y biológicas y que por las experiencias previas se pudo observar como también formaba complejo con la 2-HBBH al pH de trabajo para el cobre, se decidió estudiar en mayor profundidad esta reacción, con el fin de conocer sus características y tenerlas en consideración en los estudios de interferencias en la determinación de Cu(II), que es el analito de interés en este trabajo.

Este tipo de estudios en disolución (estequiometría y constante de formación), son de gran relevancia a la hora de desarrollar un sensor óptico, ya que es muy importante tener caracterizado perfectamente al complejo metálico que se forma antes de optimizar las variables que afectan al sistema. Además, es muy importante conocer qué complejo tendrá una constante de formación mayor por lo que será más estable termodinámicamente y estará más favorecida su detección por el sensor.

Para determinar la estequiometría del complejo de Zn-2-HBBH, se aplicó también el **método de las variaciones continuas** y el **método de la relación molar**.

Pero en este caso, el método de la relación molar fue el que se realizó de dos formas diferentes, variando la concentración de Zn(II) y manteniendo constante la de 2-HBBH en el primer caso, y variando la concentración de 2-HBBH y fijando la de Zn(II) en el segundo caso.

Se prepararon una serie de disoluciones con diferentes concentraciones de 2-HBBH y Zn(II) para cada uno de los tres estudios realizados, siguiendo el mismo procedimiento que para el caso del Cu(II). En todos ellos se añadieron 2 mL de hidrógeno ftalato de potasio y borax a pH 8,5 a una disolución acuotánolica al 75% v/v (para el método de las variaciones continuas); al 80% v/v (para el método de la relación molar y concentración de ligando constante) y 60% v/v (para el método de la relación molar y concentración de metal constante) empleando en todas las experiencias una concentración inicial de ligando y metal de $2 \cdot 10^{-4}$ M. El volumen de etanol se mantuvo constante en todas las experiencias. Las medidas espectrofotométricas fueron registradas al máximo de absorción de 373 nm.

Los resultados obtenidos para este caso se muestran en las figuras 5.14, 5.15 y 5.16.

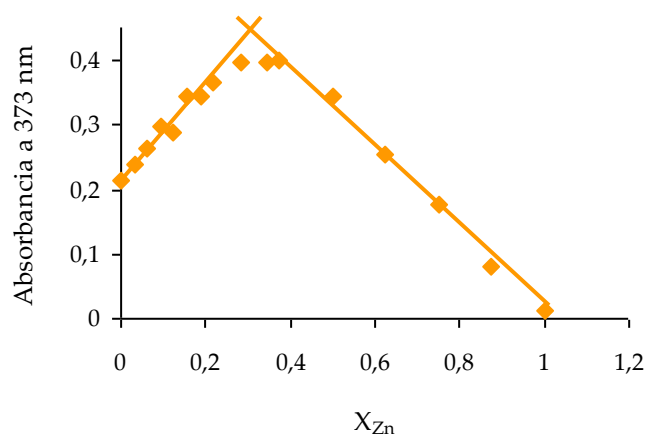


Figura 5.14. Aplicación del método de las variaciones continuas en el cálculo de la estequiometría de Zn-2-HBBH

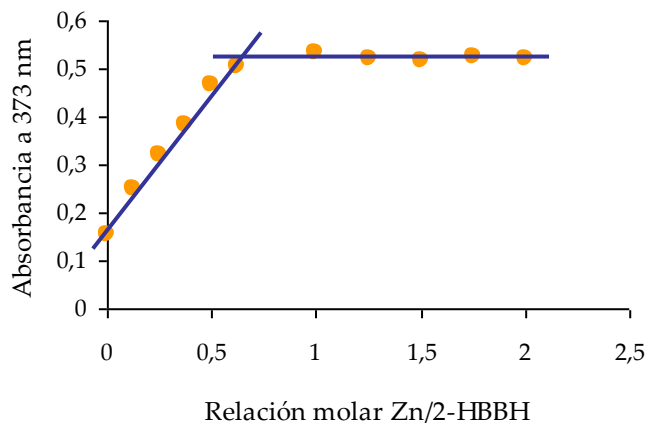


Figura 5.15. Aplicación del método de la relación molar en el cálculo de la estequiometría de Zn-2-HBBH para concentración constante de 2-HBBH $4 \cdot 10^{-5}$ M

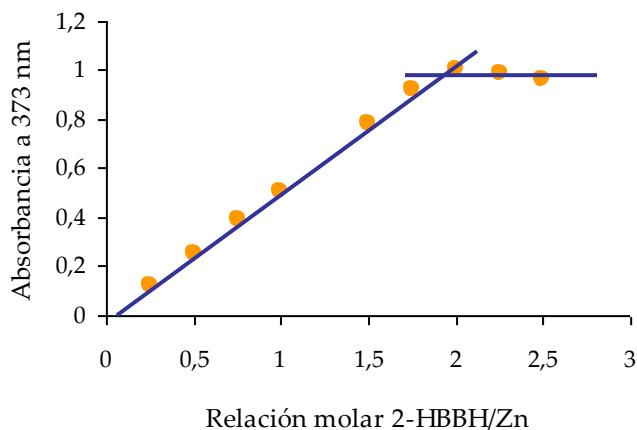


Figura 5.16. Aplicación del método de la relación molar en el cálculo de la estequiometría de Zn-2-HBBH para concentración constante de Zn $4 \cdot 10^{-5}$ M

Como se puede observar por el punto de corte entre las dos rectas, en el método de las variaciones continuas éstas cortan a un valor de $X_{Zn} = 0,33$, indicando que por cada mol de Zn(II) hay dos moles de ligando; en el método de la relación molar manteniendo constante la concentración de 2-HBBH cortan en 0,5, indicando que por cada mol de Zn hay dos moles de ligando; y finalmente al aplicar el método de la relación molar manteniendo constante la concentración de Zn(II) cortan en 2, indicando que por cada dos moles de ligando hay un mol de

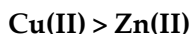
Zn(II). Por todo ello, se confirma que la estequiometría del complejo Zn-2-HBBH es **1:2**.

De la misma forma que para el complejo anterior, teniendo en cuenta 1) la diferencia o "GAP" de absorbancia entre los puntos teórico y experimental de cada una de las representaciones de los métodos, 2) la estequiometría 1:2 entre Zn(II) y 2-HBBH y 3) empleando la ley de Beer, se puede calcular la constante de formación, llegando al mismo valor por ambos métodos: $K_f = 4 \cdot 10^{11} \text{ M}^{-2}$.

5.2.6. Orden de estabilidad de los complejos

La constante de formación de un complejo puede emplearse para evaluar la estabilidad del mismo y en definitiva, su capacidad para su uso analítico. Sin embargo, los valores de K no son directamente comparables entre sí para dictaminar si un complejo es o no más estable que otro, salvo que tengan igual número de coordinación (estequiometría). En caso contrario, se ha de utilizar la concentración de ion metálico libre en cada equilibrio de complejación, como magnitud para evaluar la estabilidad relativa entre los diferentes complejos [Silva, 2004].

Así, para poder comparar la estabilidad de los complejos de Cu(II) y Zn(II), se debe tener en cuenta la concentración del ion metálico libre en el equilibrio, calculado mediante la diferencia entre la concentración inicial de metal y la concentración de complejo formado en el equilibrio. En el caso del Cu se obtiene un valor de $1,6 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ y un valor de $7,4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ para el Zn, comprobándose como la concentración metálica en el equilibrio es mayor para el caso del Zn. De esta forma, se puede decir que la estabilidad de los complejos sigue el siguiente orden:



Como se puede comprobar, estos resultados se corresponden con la tendencia de estabilidad publicada por Irving-Williams en 1953 [Irving, 1953]. Esta secuencia establece el orden de estabilidad para los cationes divalentes de la primera serie de transición, siendo relativamente poco sensible al ligando empleado. En la figura 5.17 se muestra la gráfica correspondiente a la serie de

Irving-Williams, donde se representa el $\log K_f$ para los iones metálicos divalentes de la primera fila de la tabla periódica:

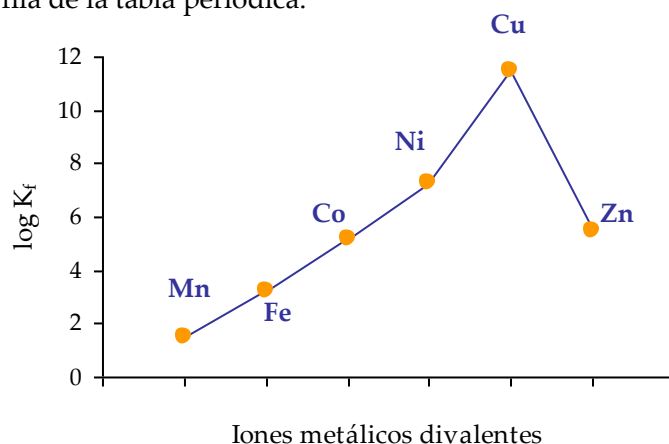


Figura 5.17. Gráfica correspondiente a la serie de Irving-Williams para los iones metálicos divalentes de la primera serie de transición [Ribas-Gispert, 2000]

Se puede ver como existe un crecimiento de la estabilidad conforme se avanza hacia la derecha en la serie, alcanzándose un máximo de estabilidad para el ion Cu(II) y disminuyendo bruscamente en el caso del Zn(II). Los complejos de Cu(II) presentan una estabilización adicional respecto a los de Ni(II) a pesar de haber colocado un electrón suplementario en un orbital e_g antienlazante. Esta "anomalía" se debe a la estabilización originada por el efecto de Jahn-Teller que aumenta el valor de la K [Ribas-Gispert, 2000]. Debido al efecto de Jahn-Teller, el complejo es distorsionado tetragonalmente alejándose los dos grupos del eje z y fortaleciendo el enlace con los cuatro grupos del plano xy . Es por ello por lo que los complejos de Cu(II) se caracterizan normalmente por una geometría plano-cuadrada, siempre y cuando no exista un impedimento estérico en los ligandos [Wu, 2006].

5.2.7. Estructura de los quelatos: Cu-2HBBH y Zn-2HBBH

De acuerdo con varios artículos publicados en la bibliografía [Mohan, 1992; Ainscough, 1999; Aruffo, 1982], que han descrito la estructura de los complejos Cu-2HBBH y Zn-2HBBH en estado sólido, parece probable asignar estas mismas estructuras a los quelatos en disolución ya que las estequiometrías que se han

obtenido por el método de las variaciones continuas y el de la relación molar son las mismas que en estado sólido.

La reacción de Cu(II) con 2-HBBH da lugar a un complejo plano, mononuclear en el que el Cu(II) se enlaza al ligando a través del oxígeno fenólico, el nitrógeno imínico y el oxígeno de la amida, todos ellos en el plano ecuatorial.

Para el caso del Zn(II), éste forma complejos octaédricos con dos moléculas de 2-HBBH enlazándose a través de los tres grupos funcionales del ligando, siendo estabilizada la estructura debido a la formación de enlaces intramoleculares de H.

5.3. Parámetros analíticos del quimiosensor molecular de cobre

5.3.1. Recta de calibrado

Las medidas de fluorescencia fueron llevadas a cabo mediante la adición del volumen apropiado de cobre a una disolución de 5 mL de volumen total conteniendo 180 μ M de 2-HBBH y disolución reguladora KH_2PO_4 0,05 M (pH 7) en una mezcla de agua/etanol (53% v/v). La intensidad de fluorescencia de la disolución fue registrada a 490 nm usando una longitud de onda de excitación de 424 nm.

Los datos del “quenching” de fluorescencia fueron analizados mediante la relación de Stern-Volmer, la cual viene dada por la siguiente ecuación:

$$F_0 / F = 1 + K_{sv}[Q] \quad (5.8)$$

donde F y F_0 son las intensidades de fluorescencia del reactivo en presencia y ausencia de iones Cu(II), respectivamente; $[Q]$ es la concentración de cobre (atenuador o “quencher”) y K_{sv} es la constante de Stern-Volmer, la cual está relacionada con la accesibilidad del fluoróforo al quencher (mayor accesibilidad, mayor K_{sv}).

Los dos tipos de atenuación más estudiados son la **atenuación dinámica o colisional** y la **atenuación estática** [Lakowicz, 2006].

La *atenuación dinámica o colisional* es debida a colisiones entre el fluoróforo y la especie atenuadora al difundir por la disolución, mientras que en el caso de la

atenuación estática, las dos moléculas enlazan una con la otra formando un complejo no fluorescente [Albani, 2004].

Para que tanto la atenuación estática como la dinámica tengan lugar, el fluoróforo o especie fluorescente y el atenuador deben tener contacto molecular. En el caso de la atenuación colisional, el atenuador debe difundir hacia el fluoróforo durante el tiempo de vida que éste permanece en el estado excitado. Al ponerse en contacto, el fluoróforo vuelve al estado fundamental, sin la emisión de ningún fotón. Se puede decir que la atenuación ocurre sin un cambio permanente en las moléculas, es decir, las especies no se ven alteradas químicamente en este proceso. En cambio, en la atenuación estática, se forma un complejo entre el fluoróforo y la especie atenuadora, siendo este nuevo complejo no-fluorescente. Este proceso tiene lugar en el estado fundamental y no necesita de difusión ni de colisiones moleculares [Lakowicz, 2006].

Si el sistema siguiese la relación de Stern-Volmer, la representación de F_0/F frente a $[Q]$ debería ser lineal. Sin embargo, el gráfico de Stern-Volmer no es siempre lineal.

Si se observa una curvatura negativa, (F_0/F es menor que lo esperado para concentraciones de Q elevadas), esto se puede deber a que la molécula tiene más de un grupo fluoróforo, o la molécula puede estar en más de una conformación, que resulta en diferentes grados de accesibilidad para el “quencher” según como esté colocado el grupo fluoróforo. Se puede estimar la fracción de fluoróforos accesibles a bajas concentraciones de Q mediante una manipulación sencilla de la ecuación de Stern-Volmer, y eventualmente determinar las K_{sv} correspondientes a cada fluoróforo (a altas concentraciones de Q).

Si se observa una desviación positiva, (F_0/F es mayor que lo esperado para concentraciones elevadas de Q), puede ser debido a un “quenching” combinado dinámico y estático debido a que el mismo atenuador provoca tanto colisiones como enlaces con el fluoróforo. En tales casos la fluorescencia (F_0/F) se deberá tanto a la fracción no enlazada como a la fracción no atenuada por colisiones [Lakowicz, 2006].

En este estudio se obtuvo una representación no-lineal con una desviación positiva como puede apreciarse en la figura 5.18.

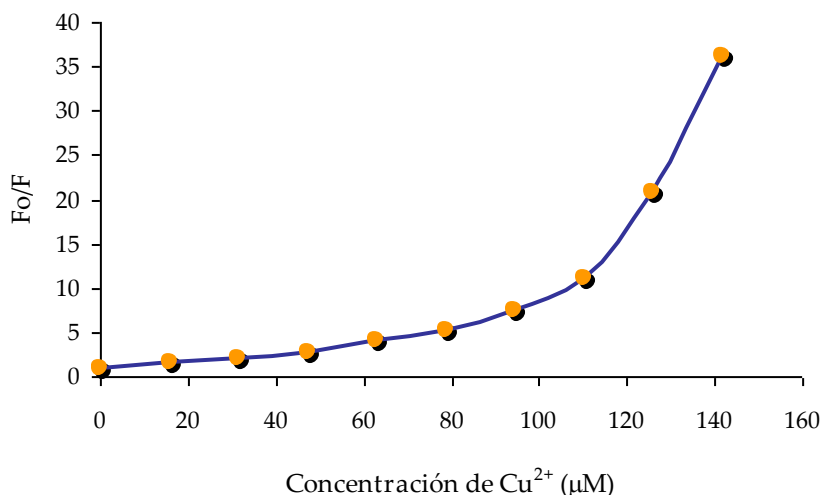


Figura 5.18. Representación de Stern-Volmer para el sensor fluorescente 2-HBBH y detección de Cu(II)

Debido a ello, esa desviación de la linealidad se atribuye por lo tanto a la existencia de varios tipos de “quenching” presentes en el sistema. En este caso, puede decirse que la atenuación no es puramente colisional o dinámica, sino que además es debida a la formación de un complejo en el estado fundamental o lo que es lo mismo a un proceso de atenuación estática [Lakowicz, 2006].

Para resolver la no linealidad debida a una **combinación de ambos tipos de atenuación**, se suele emplear una relación modificada de Stern-Volmer [Koneswaran, 2009; Chen, 2006; Suresh-Kumar, 2006].

Para ello, la atenuación estática se explica introduciendo un factor adicional C en la ecuación lineal S-V (Eq. 5.9), empleando el logaritmo de la ecuación así obtenida (Eq. 5.10):

$$F_0 / F = (1 + K_{SV}[Q]) / C \quad (5.9)$$

$$\log (F_0 / F) = K_{SV}[Q] + C \quad (5.10)$$

Como puede comprobarse, la representación de Stern-Volmer modificada de $\log(F_0/F)$ frente a $[Q]$ muestra un buen comportamiento lineal ($R^2 = 0,998$) en el rango estudiado desde 0 hasta 157,4 μM de cobre (fig. 5.19). K_{SV} y C fueron obtenidas de la pendiente y la ordenada en el origen del gráfico de calibración, y cuyos valores fueron $9,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ y $-0,006$, respectivamente.

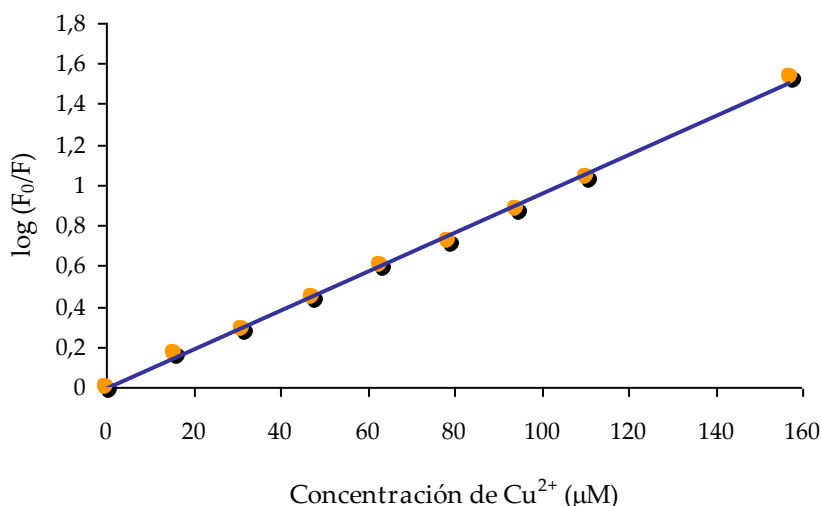


Figura 5.19. Representación de Stern-Volmer modificado para el sensor fluorescente 2-HBBH y detección de Cu(II)

5.3.2. Límite de detección

El límite de detección fue calculado de acuerdo con la ecuación $DL=3\sigma/S$ [IUPAC, 1997], donde σ es la desviación estándar de la señal del blanco y S es la pendiente de la recta de calibrado.

Se realizaron cinco análisis diferentes de una muestra de blanco, obteniéndose como límite de detección un valor de **5,6 μM de Cu(II)**.

5.3.3. Reproducibilidad

La reproducibilidad del método fue evaluada a través de cinco réplicas de la medida de fluorescencia del sensor en presencia de 78,7 μM de Cu(II) dando

lugar a una desviación estándar relativa de **5,2 %** y una precisión del **4,9 %** para un 95 % de intervalo de confianza. Los parámetros estadísticos calculados se muestran en la tabla 5.5.

Puede concluirse, por tanto, que el quimiosensor produce señales analíticas muy reproducibles para la detección del ion cobre.

Tabla 5.5. Precisión de la medida de fluorescencia del sensor 2-HBBH para 78,7 μM de Cu(II)

Parámetros	Valores
Fluorescencia (u.a)	121,6; 113,2; 109,2; 112,2; 106,0
n	5
Grados de libertad ($n-1$)	4
Intervalo de confianza	95%
t	2,132
Media	112,4
s	5,8
RSD (%)	5,2
Precisión (%)	4,9

5.3.4. Efecto de diferentes metales en la intensidad de fluorescencia

Para detectar la especificidad del sensor por el ion Cu(II), es decir, los cambios en la fluorescencia de la 2-HBBH causados por otros iones metálicos distintos al cobre, se emplearon concentraciones de 78,7 μM para los cationes metálicos estudiados.

La figura 5.20 presenta la comparación de la variación de la fluorescencia del ligando causada por el ion cobre y otros cationes metálicos. Los resultados muestran que la fluorescencia de la 2-HBBH es significativamente desactivada por la presencia de iones Cu(II). El resto de cationes no produjeron efectos importantes bajo idénticas condiciones, produciendo sólo pequeños cambios en la intensidad

de fluorescencia. Por lo que los resultados muestran que la selectividad de esta molécula sensora por el cobre es muy notable.

Tal diferencia de la respuesta del sensor fluorescente entre el cobre y otros iones metálicos indica que el grupo funcional del ligando tiene más afinidad por unirse al Cu(II) que al resto de iones estudiados en las condiciones de trabajo optimizadas. Esto puede ser atribuido, entre otras razones, al orden de estabilidad de Irving-Williams [Weng, 2007].

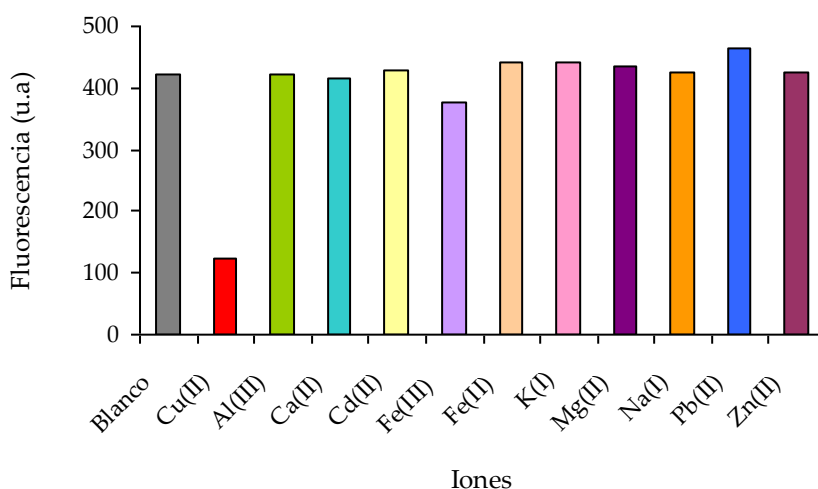
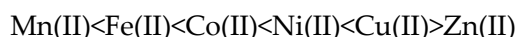


Figura 5.20. Efecto de otros iones metálicos en la fluorescencia de la 2-HBBH a pH 7 en disolución acuoetanólica ($C_{2-HBBH} = 94 \mu M$; $C_{metal} = 78,7 \mu M$)

De acuerdo con esta regla, entre los iones metálicos paramagnéticos más relevantes, el cobre presenta una alta afinidad termodinámica por los ligandos con N y O con propiedades quelatantes [Zhou, 2004; Li, 2009a]. Aunque el resto de iones metálicos también presentan habilidad para la complejación, sólo permiten la disminución de la fluorescencia en un cierto grado [Liang, 2007].

La serie de Irving-Williams se refiere a las estabilidades relativas de los complejos formados por iones metálicos. Para los metales de transición de la primera fila de la tabla periódica, la constante de estabilidad para la formación del complejo sigue el siguiente orden:



Esta tendencia es seguida por un gran número de complejos en disolución acuosa, especialmente en los casos en los que el átomo donador es el oxígeno o el nitrógeno.

Puede observarse como cuando se representa la K_f para los iones metálicos divalentes de la primera serie de transición, se obtiene una gráfica en la que la constante aumenta de valor hasta el Cu(II), para disminuir en el Zn(II) (ver fig. 5.17).

Hay tres explicaciones citadas frecuentemente para explicar esta serie [Irving, 1953]:

- El radio iónico decrece regularmente hacia la derecha de la fila. Esto conlleva a un crecimiento general en la estabilidad.
- La energía de estabilización del campo del cristal crece desde cero para Mn(II) hasta un máximo para Ni(II); el valor para Zn(II) es cero.
- Aunque la energía de estabilización del campo del cristal para Cu(II) es menor que para Ni(II), el complejo presenta una estabilidad adicional debida al efecto de Jahn-Teller que origina la distorsión del campo del ligando.

De esta forma, la gran selectividad hacia el cobre puede ser interpretada por la diferencia de geometría entre el complejo con cobre y los complejos formados con otros metales. En disolución acuosa, la mayoría de los iones forman complejos octaédricos. Debido al efecto de Jahn-Teller que sufre el cobre, la coordinación con los cuatro átomos ecuatoriales es más fuerte que con las restantes posiciones axiales. Como consecuencia de este efecto, los complejos coordinados con cobre se caracterizan generalmente por una geometría plano-cuadrada, siempre y cuando no exista una geometría restrictiva en el ligando [Wu, 2006].

Por lo que se puede decir que esa excelente selectividad hacia el ion Cu(II) es debida a la estructura plana que facilita el enlace al Cu^{2+} e imposibilita o dificulta la formación de complejo con otros iones metálicos o la pérdida de fluorescencia o "quenching". Esta interesante propiedad hace que el ligando pueda ser empleado como sensor fluorescente selectivo para cobre [Zhou, 2004].

5.3.5. Estudio de las interferencias

Finalmente, se evaluó la selectividad del sensor entendida como la respuesta que proporciona al detectar cobre en presencia de otros metales.

Para el estudio de las interferencias, se prepararon disoluciones de Cu^{2+} en presencia de cada uno de los iones metálicos interferentes usando una relación 1:1 a dos concentraciones diferentes: 7,9 y 31,5 μM , y se estudió la variación de la fluorescencia del sensor 2-HBBH para una concentración de 94 μM (Tabla 5.6).

Tabla 5.6. Variación de la fluorescencia del sensor 2-HBBH cuando detecta el ion Cu^{2+} en presencia de otro ion interferente

Ion interferente	Error relativo (%)	
	$C_{\text{Cu}^{2+}} = C_{\text{interferente}} = 7,9 \mu\text{M}$	$C_{\text{Cu}^{2+}} = C_{\text{interferente}} = 31,5 \mu\text{M}$
Al^{3+}	-3,45	+1,16
Ca^{2+}	-4,66	-0,36
Cd^{2+}	-3,62	-3,03
K^{+}	+0,33	+3,57
Mg^{2+}	-1,51	-3,03
Na^{+}	-4,18	+2,50
Pb^{2+}	+0,79	-4,28
Zn^{2+}	-3,32	-3,03
Fe^{2+}	+1,45	+3,74
Fe^{3+}	-6,49	-18,98
Fe^{3+} + ácido ascórbico (4 mM)	+1,95	+4,99

A partir de los resultados obtenidos para concentraciones de metal e interferente elevada y baja, se puede observar como no existen interferencias en la determinación de cobre, siendo el error de las medidas del mismo orden que la precisión de método.

Únicamente la presencia de Fe(III) modifica la respuesta del sensor hacia el ion Cu(II). Dado que ese efecto no es producido por el Fe(II), se adicionó el reductor ácido ascórbico al sistema, que suele ser empleado frecuentemente con este fin [Jiang, 2001].

Previamente se comprobó que su adición no afectaba al funcionamiento del sensor. Como puede comprobarse en la tabla 5.6 al añadir ácido ascórbico 4 mM a la disolución de Fe³⁺, desaparece la interferencia de este metal, dando lugar a la misma respuesta del sensor en presencia de cobre.

5.3.6. Estudio de la reversibilidad del sensor

Una de las características que definen a un sensor es su reversibilidad, es decir, en este caso la capacidad de recuperar la fluorescencia inicial que presentaba la molécula sensora antes de su aplicación. Es por ello por lo que a la hora de diseñar un dispositivo sensor óptico es necesario emplear quimiosensores moleculares que proporcionen enlaces rápidos y reversibles con el analito de interés [Rogers, 2002].

Para examinar la reversibilidad de este sensor, se realizaron experiencias sucesivas que incluyeron la medida de la absorción UV-vis de la disolución de 2-HBBH: a) en las condiciones del método en ausencia de metal $C_{2\text{-HBBH}} = 54,3 \mu\text{M}$; b) tras la adición de Cu(II) ($C_{\text{Cu}^{2+}} = 26,7 \mu\text{M}$) y c) con un exceso de un ligando quelatante con una constante de formación superior al de la 2-HBBH con el metal que demuestre la reversibilidad del sensor. Para ello, se utilizó el ligando AEDT, a una concentración de $C_{\text{AEDT}} = 64,3 \mu\text{M}$.

Como era de esperar, debido a la gran diferencia entre las constantes de formación de AEDT y 2-HBBH con los iones cobre ($\log K_{\text{EDTA-Cu}^{2+}} = 18,7$ [da Silva, 1991]) y ($\log K_{2\text{-HBBH-Cu}^{2+}} = 6,8$), el pico de absorción a 380 nm correspondiente al complejo Cu-2-HBBH desaparecía completamente con la adición de AEDT a la muestra. De esta forma, se pudo comprobar como el enlace entre Cu(II) y 2-HBBH era químicamente reversible, permitiendo así la reutilización del sensor. Para comprobar que el sistema podía volver a reutilizarse después de esta prueba, se

realizó una cuarta adición de Cu(II) ($C_{Cu^{2+}} = 51,8 \mu M$) a la disolución, observándose como el pico a 380 nm volvía a aparecer (fig. 5.21).

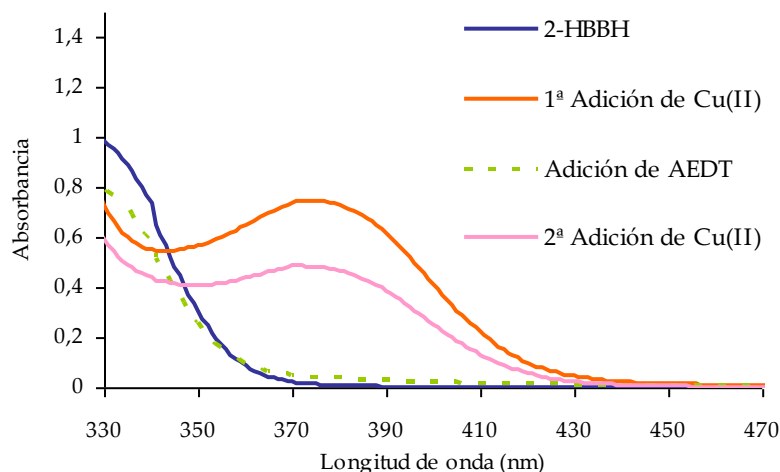


Figura 5.21. Estudio de la reversibilidad del sensor ($C_{2-HBBH} = 54,3 \mu M$) mediante sucesivas adiciones de: — $C_{Cu^{2+}} = 26,7 \mu M$; — $C_{AEDT} = 64,3 \mu M$ y — $C_{Cu^{2+}} = 51,8 \mu M$

5.4. Conclusiones y perspectivas futuras

En este capítulo se ha presentado un sencillo quimiosensor fluorescente molecular de Cu^{2+} empleando 2-HBBH como fluoróforo. Se han aportado algunas ventajas con respecto a otros sensores de este tipo publicados en la bibliografía. En primer lugar, se ha empleado un reactivo común y fácil de sintetizar. En segundo lugar, fue desarrollado operando en disoluciones neutras por lo que es adecuado para aplicaciones biológicas y medioambientales. Como tercera ventaja, se puede decir que es útil para trabajar con disoluciones acuosas y medios respetuosos con el medioambiente como el etanol. En cuarto lugar, la adición de AEDT produce la recuperación de la señal, haciéndolo reversible. Y por último, la 2-HBBH mostró una gran selectividad hacia el cobre sobre otros cationes metálicos que puedan coexistir en la muestra.

Debido a los buenos resultados obtenidos con este reactivo como indicador, las perspectivas de futuro incluirían su aplicación en el diseño de dispositivos sensores químicos de fibra óptica y detección fluorescente que permitan su aplicación a muestras acuosas.

Igualmente, se espera poder desarrollar este sistema para la detección y análisis de iones Fe(III), Ni(II) y Zn(II), dada la capacidad de la 2-HBBH de reaccionar con estos iones bajo otras condiciones experimentales.

Referencias:

- Ainscough, E.W., Brodie, A.M., Denny, W.A., Finlay, G.J., Gothe, S.A., Ranford, J.D., **1999**. Cytotoxicity of salicylaldehyde benzoylhydrazone analogs and their transition metal complexes: quantitative structure-activity relationships. *Journal of Inorganic Biochemistry* 77, 125-133.
- Aksuner, N., Henden, E., Yilmaz, I., Cukurovali, A., **2008**. Selective optical sensing of copper(II) ions based on a novel cyclobutane-substituted Schiff-base ligand embedded. *Sensors and Actuators B: Chemical* 134, 510-515.
- Aksuner, N., Henden, E., Yilmaz, I., Cukurovali, A., **2009**. A highly sensitive and selective fluorescent sensor for the determination of copper(II) based on a Schiff base. *Dyes and pigments* 83, 211-217.
- Albani, J.R., **2004**. Structure and dynamics of macromolecules: Absorption and Fluorescence studies. Amsterdam. Elsevier.
- Aruffo, A.A., Murphy, T.B., Johnson, D.K., Rose, N.J., Schomaker, V., **1982**. Structural studies of Fe(III) and Cu(II) complexes of salicylaldehyde benzoyl hydrazone, a synthetic chelating agent exhibiting diverse biological properties. *Inorganica Chimica Acta* 67, L25-L27.
- Beltramello, M., Gatos, M., Mancin, F., Tecilla, P., Tonellato, U., **2001**. A new selective fluorescence chemosensor for Cu(II) in water. *Tetrahedron Letters*, 42, 9143-9146.
- Boiocchi, M., Fabbrizzi, L., Licchelli, M., Sacchi, D., Vázquez, M., Zampa, C., **2003**. A two-channel molecular dosimeter for the optical detection of copper(II). *Chemical Communications* 15, 1812-1813.
- Bolletta, F., Costa, I., Fabbrizzi, L., Licchelli, M., Montalti, M., Pallavicini, P., Prodi, L., Zaccheroni, N., **1999**. A Ru(II)(bipy)3-1,9-diamino-3,7-diazanonane-4,6-dione two-component system, as an efficient on-off luminescent chemosensor for Ni²⁺ and Cu²⁺ in water, based on an ET (Energy Transfer) mechanism. *Journal of the Chemical Society- Dalton Transactions* 9, 1381-1385.
- Chan, S.C., Koh, L.L., Leung, P.H., Ranford, J.D., Sim, K.Y., **1995**. Copper(II) complexes of the antitumour-related ligand salicylaldehyde acetylhydrazone (H₂L) and the single-crystal X-ray structures of [Cu(HL)(H₂O)]₂ · 2(NO₃) and [Cu(HL)(pyridine)(NO₃)₂]. *Inorganica Chimica Acta* 236, 101-108.
- Chen, J., Gao, Y., Xu, Z., Wu, G., Chen, Y., Zhu, C., **2006**. A novel fluorescent array for mercury (II) ion in aqueous solution with functionalized cadmium selenide nanoclusters. *Analytica Chimica Acta* 577, 77-84.
- Chen, X., Li, Z., Xiang, Y., Tong, A., **2008**. Salicylaldehyde fluorescein hydrazone: a colorimetric logic chemosensor for pH and Cu(II). *Tetrahedron Letters* 49, 4697-4700.
- Da Silva, J.J.R.F., Williams, R.J.P., **1991**. *The Biological Chemistry of the Elements*. Oxford. Clarendon Press. p. 418.

- Duffus, J.H., **1983**. *Toxicologia Ambiental*. Barcelona. Omega. pp. 40.
- Fu, D., Yuan, D., **2007**. Spectrophotometric determination of trace copper in water samples with thiomichlersketone. *Spectrochimica Acta A* 66, 434-437.
- Gholivand, M.B., Niroomandi, P., Yari, A., Joshagani, M., **2005**. Characterization of an optical copper sensor based on *N,N'*-bis(salicylidene)-1,2-phenylenediamine. *Analytica Chimica Acta* 538, 225-231.
- Gunnlaugsson, T., Leonard, J.P., Murray, N.S., **2004**. Highly selective colorimetric naked-eye Cu(II) detection using an azobenzene chemosensor. *Organic Letters* 6, 1557-1560.
- Irving, H., Williams, R.J.P., **1953**. The stability of transition-metal complexes. *Journal of the Chemical Society* 3192-3210.
- IUPAC. **1997**. McNaught, A.D., Wilkinson, A. *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the "Gold Book"). Oxford. Blackwell Scientific Publications.
- Jhonson, D.K., Murphy, T.B., Rose, N.J., Goodwin, W.H., Pickart, L., **1982**. Cytotoxic chelators and chelates 1. Inhibition of DNA synthesis in cultured rodent and human cells by aroylhydrazones and by a copper(II) complex of salicylaldehyde benzoyl hydrazone. *Inorganica Chimica Acta* 67, 159-165.
- Jiang, Y.C., Zhang, Z.Q., Zhang, J., **2001**. Flow-injection, on-line concentrating and flame atomic absorption spectrometry for indirect determination of ascorbic acid based on the reduction of iron(III). *Analytica Chimica Acta* 435, 351-355.
- Job, P., **1928**. Formation and stability of inorganic complexes in solution. *Annales de Chimie* 9, 113-203.
- Kim, H.S., Choi, H.S., **2001**. Spectrofluorimetric determination of copper(II) by its static quenching effect on the fluorescence of 4,5-dihydroxy-1,3-benzenedisulfonic acid. *Talanta* 55, 163-169.
- Kirkbright, G.F., West, T.S., Woodward, C., **1965**. Spectrofluorometric determination of submicrogram amounts of aluminum and beryllium with 2-hydroxy-3-naphthoic acid. *Analytical Chemistry* 37, 137-143.
- Lakowicz, J.R., **2006**. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Third Edition, Springer United State pp. 277.
- Koneswaran, M., Narayanaswamy, R., **2009**. L-Cysteine-capped ZnS quantum dots based fluorescence sensor for Cu²⁺ ion. *Sensors and Actuators B: Chemical* 139, 104-109.
- Kuswandi, B., Nuriman, Verboom, W., Reinhoudt, D.N., **2006**. Tripodal Receptors for Cation and Anion Sensors. *Sensors* 6, 978-1017.
- Lee, S.J., Lee, S.S., Jeong, I.Y., Lee, J.Y., Jung, J.H., **2007**. Azobenzene coupled chromogenic receptors for the selective detection of copper(II) and its application as a chemosensor kit. *Tetrahedron Letters* 48, 393-396.
- Li, H.G., Yang, Z.Y., Qin, D.D., **2009a**. A new Schiff-base type selective fluorescent chemosensor for Cu²⁺. *Inorganic Chemistry Communications* 12, 494-497.
- Li, H.Y., Gao, S., Xi, Z., **2009b**. A colorimetric and "turn-on" fluorescent chemosensor for Zn(II) based on coumarin Schiff-base derivative. *Inorganic Chemistry Communications* 12, 300-303.

- Li, C.Y., Xu, F., Li, Y.F., **2010**. A fluorescent chemosensor for silver ions based on porphyrin compound with high selectivity. *Spectrochimica Acta Part A*. In Press. Accepted manuscript.
- Liang, Z., Liu, Z., Jiang, L., Gao, Y., **2007**. A new fluorescent chemosensor for copper(II) and molecular switch controlled by light. *Tetrahedron Letters* 48, 1629-1632.
- Liu, J., Zhang, B., Wu, B., Liu, Y., Yu, X., **2006**. Spectrofluorimetric determination of trace amounts of cadmium with 2,4-dihydroxyacetophenone benzoylhydrazone. *Rare metals* 25, 184-189.
- Lu, Y.H., Lu, Y.W., Wu, C.L., Shao, Q., Chen, X.L., Bimbong, R.N.G., **2006**. UV-visible spectroscopic study of the salicylaldehyde benzoylhydrazone and its cobalt complexes. *Spectrochimica Acta Part A* 65, 695-701.
- Ma, T.H., Zhang, A.J., Dong, M., Dong, Y.M., Peng, Y., Wang, Y.W., **2010**. A simple and highly selective "turn-on" type fluorescent chemosensor for Hg²⁺ based on chiral BINOL-Schiff's base ligand. *Journal of Luminescence* 130, 888-892.
- Mei, Y., Bentley, P.A., Wang, W., **2006**. A selective and sensitive chemosensor for Cu²⁺ based on 8-hydroxyquinoline, *Tetrahedron Letters* 47, 2447-2449.
- Mohan, M., Gupta, N.K., Kumar, M., Jha, N.K., Antholine, W.E., **1992**. Synthesis, magnetic and electrochemical properties of binuclear copper(II) complexes of pyridoxal hydrazones. *Inorganica Chimica Acta* 197, 39-46.
- Nuriman, Kuswandi, B., Verboom, W., **2009**. Selective chemosensor for Hg(II) ions based on tris[2-(4-phenyldiazenyl)phenylaminoethoxy]cyclotriveratrylene in aqueous samples. *Analytica Chimica Acta* 655, 75-79.
- Prodi, L., Bolletta, F., Montalti, M., Zaccheroni, N., **2000**. Luminescent chemosensors for transition metal ions. *Coordination Chemistry Reviews* 205, 59-83.
- Ribas-Gispert, J., **2000**. *Química de Coordinación*. Barcelona. Ediciones Omega.
- Rogers, C.W., Wolf, M.O., **2002**. Luminescent molecular sensors based on analyte coordination to transition-metal complexes. *Coordination Chemistry Reviews* 233-234, 341-350.
- Safavi, A., Bagheri, M., **2004**. Design and characteristics of a mercury (II) optode based on immobilization of dithizone on a triacetylcellulose membrane. *Sensors and Actuators B* 99, 608-612.
- Silva, M., Barbosa, J., **2004**. *Equilibrios iónicos y sus aplicaciones analíticas*. Madrid. Editorial Síntesis.
- Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Crouch, S.R., **2005**. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. 8th Edition, International Thomson Editors.
- Sreeja, P.B., Prathapachandra Kurup, M.R., **2005**. Synthesis and spectral characterization of ternary complexes of oxovanadium(IV) containing some acid hydrazones and 2,2'-bipyridine. *Spectrochimica Acta Part A* 61, 331-336.
- Suresh Kumar, H.M., Kunabenchi, R.S., Biradar, J.S., Math, N.N., Kadadevarmath, J.S., Inamdar, S.R., **2006**. Analysis of fluorescence quenching of new indole derivative by aniline using Stern-Volmer plots, *Journal of Luminescence* 116, 35-42.

- Suresh, P., Azath, I.A., Pitchumani, K., **2010**. Naked-eye detection of Fe³⁺ and Ru³⁺ in water: Colorimetric and ratiometric sensor based on per-6-amino-cyclodextrin/p-nitrophenol. *Sensors and Actuators B* 146, 273–277.
- Wang, Z., Fan, X., Li, D., Feng, L., **2008**. A highly selective and colorimetric naked-eye chemosensor for Cu²⁺. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 71, 1224-1227.
- Wang, J., Ha, C.S., **2009**. A colorimetric and fluorescent turn-on chemosensor for Zn²⁺ based on an azobenzene- containing compound. *Tetrahedron* 65, 6959-6964.
- Wang, S., Gwon, S.Y., Kim, S.H., **2010**. A highly selective and sensitive colorimetric chemosensor for Fe²⁺ based on fluoran dye. *Spectrochimica Acta Part A*. In Press. Accepted Manuscript.
- Weng, Y.Q., Teng, Y.L., Yue, F., Zhong, Y.R., Ye, B.H., **2007**. A new selective fluorescent chemosensor for Cu(II) ion based on zinc porphyrin-dipyridylamino. *Inorganic Chemistry Communications* 10, 443-446.
- Wu, J.S., Wang, P.F., Zhang, X.H., Wu, S.K., **2006**. Novel fluorescent sensor for detection of Cu(II) in aqueous solution. *Spectrochimica Acta Part A*, 65, 749-752.
- Xiang, Y., Li, Z., Chen, X., Tong, A., **2008**. Highly sensitive and selective optical chemosensor for determination of Cu²⁺ in aqueous solution. *Talanta* 74, 1148-1153.
- Yao, J., Dou, W., Qin, W., Liu, W., **2009**. A new coumarin-based chemosensor for Fe³⁺ in water. *Inorganic Chemistry Communications* 12, 116-118.
- Yoe, J.H., Jones, A.L., **1944**. Colorimetric determination of iron with disodium-1,2-dihydroxybenzene-3,5-disulfonate. *Ing. Eng. Chem. Anal.* 16, 111-115.
- Zhao, M., Yang, X.F., He, S., Wang, L., **2009**. A rhodamine-based chromogenic and fluorescent chemosensor for copper ion in aqueous media. *Sensors and Actuators B: Chemical* 135, 625-631.
- Zhou, L.L., Sun, H., Zhang, X.H., Wu, S.K., **2004**. An effective fluorescent chemosensor for the detection of copper(II). *Spectrochimica Acta Part A* 61, 61-65.
- Zidan A.S.A., **2003**. Mixed ligand complexes of nickel (II) dialkyldithiophosphates with 2-acetylpyridine semicarbazone and 2-acetylpyridine benzoylhydrazone. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the related elements* 178, 567-582.

Capítulo 6:

Diseño de un sensor químico de fibra óptica para la determinación de cobre basado en la extracción en fase sólida colorimétrica y discos SDB modificados con 2-HBBH

Capítulo 6: Diseño de un sensor químico de fibra óptica para la determinación de cobre basado en la extracción en fase sólida colorimétrica y discos SDB modificados con 2-HBBH

Resumen

La extracción en fase sólida (SPE) es una técnica empleada para el aislamiento y preconcentración de analitos y simplificación de matrices complejas en muestras que presenten dificultades a la hora de realizar análisis directos. Sin embargo, el uso de este método clásico consume mucho tiempo y requiere de grandes volúmenes de disolventes de elevada pureza durante el proceso de elución. Debido a esto, se ha desarrollado en los últimos años la extracción en fase sólida colorimétrica (C-SPE) entre otros métodos implementados. Mediante el empleo de esta técnica, la etapa de elución es eliminada del proceso midiendo directamente la cantidad de analito retenido sobre la superficie de una membrana o disco mediante fibra óptica, generando lo que se conoce como un sensor químico de fibra óptica. De esta forma, en este capítulo se presenta un método rápido y sencillo para la determinación de cobre en muestras acuosas empleando discos de extracción de poliestireno divinilbenceno (SDB) modificados previamente con el reactivo colorimétrico 2-hidroxibenzaldehído benzoilhidrazona (2-HBBH). La fase reactiva modifica su señal de reflectancia en presencia de cobre lo que es detectado mediante una fibra óptica. Parámetros tales como pH, cantidad de reactivo inmovilizado o tipo de reguladora, fueron estudiados para conseguir la máxima eficacia del sensor.

6.1. Introducción

Los estudios ambientales de análisis de metales pesados se han realizado de forma clásica utilizando como metodología la toma de muestra espacio-temporal y su posterior análisis en el laboratorio por técnicas establecidas y validadas. No obstante, aspectos como la especiación metálica pueden alterarse durante los procesos de toma, transporte y conservación de la muestra. Además, los requerimientos actuales precisan de herramientas que proporcionen un mayor número de resultados en menor tiempo y con menores costes.

Todo ello ha favorecido el desarrollo de técnicas de análisis *in-situ* y en continuo como el empleo de sensores en el monitoreo ambiental [Rodríguez-Mozaz, 2005]. Éstos permiten análisis más económicos, rápidos y directos y pueden ser aplicados *in-situ* produciendo resultados representativos de la variabilidad de un contaminante en tiempo real.

Los sensores químicos son dispositivos independientes y normalmente miniaturizados, capaces de transformar información química, desde la concentración de un componente específico de una muestra hasta un análisis de la composición total, en una señal analítica útil [Hulanicki, 1991].

Como ya se ha visto en el capítulo 4, estos dispositivos se pueden clasificar en función de la naturaleza de la señal analítica que se genera y se mide en la fase reactiva. En particular, en los sensores ópticos se mide el cambio de una propiedad óptica debido a la interacción del analito con el indicador. El empleo de la fibra óptica en su diseño y las ventajas que ello aporta han hecho de esta técnica una alternativa muy atractiva frente a otro tipo de sensores. Entre estas ventajas se puede destacar su resistencia en ambientes peligrosos, la ausencia de interferencias eléctricas o magnéticas, la seguridad intrínseca de no emplear corriente eléctrica en la fibra, la facilidad de su miniaturización y su bajo coste [Kuswandi, 1999; Raimundo Jr, 2003]. Las técnicas ópticas más utilizadas en este tipo de sistemas son la absorción, la luminiscencia y la reflectancia, siendo esta última la empleada en este capítulo.

El componente clave en los sensores químicos de fibra óptica es la fase reactiva, la cual consiste en un reactivo químico específico del analito de interés inmovilizado en un material soporte adecuado. Ésta puede ser inmovilizada directamente en el extremo de la fibra óptica, o bien puede ser inmovilizada sobre

el material soporte el cual se pondrá en contacto con la fibra óptica [Gangaiya, 2008; Narayanaswamy, 1993]. La inmovilización química se basa en el enlace covalente entre el reactivo y un soporte polimérico sólido funcionalizado, siendo una inmovilización muy irreversible pero que requiere de una etapa de síntesis más compleja. Sin embargo, los métodos de inmovilización más empleados incluyen el atrapamiento, la adsorción y la atracción electrostática, los cuales suelen ser más sencillos y económicos.

A lo largo de los últimos años, se han utilizado diferentes materiales poliméricos para el desarrollo de este tipo de sensores de iones metálicos empleando fibra óptica: polímeros de intercambio iónico o resinas iónicas como Dowex; polímeros no-iónicos o resinas neutras como XAD-2, XAD-4 o XAD-7; geles como sol-gel por ejemplo; o matrices hidrofóbicas de PVC así como combinaciones híbridas de estos compuestos.

Cabe destacar como recientemente, el empleo de algunos de estos materiales adsorbentes en configuración de membrana (o filtros de disco) ha supuesto destacadas ventajas. El uso de la inmovilización de los reactivos sobre discos mediante extracción en fase sólida permite la detección directa sobre su superficie mediante fibra óptica [Matsuoka, 2010]. A esta técnica se le conoce con el nombre de **extracción en fase sólida colorimétrica (C-SPE)**.

Esta técnica presenta como ventajas la posibilidad de poder procesar un menor volumen de muestra, incrementar la superficie de contacto entre el inmovilizado y el analito, mayor velocidad de los análisis, portabilidad, equipos muy sencillos, permite análisis *in-situ* y puede ser desarrollada en cualquier lugar [Gazda, 2004a; Fritz, 2003]. Debido a que la medida del analito se hace directamente sobre la superficie del disco, se elimina la etapa de elución de éste, reduciendo así los residuos de los análisis pero manteniendo los altos factores de concentración de la SPE convencional (1000 o más). Es adecuado que el disco adsorbente utilizado en esta técnica C-SPE sea blanco y lustroso [Matsuoka, 2010].

Debido a las ventajas comentadas, no es de extrañar que se hayan publicado en los últimos años varias investigaciones dentro de este campo, destacando las que se comentan a continuación.

Fritz y col., publicaron en 2003 su original método en el que se empleaba la combinación de la extracción en fase sólida y la espectroscopía de reflectancia difusa para la determinación rápida de iones metálicos en agua, como Ag(I), Cu(II), Ni(II), Fe(III) y Cr(VI), empleando reactivos colorimétricos tales como dietilditiocarbamato para Cu(II) y ácido 8-hidroxi-7-(6-sulfo-2-naftilazo)5-quinolin sulfónico para Fe(III), entre otros. Para el caso del Fe(III) se obtuvo un rango lineal de aplicación de 1 a 10 ppm. En este artículo se indica como esa combinación de la SPE sobre un disco de membrana con alguna forma de medida del analito, conlleva numerosas posibilidades, permitiendo desarrollar nuevas y útiles metodologías para el análisis de metales pesados [Fritz, 2003].

En 2003, Arena y colaboradores desarrollaron un método para la determinación de Ag(I) en el agua de bebida de la tripulación de naves espaciales empleando esta extracción en fase sólida colorimétrica [Arena, 2003]. El tipo de soporte sólido empleado fueron discos de poliestireno divinilbenceno (SDB), el reactivo utilizado para la inmovilización sobre el SDB fue el 5-(p-dimetilaminobencilidín) rodanina (DMABR) y la técnica de medida la reflectancia difusa. Cabe destacar que para que la reacción entre la Ag(I) y el reactivo impregnado tuviese lugar, era necesario el empleo de un aditivo (1,2-decanodiol o Brij 30) al sistema, por lo que en ausencia de aditivo no era posible detectar la reacción entre ambas especies.

Un año más tarde, Gazda y colaboradores continuaron dando un paso más dentro de este campo presentando una nueva modalidad de C-SPE [Gazda, 2004a]. En este caso, determinaron Ni(II) empleando dimetilglioxima (DMG) como agente complejante, de tal forma que la DMG débilmente inmovilizada sobre el disco se liberaba y formaba un complejo insoluble con el analito generando un precipitado altamente coloreado que se recogía sobre la superficie de la membrana de extracción. Usando este método, se podía determinar Ni(II) de una manera sencilla y rápida (40 s) en un rango de concentración de 0,5 a 5 ppm de Ni(II) a partir de 1 mL de volumen de muestra.

También se ha descrito un sensor de fibra óptica para el análisis de Fe(III) empleando otro tipo de discos, como son los discos de intercambio aniónico donde se retiene el complejo de $\text{Fe}(\text{SCN})_6^{3-}$ empleando como reactivo colorimétrico

tiocianato de amonio. Estos investigadores incluyeron en este trabajo un sistema de análisis por inyección en flujo acoplado al sensor de reflectancia aportando las ventajas de robustez y versatilidad al sensor. La aplicabilidad de esta metodología fue evaluada en aguas naturales [Pons, 2005].

En 2006, Steiner y col., propusieron un sistema sensor de reflectancia difusa para la especiación de Cr(III) y Cr(VI) [Steiner, 2006]. Se emplearon para ello diferentes discos de extracción, por un lado un disco de intercambio aniónico para la extracción de Cr(VI), y un disco de intercambio catiónico para la extracción de Cr(III). La cantidad de cada especie de cromo era medida directamente sobre la superficie de cada uno de los discos por espectroscopía de reflectancia difusa.

Igualmente, se han utilizado otro tipo de materiales como soporte sólido como resinas empaquetadas en columnas y posterior medida por reflectancia difusa, como por ejemplo, el desarrollado por Filik y col., en 2009 para la determinación de vanadio total en muestras acuosas empleando 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN) como reactivo colorimétrico y resina Amberlita XAD-16 como soporte sólido [Filik, 2009a], así como el propuesto por estos mismos investigadores para la determinación de molibdeno empleando columnas para la extracción en fase sólida. El reactivo empleado en este caso fue la fenilhidrazina, inmovilizada en el mismo tipo de resina XAD-16 [Filik, 2009b].

6.2. Extracción en fase sólida

Cuando se propone una nueva metodología analítica es muy importante que cumpla ciertas características tales como exactitud, sensibilidad y reproducibilidad, además de que sea simple, económica, flexible y rápida, siendo deseable que se pueda aplicar *in-situ*. Sin embargo, la gran preocupación actual por aspectos relacionados con la protección del medioambiente, ha llevado a los laboratorios analíticos a dar una mayor relevancia a la "Química Analítica Verde" y, por lo tanto, además de los anteriores requisitos, habría que añadir el de encontrar nuevas metodologías que reduzcan el impacto medioambiental de su aplicación como puede ocurrir si se utilizan disolventes orgánicos [Armenta, 2008; Curylo, 2007].

“La Química Verde” se basa en el empleo de técnicas y metodologías químicas adecuadas que permitan reducir o incluso eliminar el uso o generación de productos, reactivos, disolventes, etc., peligrosos para la salud humana y el medioambiente” [Anastas, 1999].

Algunos ejemplos típicos de técnicas analíticas respetuosas con el medioambiente son, por un lado, (a) aquellas en las que la etapa de preparación no es necesaria, y por otro lado, (b) aquellas en las que las cantidades de los reactivos y disolventes son limitadas [Namiesnik, 2010], como por ejemplo:

(a) Fluorescencia de rayos-X; Ondas acústicas de superficie (Surface acoustic waves: SAW) para la determinación de compuestos orgánicos volátiles; e inmunoensayos.

(b) Extracción en fase sólida: SPE; Microextracción en fase sólida: SPME; Microextracción líquido-líquido: MLLE y otras técnicas de microextracción; extracción con fluidos supercríticos: SFE; espectrometría de masas con interfase de membrana: MIMS.

La *extracción en fase sólida (SPE)* empleando discos con reactivos inmovilizados ha sido rápidamente aceptada con gran interés, ya que además de tratarse de una metodología “verde”, que evita el empleo de grandes volúmenes de disolventes orgánicos durante las etapas de preconcentración y extracción, es una técnica bastante sencilla que no requiere de instrumentación muy costosa.

Esta técnica presenta una serie de ventajas si se compara con la extracción líquido-líquido convencional (LLE), tales como: reduce los volúmenes de disolventes orgánicos, evita la formación de emulsiones, presenta menores tiempos de extracción y es fácilmente automatizable [Armenta, 2008].

6.2.1. Fundamento

El principio en el que se basa la extracción en fase sólida (SPE) es similar al de la extracción líquido-líquido (LLE) permitiendo la transferencia de analitos entre dos fases. La diferencia radica en que en la LLE existen dos fases líquidas inmiscibles, y en la SPE el soluto se encuentra inicialmente en una fase líquida (muestra) quedando retenido posteriormente en la fase sólida (soporte sólido) [Camel, 2003].

La aplicación de esta metodología requiere de tres etapas sucesivas. En primer lugar, la fase sólida debe pasar por una etapa de limpieza, empleando disolventes orgánicos y ácidos para eliminar posibles impurezas inicialmente contenidas en el soporte sólido procedentes del proceso de manufacturación. La segunda etapa es el paso de la muestra a través del sólido, en la cual los analitos son concentrados en el mismo. Se aconseja realizar una etapa de secado, especialmente para muestras acuosas tras esta etapa de extracción. Y finalmente, la tercera y última etapa consiste en la elución del analito de interés mediante el disolvente apropiado, para su posterior determinación con alguna técnica analítica de medida.

En resumen, se puede decir que la SPE se trata de una técnica basada en la retención selectiva del analito(s) en una fase sólida adecuada seguida de la elución con un disolvente apropiado.

Los principales objetivos de esta técnica incluyen el enriquecimiento de trazas (concentración), simplificación de la matriz de las muestras (limpieza de muestras) y el intercambio del analito de medio (transferencia desde la matriz de la muestra a un disolvente diferente) [Poole, 2003; Cámara, 2002].

6.2.2. Formatos

La fase sólida empleada en este tipo de extracción, puede encontrarse en diferentes formatos: bien empaquetada en cartuchos, micro-columnas o jeringas, o bien en forma de discos de pequeño espesor, denominada tecnología de disco (Fig. 6.1). En lo único en que se diferencian estas técnicas es en el formato [Poole, 2000].

De entre estos formatos, el seleccionado para estas investigaciones fue la *tecnología de disco* por las ventajas adicionales que presenta. Los discos poseen una mayor área superficial si se comparan con los otros formatos, por lo que la superficie de contacto con la muestra aumenta drásticamente resultando en una mayor velocidad de flujo, se eliminan los efectos de canalización y presentan una mejor reproducibilidad de los resultados [Pons, 2004; Boussetta, 2007], pero sobre todo porque facilita la implementación de la detección por fibra óptica.

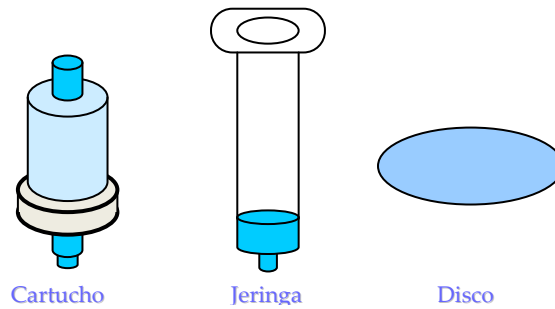


Fig. 6.1. Diferentes formatos para la fase sólida [Camel, 2003]

6.2.3. Tecnología de extracción en formato de disco

Los discos para extracción en fase sólida contienen partículas con capacidad de sorción distribuidas homogéneamente en un entramado de fibras de poli(tetrafluoroetileno) o teflón (PTFE). Esta red se dispone en forma de discos de aproximadamente 0,5 mm de espesor. Los discos contienen alrededor de un 90 % de sustancia sorbente y un 10 % del entramado de teflón. Las fibrillas de PTFE no interfieren en la actividad de las partículas de ningún modo. El resultado del proceso de fabricación de la membrana para SPE es un medio de extracción más denso y más uniforme del que se obtiene con el mismo tipo de fase empaquetada en un cartucho de extracción convencional. El denso empaquetado de partículas y la distribución uniforme ofrecen una importante mejora en eficacia y reproducibilidad. La distancia de difusión entre partículas se minimiza, se reducen o eliminan los efectos de “canalización” y se maximiza la eficacia de sorción contribuyendo a una extracción de máximo rendimiento. La superficie de cada partícula queda libre, interaccionando al máximo durante la separación [Poole, 2000; Cámara, 2002].

Los discos de extracción están disponibles en diferentes estilos y tamaños, siendo todos ellos flexibles y de aspecto similar al de un disco de filtración convencional. En la tabla 6.1 se detallan las propiedades físicas de los discos de extracción según su diámetro.

Tabla 6.1. Propiedades físicas de los discos de extracción en fase sólida según su diámetro

Propiedad	4 mm	7 mm	10 mm	25 mm	47 mm	90 mm
Área superficial (cm ²)	0,13	0,38	0,80	4,9	17	64
Masa (mg) ^a	4	10	25	140	500	1850
Velocidad de flujo (mL min ⁻¹)	0,5	1,5	3	20	60	250
Volumen de elución (mL)	0,15	0,25	0,5	3	10	35
Volumen típico de muestra (mL)	<1	<5	<25	<250	<1000	<5000

a: Sorbentes basados en sílica

6.2.4. Tipos de sorbentes

Los sólidos sorbentes pueden ser hidrofóbicos o polares. La naturaleza y propiedades del sorbente son de gran importancia para una retención efectiva de la especie metálica. Una elección adecuada del sorbente es crucial para el desarrollo de la metodología de extracción en fase sólida. Las principales características que se buscan en un sólido sorbente son: (1) la posibilidad de extraer un gran número de elementos traza en un amplio rango de pH; (2) una sorción y elución rápida y cuantitativa; (3) una alta capacidad; (4) regenerabilidad; y (5) accesibilidad.

Existen muchas sustancias sorbentes disponibles para este propósito [Camel, 2003], las cuales se pueden dividir en dos categorías principales: *sorbentes de naturaleza inorgánica* (gel de sílice SiO₂; alúmina Al₂O₃; magnesia MgO y otros óxidos) y *sorbentes de naturaleza orgánica* (polímeros naturales y polímeros sintéticos).

a) *Sorbentes de naturaleza inorgánica*: El principal sorbente dentro de este grupo está basado en el empleo de gel de sílice SiO₂, presentando estabilidad mecánica, térmica y química bajo determinadas condiciones.

- *Gel de sílice*: Los agentes quelatantes pueden ser fácilmente inmovilizados sobre este tipo de material caracterizado por una elevada estabilidad y por la presencia de grupos silanol. Sin embargo, este sorbente posee una baja selectividad además de ser sufrir hidrólisis a pH básicos. Por ello, normalmente se modifica la superficie del gel de sílice con el fin de conseguir sorbentes sólidos más selectivos.

En tal caso, por un lado se puede realizar una inmovilización química donde se forma un enlace entre los grupos de la superficie del gel de sílice y los del compuesto orgánico (*sorbentes funcionalizados*), y por otro lado una inmovilización física donde el compuesto orgánico es directamente adsorbido sobre los grupos silanol de la superficie del gel de sílice (*sorbente impregnado*) [Camel, 2003].

- *Octadecil-sílica (SiO₂-C₁₈)*: Octadecil-sílica se ha convertido en el sorbente de sílice más popular donde los grupos alquilo están enlazados covalentemente a los grupos silanol de la superficie de la sílica [Cámara, 2002]. Este tipo de sorbente modificado por los adecuados ligandos, ha sido empleado de manera satisfactoria en la determinación de iones metálicos.

A pesar, de su amplio abanico de aplicaciones en la preconcentración de trazas metálicas, los sorbentes basados en sílica (octadecil-sílica o gel de sílice funcionalizada) presentan un rango de pH limitado, ya que a pH muy ácidos (por debajo de pH 2) y a pH muy básicos (por encima de pH 8) se produce la hidrólisis del material. Como consecuencia, se prefieren los sorbentes poliméricos.

- *Otros óxidos inorgánicos*: TiO₂ (titania), Al₂O₃ (alúmina), ZrO₂ (zirconia) y MgO (magnesia).

b) *Sorbentes de naturaleza orgánica*:

Este grupo puede ser dividido en sorbentes de tipo polimérico y no-polimérico. El material polimérico tiene la ventaja frente a los soportes de tipo sílice, antes comentados, que pueden trabajar a lo largo de toda la escala de pH. Es de destacar también la creación de nuevos materiales mediante la formación de enlaces químicos entre grupos adicionales y las cadenas de polímero.

- *Sorbentes basados en poliestireno-divinilbenceno*: Amberlita XAD-1, XAD-2, XAD-4 y XAD-16 son resinas de poliestireno-divinilbenceno (SDB) con cierto carácter hidrofóbico y sin capacidad de intercambio iónico. Este tipo de material permite las interacciones de tipo π - π con anillos aromáticos. Debido al carácter hidrofóbico de estos materiales de SDB, la retención de elementos traza requiere de la adición de ligandos a la muestra. Aunque se pueden emplear ligandos de tipo inorgánico, se prefiere el empleo de ligandos orgánicos.

Aunque los sorbentes basados en poliestireno divinilbenceno son probablemente los más empleados, otros materiales han sido también usados de manera satisfactoria, como los que se nombran a continuación:

- *Copolímeros de divinilbenceno-vinilpirrolidina.*
- *Polímeros de poliacrilato: Amberlita XAD-7 y XAD-8.*
- *Polímeros de poliuretano.*
- *Polímeros de polietileno.*
- *Polímeros de politetrafluoroetileno.*
- *Polímeros de poliestireno.*
- *Polímeros de poliamida.*
- *Resinas quelatantes de tipo iminodiacetato.*
- *Resinas quelatantes de tipo propilendiaminotetraacetato.*
- *Resinas basadas en poliacrilonitrilo.*
- *Polímeros basados en la polimerización de la metátesis de anillos abiertos.*
- *Sorbentes de carbono.*
- *Celulosa.*
- *Sorbentes basados en naftaleno.*

De entre todos los tipos de fases sólidas, los más empleados y más eficientes son los discos octadecil-sílica y polímeros tales como el poliestireno-divinilbenceno (SDB) [Fritz, 2003]. Con los discos C_{18} pueden realizarse extracciones no polares, mientras que con los discos de SDB se pueden llevar a cabo extracciones de polaridad moderada. Los materiales de sílice se caracterizan por un alto consumo de disolventes y de tiempo, así como por una baja capacidad de carga y un rango de pH limitado. Además, en algunos casos, los procesos pueden ser irreversibles y pueden provocar la degradación de ciertos analitos [Culleré, 2003]. En contraposición, los polímeros de SDB (Fig. 6.2) presentan una capacidad de carga mucho mayor y como se ha destacado, son más estables frente a pH extremos.

En la tabla 6.2 se muestran las características principales para las fases sólidas más utilizadas.

El SDB ha sido el material seleccionado para este capítulo, ya que no presenta interacciones catiónicas secundarias debidas a los grupos silanol ni las limitaciones de pH comunes del gel de sílice.

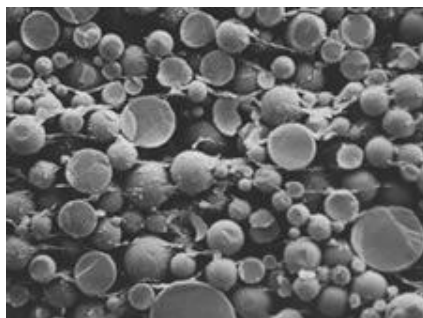


Fig. 6.2. Estructura a nivel microscópico del poliestireno-divinilbenceno

Tabla 6.2. Comparación de fases sólidas típicas de sílice y copolímeros (<http://solutions.3m.com>)

	Sílice	Copolímero
Rango de pH	2 a 12	1 a 14
% Materia Orgánica	< 22%*	100%
Interacciones secundarias	Sí	No
Funcionalidad	Alifática	Aromática y alifática
Tamaño de partícula	Irregular	Esférica
Tamaño de poro	60 Å	80 Å

* varía desde 6% a 22% de carbono, dependiendo del grupo funcional

6.2.5. Discos de extracción modificados

Es importante destacar como la selectividad del soporte sólido empleado en extracción en fase sólida, se incrementa inmovilizando reactivos orgánicos sobre la superficie del mismo. La selectividad de la fase sólida modificada hacia determinados iones metálicos, se puede atribuir al tamaño del compuesto orgánico empleado para modificar el sólido, la actividad de los grupos funcionales de la superficie así como del tipo de grupo funcional [Camel, 2003].

De esta forma, a las etapas anteriormente mencionadas del proceso de extracción en fase sólida, se debe añadir una etapa más previa al paso de la muestra, en la que se hace pasar el reactivo disuelto en el disolvente adecuado para inmovilizarlo sobre el sólido soporte y así modificar el disco de extracción.

En la figura 6.3 se ilustran las etapas normalmente empleadas en las técnicas de extracción en fase sólida empleando reactivos orgánicos inmovilizados en el sólido soporte.

La inmovilización de los ligandos orgánicos o indicadores sobre el material soporte es la clave para su aplicación en sensores ópticos.

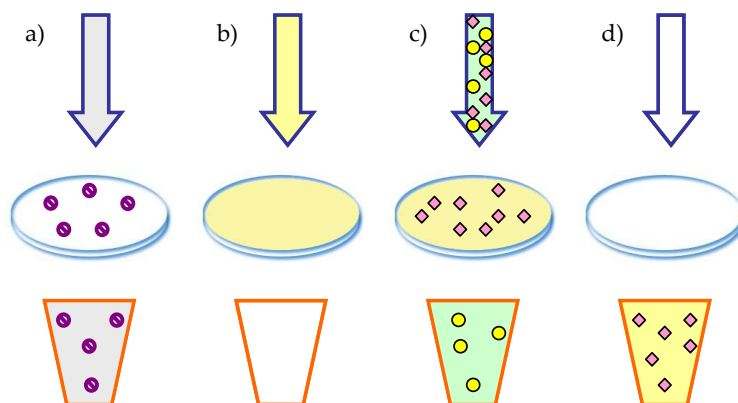


Fig. 6.3. Etapas del proceso de extracción en fase sólida: a) Limpieza; b) inmovilización del reactivo; c) paso de la muestra y d) elución

6.3. Sensor óptico basado en la extracción en fase sólida colorimétrica

De entre los diferentes tipos de formatos normalmente empleados en extracción en fase sólida, los discos de extracción han sido los seleccionados en este trabajo debido a sus características. La principal ventaja es la posibilidad de preconcentrar los analitos a caudales mayores de los empleados con cartuchos al no existir formación de caminos preferentes (efecto canal) y al existir una transferencia de masa más eficaz debido al menor tamaño de partícula utilizado en su fabricación [Cámara, 2002].

A pesar de las ventajas que presenta la extracción en fase sólida convencional mediante empleo de discos, se trata de una metodología que requiere de bastante tiempo para la realización de cada una de las etapas. Además, el volumen de disolventes necesario, aunque menor que el empleado por otras técnicas similares, sigue siendo grande.

De esta forma, la **miniaturización** es una buena forma de evitar estos efectos negativos, la cual ha sido objeto de muchos estudios de investigación. La combinación de técnicas analíticas modernas con la miniaturización permite desarrollar poderosos dispositivos analíticos para un control efectivo de la contaminación.

Es por ello, por lo que se decidió tomar la extracción en fase sólida empleando discos como técnica analítica y realizar la miniaturización de la misma, reduciendo el tamaño tanto del sistema de filtración y el disco, así como de los volúmenes necesarios de muestra [Armenta, 2008] (Fig. 6.4).

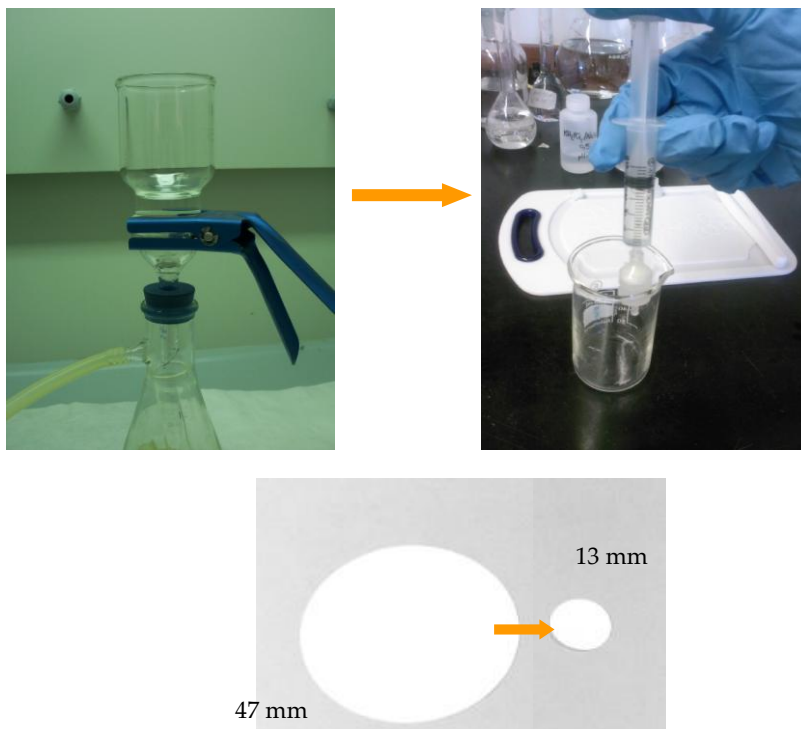


Figura 6.4. Miniaturización de la extracción en fase sólida convencional y de los discos de poliestireno divinilbenceno

Por otro lado, la extracción en fase sólida convencional requiere de una etapa final de elución, mediante el empleo de disolventes, por lo que en grandes cantidades, esto conlleva a un impacto medioambiental y mayor manipulación de la muestra.

Debido a que la interacción del analito de interés con el reactivo inmovilizado sobre el material soporte, puede provocar el cambio de alguna de las propiedades ópticas del sistema (absorbancia, reflectancia, luminiscencia, etc.), la etapa de elución final puede ser eliminada del proceso, determinando la cantidad de analito directamente sobre la superficie del sólido empleando algún tipo de técnica de medida colorimétrica y fibra óptica para transmitir la señal [Pons, 2005; Narayanaswamy, 2001], convirtiéndola así en lo que se buscaba desde un principio, un **sensor óptico**.

Con esta configuración se ha desarrollado la “**extracción en fase sólida colorimétrica (C-SPE)**” de gran interés en los últimos años [Dias, 2006]. Se basa en la extracción de los analitos a determinar sobre un material soporte cargado con un reactivo colorimétrico y su posterior cuantificación directamente sobre la superficie del disco empleando espectroscopía de reflectancia difusa, siendo muy adecuado para análisis de control debido a su simplicidad y rapidez.

6.3.1. Fundamento

Un sensor químico de fibra óptica (u optodo) ideal, debe cumplir un mínimo de características, como exactitud, precisión, selectividad, rapidez, estabilidad, pequeño tamaño, bajo coste y fácil de preparar y mantener.

Todo optodo busca una instrumentación portátil adecuada para análisis rutinarios capaz de desarrollar medidas *in-situ* sin la necesidad de un tratamiento o manipulación previa de la muestra [Varney, 2000; Fouladgar, 2010].

Los métodos espectroscópicos normalmente empleados en los optodos son la absorbancia, fluorescencia y reflectancia, en los que se aplican fibras ópticas para transmitir la información desde el transductor o fase reactiva hasta el instrumento.

La interacción entre analito y reactivo inmovilizado se puede incluso observar a simple vista debido al cambio de color del disco, siendo la intensidad del color directamente proporcional con la concentración del analito [Ensafi, 2008] (fig. 6.5).

La *extracción en fase sólida colorimétrica* es una técnica que combina la química colorimétrica con la extracción en fase sólida para determinar la

concentración de un determinado analito mediante el cambio de alguna propiedad óptica del disco modificado, sin necesidad de etapa de elución. Entre otras ventajas, esta técnica minimiza la exposición a sustancias peligrosas [Hill, 2009]. Además, si se emplea fibra óptica para transmitir la información que lleva codificada el cambio de la propiedad óptica del sistema, se habla de un *optodo o sensor químico de fibra óptica*.

Es importante destacar que existen cuatro modalidades de C-SPE: puede producirse primero la complejación en disolución y posterior extracción del complejo soluble; por otro lado se puede producir en una primera etapa la extracción del analito sobre el material soporte y posterior exposición a la disolución del reactivo complejante; puede también formarse un complejo insoluble entre reactivo y analito y recogerse a continuación sobre la superficie de extracción; y por último la modalidad empleada en este trabajo, en la cual se inmoviliza el reactivo con posterior extracción y complejación del analito directamente en el disco [Gazda, 2004a; Gazda, 2004b].

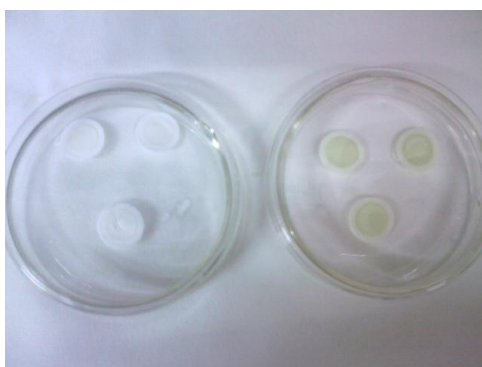


Figura 6.5. Cambio de color del disco al formarse el complejo entre el reactivo y el metal (Discos tratados con 0 mg/L (izquierda) y 1 mg/L (derecha) de Cu^{2+})

6.3.2. Etapas

De esta forma, este optodo requiere de dos etapas bien diferenciadas para su aplicación en el análisis de metales:

a) En primer lugar, se lleva a cabo la preparación del sensor inmovilizando el reactivo sobre el material soporte, y a continuación se procede a la extracción en

fase sólida (SPE) del metal desde la muestra de agua hasta el disco impregnado con el reactivo orgánico colorimétrico selectivo para el analito en cuestión.

b) En segundo lugar, se realiza la determinación de la cantidad de analito extraído y complejo mediante el cambio de alguna propiedad espectroscópica empleando fibra óptica para transmitir la información (Fig. 6.6).

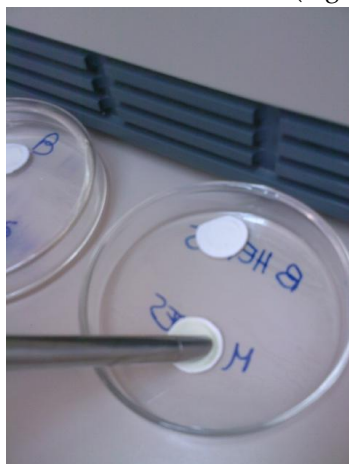


Figura 6.6. Empleo de fibra óptica para transmitir la información al detector

6.4. Desarrollo y optimización del método

Los estudios de desarrollo y optimización de un nuevo dispositivo sensor basado en la técnica C-SPE aplicado al análisis de iones metálicos que se han realizado en esta Tesis, se basan en una estrategia en tres etapas:

a) Estudios preliminares con el fin de encontrar el reactivo orgánico adecuado para su empleo como transductor químico en el sensor y selección del soporte más adecuado para la extracción en fase sólida.

b) Estudio univariante de las variables más significativas del sistema empleando extracción en fase sólida convencional (SPE) para establecer el intervalo de trabajo más adecuado de cada una de ellas.

c) Por último, se ha aplicado un diseño factorial fraccionario 3^{3-1} que incluye dos réplicas del punto central, para establecer los valores más adecuados de las variables significativas del sistema empleando extracción en fase sólida colorimétrica (C-SPE).

6.4.1. Estudios preliminares

La selectividad y sensibilidad del sensor óptico con el diseño que se va a aplicar en este trabajo viene definida en gran medida por la naturaleza del reactivo que se utilice así como por las condiciones físicas y químicas que favorezcan la interacción entre esta especie y el analito. Por ello, las investigaciones en este campo se centran, entre otros aspectos, en la búsqueda de nuevos reactivos aplicables en este tipo de sensores. Las principales características que debe cumplir un reactivo orgánico para ser empleado como transductor químico en este tipo de sensor óptico son las siguientes:

- Debe inmovilizarse en la superficie sólida del disco de extracción.
- Debe ser capaz de formar un complejo con el metal y que por sus características quede retenido en el disco.
- Al formarse el complejo metálico debe producirse la variación de alguna de las propiedades ópticas del sistema.
- La cinética de formación del complejo metálico debe ser relativamente alta para que el complejo se vaya formando a medida que se hace pasar la muestra a través del disco.
- Y debe dar lugar a una reacción reversible, ya que una de las características que definen a un sensor es su reversibilidad, es decir, la capacidad de recuperar las propiedades iniciales que presentaba la molécula sensora antes de su aplicación.

Es por ello por lo que en primer lugar se hace necesario realizar una serie de estudios preliminares con el fin de encontrar un sistema adecuado que reúna estas propiedades, para su posterior aplicación en la extracción en fase sólida colorimétrica.

De entre los tipos más empleados de discos en extracción en fase sólida, se han seleccionado para este estudio dos tipos de diferente naturaleza, por un lado los discos de gel de sílice C_{18} (*EmporeTM C₁₈*) y por otro, los polímeros de poliestireno-divinilbenceno (*EmporeTM SDB-XC*). En cuanto al ligando orgánico, se han llevado a cabo una serie de ensayos con diferentes reactivos del grupo de las hidrazonas estudiando su capacidad de retención en el disco así como su reactividad con metales de interés medioambiental. Los reactivos orgánicos

empleados han sido: 2-acetilpiridina saliciloilhidrazona (2-APSH), 2-hidroxibenzaldehido benzoilhidrazona (2-HBBH), 2-acetilpiridina benzoilhidrazona (2-APBH) y saliciloilhidrazona del piridoxal (PSH). Se seleccionaron estos reactivos debido a su capacidad de formar quelatos con un gran número de metales pesados con buenas características espectroscópicas.

Se realizaron una serie de pruebas previas mediante extracción en fase sólida (SPE) empleando los discos de 47 mm y midiendo por espectroscopía de absorción atómica con llama las recuperaciones finales. En primer lugar, se emplearon los discos C₁₈ y los reactivos orgánicos: 2-APSH, PSH y 2-APBH para la extracción de Pb(II). Para ello, se hicieron pasar 5 mg de reactivo disueltos en 2 mL del disolvente orgánico adecuado, y a continuación los 500 mL de muestra con Pb(II) 20 µg L⁻¹ y ajustando el pH con disoluciones de HNO₃ y NaOH 0,1 M. Para la etapa final de elución se añadieron 10 mL de HNO₃ 0,5 M.

En la tabla 6.3 se puede observar la eficacia de la SPE para cada uno de los reactivos inmovilizados a diferentes valores de pH de la muestra.

Tabla 6.3. Estudio de la eficacia de la SPE con 2-APSH, PSH y 2-APBH inmovilizados en discos C₁₈ para el ion Pb²⁺ a diferentes pH de la muestra

Reactivo	pH de la muestra	% Recuperación
2-APSH	4,6	7,7
	5,6	18,4
	6,6	18,6
PSH	8	16,7
	5	9,9
2-APBH	5,5	17,1
	6	32,2
	6,5	35
	7	36,5
	>8	Hidrólisis del disco C18

Condiciones: 20 µg L⁻¹ de Pb²⁺ y factor de preconcentración de 50

De los resultados mostrados en la tabla, se puede decir que la 2-APBH era la que proporcionaba los valores más altos de recuperación. Por lo que se realizó el estudio de alguna de las variables más importantes que podían afectar al sistema, como el efecto de la cantidad de reactivo así como el tipo de eluyente. Pero, tras

una serie de experiencias posteriores, no se pudo alcanzar un porcentaje de recuperación superior al 52,3%.

A la vista de los resultados, se pudo concluir que los discos C₁₈ no proporcionaban recuperaciones muy elevadas, bien porque estos reactivos no tuvieran las propiedades adecuadas para retenerse en el disco, o bien porque el complejo metálico no era lo suficientemente apolar como para adsorberse sobre el mismo, ya que el adsorbente octadecil sílice retiene compuestos apolares.

Es por ello, por lo que se decidió cambiar de tipo de material y realizar experiencias similares con los discos de poliestireno divinilbenceno (SDB), los cuales podían llevar a cabo extracciones de compuestos con polaridad moderada. De los estudios llevados a cabo en el capítulo 5, se concluyó que la 2-HBBH podía ser empleada como una potencial molécula quimiosensora para el desarrollo de un dispositivo sensor óptico de Cu(II). De esta forma, se realizaron diversas experiencias con la 2-HBBH y cobre empleando discos SDB. En este caso, se hicieron pasar en primer lugar 2,5 mg de reactivo disueltos en 2,5 mL de etanol, a continuación los 500 mL de muestra con Cu(II) 40 µg L⁻¹ y 50 mL de disolución reguladora Hydrion para el ajuste del pH. Para la etapa final de elución se añadieron en este caso 10 mL de HNO₃ 1 M.

En la tabla 6.4 se recogen los resultados más significativos obtenidos con este reactivo a distintos pH.

Tabla 6.4. Estudio de la eficacia de la SPE con 2-HBBH inmovilizada en discos SDB para el ion Cu²⁺ a diferentes pH de la muestra

Reactivo	Metal	pH de la muestra	Concentración del extracto (ppm)	% Recuperación
2-HBBH	Cu	3	0,29	14,6
		6	1,46	72,9
		7	1,76	88,06
		8	1,66	82,8
		9	1,53	76,4

Condiciones: 40 µg L⁻¹ de Cu²⁺ y factor de preconcentración de 50

Como se puede observar, las recuperaciones aumentaron enormemente al cambiar de soporte. Además, los valores de retención de cobre en ausencia de reactivo fueron muy pequeños, siempre por debajo de 0,03 ppm de Cu(II), para todos los pH estudiados, confirmando que el reactivo era el que incrementaba considerablemente la extracción en fase sólida del metal por formación del complejo y no el material del disco el que producía la retención.

Por todo ello, se pudo asegurar que el reactivo 2-HBBH se quedaba inmovilizado satisfactoriamente sobre los discos SDB y que era capaz de retener el ión cobre formando un complejo a valores de pH cercanos a la neutralidad. Además la formación del complejo metálico se detectaba fácilmente a simple vista por un cambio de color apreciable en el disco de blanco a verde, en ausencia y presencia de cobre, respectivamente (ver fig. 6.5).

De esta forma, se seleccionó este reactivo para el desarrollo de un nuevo sensor de fibra óptica rápido y sencillo para la determinación de Cu(II) trabajando a valores de pH próximos a la neutralidad y mediante la inmovilización de 2-HBBH en discos SDB.

6.4.2. Estudios univariantes

Una vez seleccionado el reactivo adecuado para desarrollar el método se pasó al estudio de los rangos de trabajo más adecuados para los parámetros más importantes que afectaban al sistema.

El estudio de parámetros químicos tales como pH, cantidad de reactivo y naturaleza de la disolución reguladora empleada, fue realizado mediante el método univariante, es decir, estudiando las mejores condiciones para cada una de las variables individualmente con el objetivo de conseguir la máxima eficacia del sistema. Para estos estudios univariantes se empleó la extracción en fase sólida convencional con espectroscopía de absorción atómica con llama.

6.4.2.1. Estudio del pH de la muestra

El pH es una variable importante a tener en cuenta en cualquier sistema sensor que emplee una reacción de formación de complejos como sistema

transductor químico o fase reactiva. Normalmente, los ligandos orgánicos empleados para ello tienen propiedades ácido-base, por lo que variaciones en el pH pueden modificar su carga y polaridad e influir en la reacción de complejación del metal, afectando así a su capacidad de inmovilización sobre el disco y a la formación del complejo metálico. Es por ello, por lo que se debe buscar un pH adecuado para que el reactivo cumpla ambas funciones.

La influencia del pH sobre la recuperación de $40 \mu\text{g L}^{-1}$ de cobre fue estudiada en el rango de pH de 3 a 9 empleando reguladora Hydrion. Las restantes condiciones fueron: 2,5 mg de 2-HBBH en 2,5 mL de etanol; 10 mL de HNO_3 1 M como eluyente y un factor de preconcentración de 50.

Para ello, se hacían pasar los 2,5 mg de reactivo disueltos en 2,5 mL de etanol a través del disco por acción de la gravedad. Tras una etapa de secado se pasaban los 500 mL de muestra con Cu(II) $40 \mu\text{g L}^{-1}$ con 50 mL de reguladora Hydrion al pH en estudio, empleando en este caso la ayuda de una bomba. Para la etapa final de elución se añadían 10 mL de HNO_3 1 M para conseguir el factor de preconcentración requerido.

Los resultados obtenidos se recogen en la figura 6.7, donde se ha representado el porcentaje de recuperación frente al valor de pH.

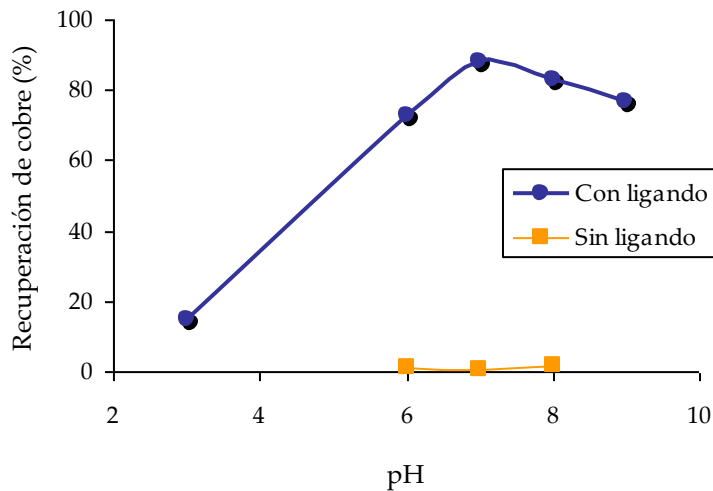


Figura 6.7. Efecto del pH en la extracción de Cu^{2+} mediante los discos de membrana SDB modificados ($C_{\text{Cu}^{2+}}=40 \mu\text{g L}^{-1}$)

Se puede observar como el máximo de recuperación de cobre se consigue a valores de pH cercanos a la neutralidad. Así, se escogió pH 7 para los siguientes experimentos. Es de destacar que dado que los pH neutros están dentro del rango apropiado para aplicaciones biológicas y medioambientales, el intervalo de pH obtenido representa entonces una ventaja adicional para el método propuesto.

6.4.2.2. Estudio de la cantidad de reactivo inmovilizado

Debido a que la formación del complejo depende directamente de la cantidad de reactivo inmovilizado sobre el sólido soporte, se debe estudiar esta variable para que todo el metal de la muestra quede complejado con el ligando. Por tanto, se estudió la extracción de cobre a pH 7 inmovilizando diferentes cantidades de ligando disuelto en etanol sobre distintos filtros SDB (Fig. 6.8). Se continuó empleando 10 mL de HNO₃ 1 M como eluyente y un factor de preconcentración de 50.

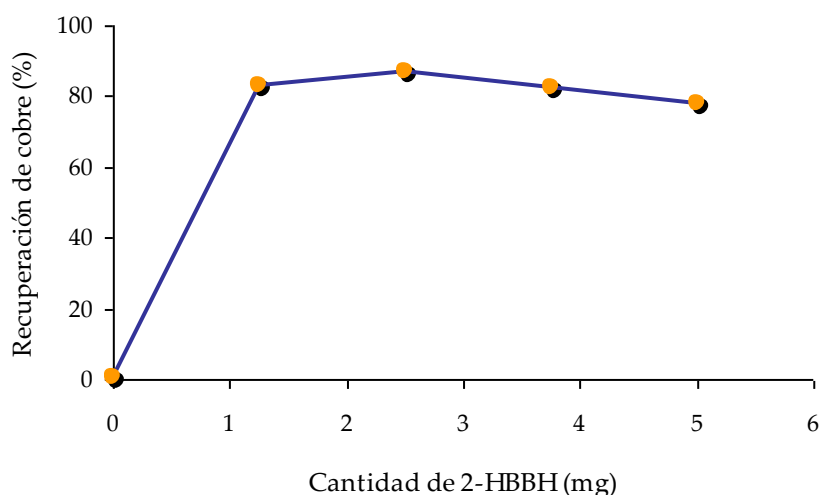


Figura 6.8. Efecto de la cantidad de reactivo inmovilizado en los discos de membrana SDB en la extracción de Cu²⁺ 40 µg L⁻¹

La mínima cantidad de 2-HBBH requerida para conseguir la máxima recuperación de cobre fue de 1,25 mg. Sin embargo, y con objeto de favorecer la formación del complejo se seleccionó la adición de 2,5 mg de ligando en la inmovilización sobre el disco de membrana para realizar las siguientes experiencias.

6.4.2.3. Estudio del tipo de reguladora

Después del estudio de pH y de la cantidad de reactivo inmovilizado, se probaron diferentes disoluciones reguladoras para estudiar si su naturaleza podía ejercer alguna influencia sobre la retención del metal en el disco de SPE.

Para ello se emplearon las cinco reguladoras que se muestran en la tabla 6.5. Las restantes condiciones fueron las mismas empleadas en los estudios anteriores. Como puede comprobarse, las reguladoras Hydrión y fosfato potásico fueron las que proporcionaron las mejores recuperaciones para el cobre.

Tabla 6.5. Influencia de la naturaleza de diferentes disoluciones reguladoras para el control del pH de la muestra en la extracción con discos SDB de Cu^{2+} a pH 7

Tampón empleado	% Recuperación
Hydrión	88,06
NH_3 1M/ HNO_3 1M	74,35
HEPES 0,5 M	55,15
$\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ 0,5 M	88,73
PIPES 0,05 M	67,27

6.4.3. Estudio del sensor de Cu(II) por C-SPE

Después del conocimiento previo del comportamiento del sistema mediante su estudio univariante empleando SPE y elución del ion cobre con posterior medida por absorción atómica con llama, se realizó el estudio multivariante de las variables que afectaban al sistema sensor con detección por fibra óptica midiendo la señal de reflectancia. No obstante, y antes de realizar este estudio se indica a continuación el procedimiento seguido para la aplicación del método C-SPE para el análisis de iones cobre.

6.4.3.1. Procedimiento de aplicación del sensor de Cu(II) por extracción en fase sólida colorimétrica

Teniendo en cuenta el valor más adecuado para cada uno de los parámetros investigados mediante estudios univariantes por el método de extracción convencional, con discos de 47 mm y espectroscopia de absorción atómica con llama como técnica de medida después de la elución del analito, se

procedió a investigar el nuevo sistema mediante extracción en fase sólida colorimétrica, con discos de 13 mm y medidas mediante fibra óptica y detección de la reflectancia difusa. Hay que tener en cuenta que al trabajar con un sistema más reducido, las cantidades de reactivo, volúmenes, etc. pueden variar con respecto al sistema de mayores dimensiones. Además, dada la menor sensibilidad del sistema de detección por reflectancia difusa frente al de absorción atómica, se incrementó la concentración del metal en la muestra.

El procedimiento de preparación de los discos de extracción de cobre modificados con 2-HBBH consiste en los siguientes pasos:

- Se coloca el disco de membrana de 47 mm (*3M Millipore*) en el aparato de filtración (*Millipore*) y se somete a un proceso de limpieza con diferentes disolventes (ácido nítrico, metanol y acetonitrilo) y secado mediante el paso de aire durante varios minutos.

- A continuación, se corta el disco de 47 mm a 13 mm con la ayuda de un sacabocados de este diámetro.

- Después de la limpieza y reducción del tamaño del material soporte del sensor, se procede a inmovilizar el reactivo colorimétrico pasando 6,25 mg de 2-HBBH disueltos en un volumen de 6,25 mL de etanol. Este proceso se lleva a cabo colocando el pequeño disco en el interior de un soporte de filtración en flujo de 13 mm de diámetro interno (*Fisherbrand Syringe Swinnex Filter Holders, Millipore*). Para pasar la disolución de reactivo disuelto a través del disco, se utiliza una jeringuilla de plástico de 5 mL que se conecta al sistema de filtración como se muestra en la figura 6.9.

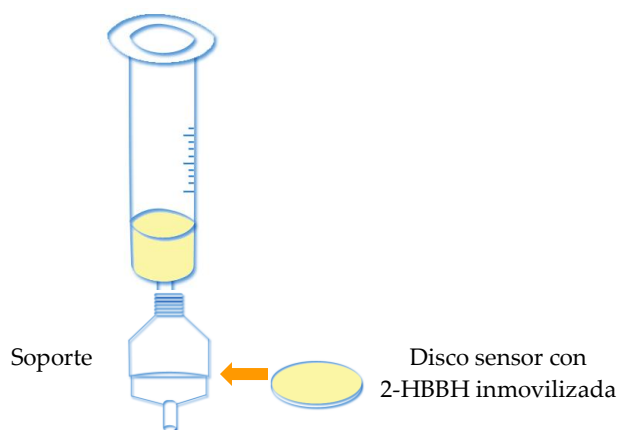


Figura 6.9. Dispositivo diseñado para la aplicación de los discos modificados en C-SPE

- Después de la impregnación con el reactivo orgánico, se deja que se seque el disco durante unos minutos en el interior del soporte de filtración.
- Posteriormente, el disco modificado se lava haciendo pasar 5 mL de agua por el dispositivo a una velocidad de flujo de una gota por segundo, con el fin de acondicionar la superficie del disco previamente al paso de la muestra acuosa.
- Finalmente, se pasa la muestra de 50 mL que contiene los iones cobre (1 mg L^{-1}) y cuyo pH se regula mediante el empleo de tampón $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ 0,05 M a un valor de 7. Para este paso se hace uso de otra jeringuilla de plástico pasando la muestra manualmente a una velocidad de aproximadamente una gota por segundo. Esta etapa requiere de unos 10 minutos para pasar la totalidad de la muestra a través del disco modificado.
- Después de la extracción, se pasan 10 mL de aire a través del sistema de filtración para eliminar los posibles restos de muestra que puedan quedar.
- Como paso final, se saca el disco del sistema y se coloca la fibra óptica en su superficie para así realizar la detección por reflectancia.

6.4.3.2. Estudio inicial de la disolución reguladora

Debido a que en los estudios univariantes se aplicaron dos disoluciones reguladoras con las que se obtuvo un porcentaje de recuperación similar ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ e Hydrion), se repitió este mismo estudio mediante medidas de reflectancia con el sistema sensor para seleccionar la reguladora más adecuada de las dos. La diferencia de señal entre el blanco (sin metal) y la muestra (con metal, 1 mg L^{-1}) era mayor para el caso de la disolución reguladora $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$, mientras que cuando se usaba la reguladora Hydrion, no había diferencia apreciable entre muestra y blanco. En el caso de la reguladora de fosfato, ese cambio de color se podía apreciar a simple vista, ya que el color de los discos cambiaba de blanco a verde con la concentración de cobre en la muestra. Es por ello por lo que esta reguladora fue la seleccionada para los siguientes estudios.

6.4.3.3. Diseño de experimento factorial fraccionario 3^{3-1}

Con el fin de seleccionar los valores más adecuados de las variables más importantes y significativas del sistema se realizó un diseño factorial fraccionario 3^{3-1} incluyendo dos experimentos del punto central, teniendo un total de 10

experimentos. La codificación empleada fue (-1, 0 y +1) para el nivel inferior, intermedio y superior, respectivamente (tabla 6.6).

Este tipo de diseño factorial permite reducir el número de experiencias a realizar. Es similar al diseño de Plackett-Burman empleado en capítulos anteriores, y permite evaluar eficazmente los factores usando una pequeña fracción de los experimentos del diseño factorial completo [Araujo, 1996]. Estos diseños reducidos son adecuados cuando se trabajan con intervalos pequeños para los factores [Figueroa, 2003]. En este tipo de diseños se suelen agregar dos o más observaciones del nivel central de los factores para estimar el error experimental.

Tabla 6.6. Matriz de las variables del diseño de experimentos 3^{3-1} con los valores codificados

Experimento	pH	Tiempo de inmovilización	Cantidad de reactivo inmovilizado
2	-1	0	+1
5	0	0	0
3	-1	+1	0
8	+1	0	-1
4	0	-1	+1
7	+1	-1	0
6	0	+1	-1
9	+1	+1	+1
1	-1	-1	-1
10	0	0	0

Las variables estudiadas fueron: el pH de la muestra, el tiempo de inmovilización y la cantidad de reactivo inmovilizado, debido a la relevancia que presentan estas variables a la hora de desarrollar este tipo de sensor. Se emplearon tres niveles para cada una de las variables (tabla 6.7). La elección de estos valores se realizó en función de los resultados experimentales obtenidos en los estudios univariantes. El tipo de disolución reguladora empleada para estos estudios fue la reguladora $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ 0,05 M y la disolución de metal en la muestra fue de 2,5 mg L^{-1} .

En la tabla 6.8 se muestran los datos de señal de reflectancia obtenidos para cada uno de los experimentos del diseño.

Tabla 6.7. Niveles de las variables del diseño de experimentos 3^{3-1}

Variables	Nivel inferior (-1)	Nivel intermedio (0)	Nivel superior (+1)
pH (KH ₂ PO ₄ /NaOH)	5	7	9
Tiempo de inmovilización (min)	5	10	15
Cantidad de reactivo inmovilizado (mg)	0,25	3,25	6,25

Tabla 6.8. Valores de las variables y de la señal de reflectancia del diseño de experimento 3^{3-1} ($C_{Cu^{2+}} = 2,5 \text{ mg L}^{-1}$)

Experimento	pH	Tiempo de inmovilización	Cantidad de reactivo inmovilizado	Señal de reflectancia (400 nm)
2	5	10	6,25	0,80
5	7	10	3,25	0,81
3	5	15	3,25	0,57
8	9	10	0,25	0,43
4	7	5	6,25	0,87
7	9	5	3,25	0,53
6	7	15	0,25	0,47
9	9	15	6,25	0,80
1	5	5	0,25	0,43
10	7	10	3,25	0,80

Los resultados del análisis factorial fueron analizados empleando el programa informático Statistica 7 [Statistica, 2004]. En primer lugar, se ha representado el correspondiente diagrama de Pareto de los efectos estandarizados (figura 6.10) que incluye la posible dependencia cuadrática de las variables.

De los resultados obtenidos se desprende que en el intervalo estudiado para cada una de las variables, las variables significativas (con un nivel de significación del 95 %) son el pH y la cantidad de reactivo, teniendo una influencia cuadrática la primera y lineal la segunda. De esta forma, un aumento de la cantidad de reactivo provoca un incremento positivo de la reflectancia y el pH por su parte presenta una influencia cuadrática, confirmando que el pH más adecuado para trabajar con este sistema es el neutro.

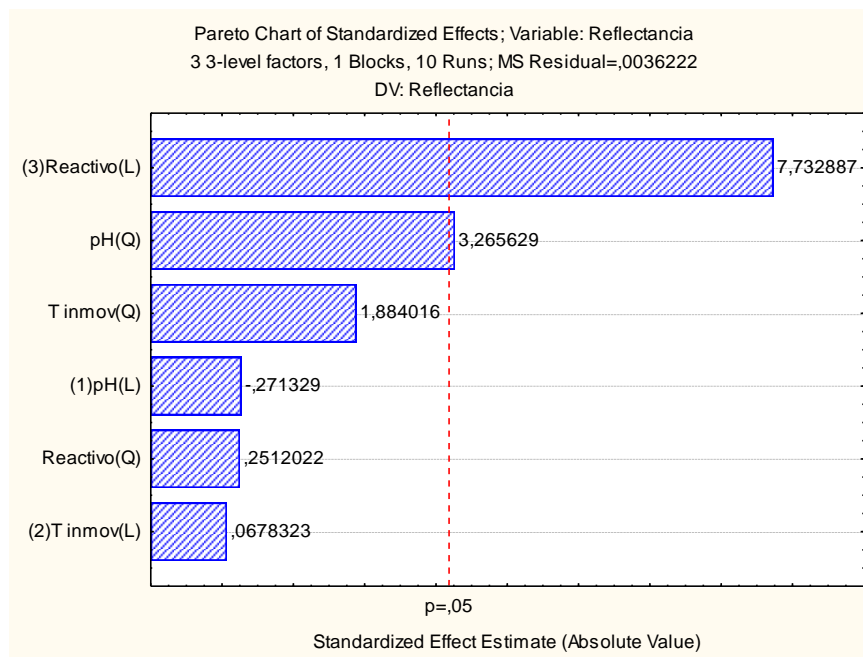


Figura 6.10. Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados para la señal de reflectancia

Se ha representado la superficie de respuesta del modelo de segundo orden, con el fin de observar la región de respuesta óptima que proporciona el diseño factorial fraccionario. Así, en las figuras 6.11, 6.12 y 6.13 se ha representado la variable respuesta producida por los factores, combinados de dos en dos.

En la figura 6.11 se ha representado el efecto del pH y el tiempo de inmovilización manteniendo la cantidad de reactivo con su valor máximo, ya que el diagrama de Pareto indica que esta variable influye linealmente en la reflectancia del sensor, produciendo mejor señal cuando se incrementa la cantidad de reactivo.

Por su parte, la figura 6.12 muestra el efecto del pH y la cantidad de reactivo manteniendo fijo el tiempo de inmovilización con el valor intermedio del intervalo. En este caso, el efecto de esta variable no es significativo, pero está definido por una relación cuadrática con mayor señal para el nivel intermedio de este factor.

En último lugar se ha representado el efecto del tiempo de inmovilización y la cantidad de reactivo manteniendo el pH con el valor intermedio del intervalo estudiado, ya que según el diagrama de Pareto, éste presenta una influencia cuadrática positiva.

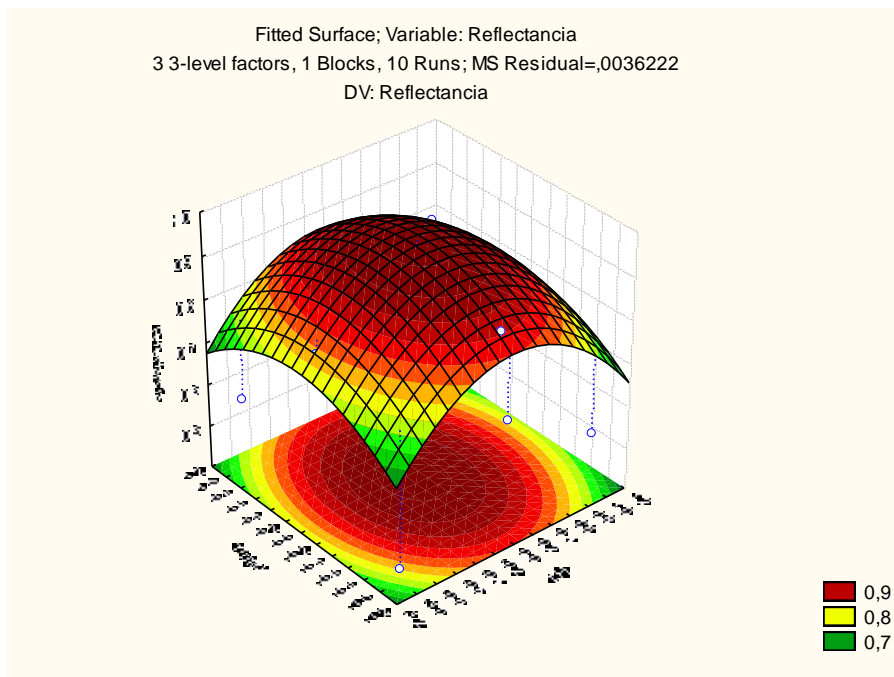


Figura 6.11. Efecto del pH y el tiempo de inmovilización sobre la señal de reflectancia (nivel del factor cantidad de reactivo= +1)

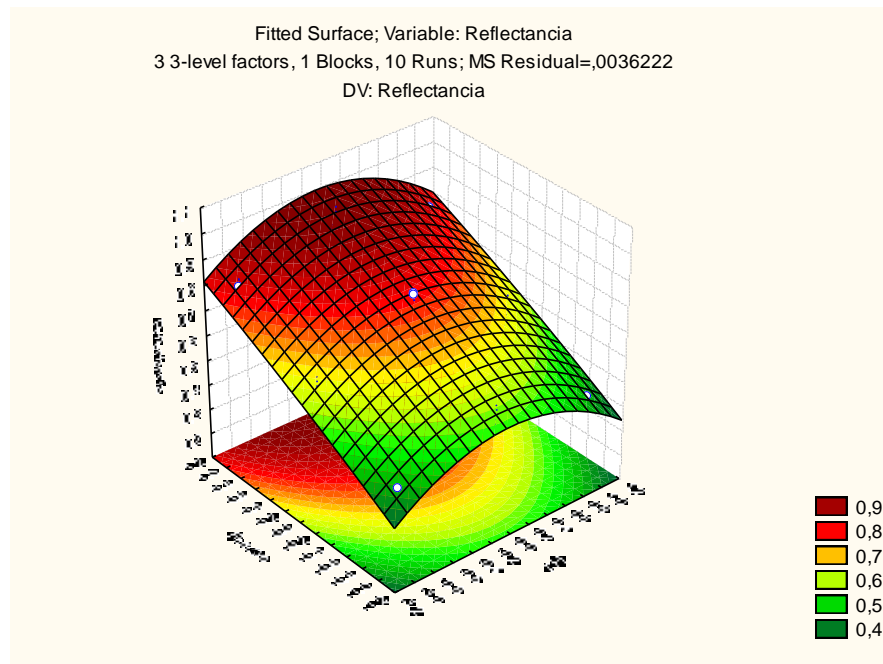


Figura 6.12. Efecto del pH y la cantidad de reactivo inmovilizado sobre la señal de reflectancia (nivel del factor tiempo de inmovilización = 0)

A partir de estas figuras puede comprobarse que las condiciones que permiten obtener la máxima señal del sensor se obtienen empleando la mayor cantidad de reactivo inmovilizado estudiada, acondicionando la muestra a pH 7, y utilizando un tiempo medio de inmovilización de 10 minutos.

6.5. Método de análisis del sensor de Cu(II) propuesto por C-SPE

Debido a los resultados obtenidos de los estudios anteriores, se puede decir que las condiciones más adecuadas de trabajo para el sensor de Cu(II) empleando C-SPE son las siguientes:

- pH: 7
- Cantidad de reactivo inmovilizado: 6,25 mg de 2-HBBH
- Tiempo de inmovilización: 10 min
- Disolución reguladora: $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ 0,05 M
- 50 mL de muestra

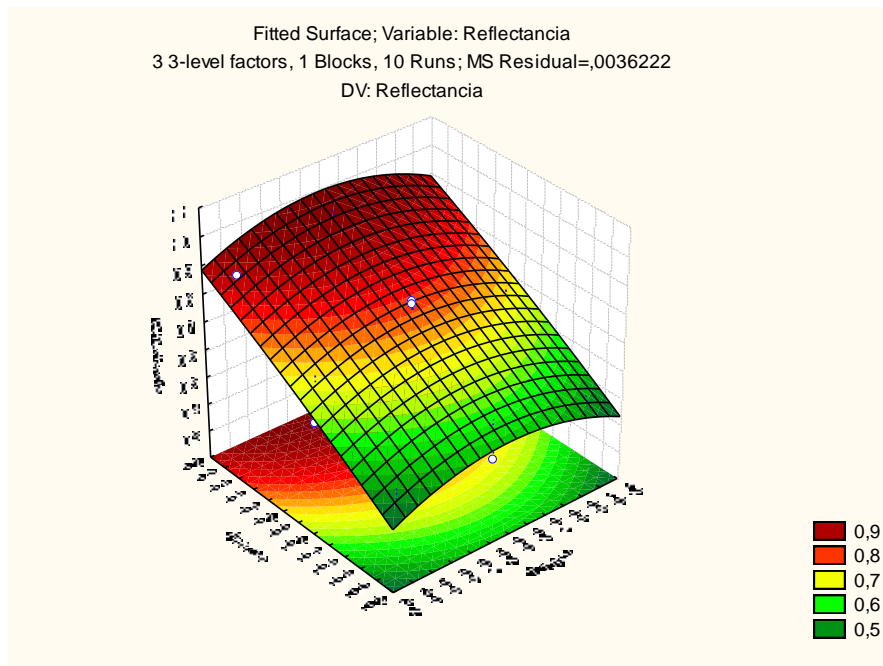


Figura 6.13. Efecto del tiempo de inmovilización y la cantidad de reactivo inmovilizado sobre la señal de reflectancia (nivel del factor pH = 0)

6.5.1. Parámetros analíticos del sensor

Bajo las condiciones determinadas anteriormente como las más adecuadas para el sensor de Cu(II), se pasó a estudiar las características del método propuesto.

6.5.1.1. Rango lineal de aplicación

Para verificar la relación lineal entre la reflectancia del sensor y la concentración de cobre en la muestra, se ajustó la curva de calibración bajo las condiciones óptimas estudiadas.

La curva de calibración para Cu(II) mostró una tendencia lineal en el rango de 0 hasta 2,5 mg L⁻¹ de Cu²⁺ con una ecuación de la recta de $y=0,2445x \text{ (mg/L)} + 0,1602$ (Fig. 6.14).

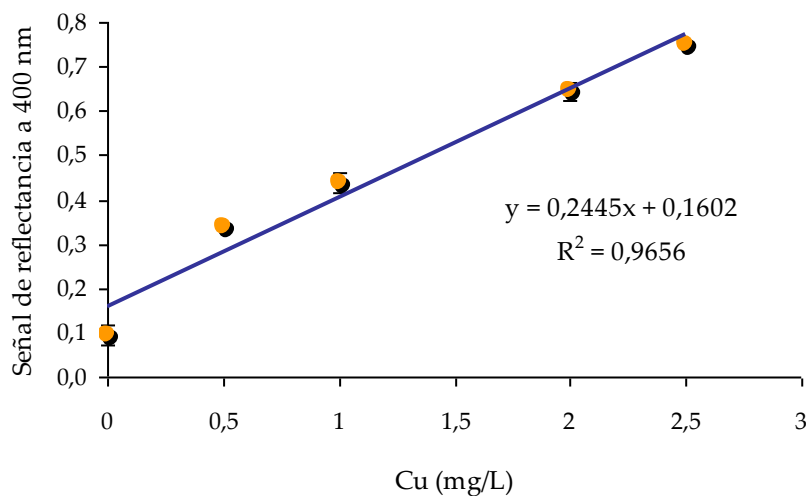


Figura 6.14. Curva de calibración del sensor de reflectancia de Cu^{2+} por C-SPE

6.5.1.2. Límite de detección (LD)

El límite de detección fue calculado de acuerdo con la expresión $DL=3\sigma/m$ [IUPAC, 1997], donde σ es la desviación estándar del blanco y m es la pendiente de la recta de calibrado. De esta forma, se obtuvo un valor para el límite de detección del método de $0,28 \text{ mg L}^{-1}$ de Cu^{2+} .

6.5.1.3. Reproducibilidad

La reproducibilidad del método fue evaluada a través de la desviación estándar relativa (RSD) de la medida de seis réplicas de una disolución conteniendo 1 mg L^{-1} de cobre. La RSD dio un valor de $4,87 \%$ y la precisión de la medida del sensor fue de $4,01 \%$ a un nivel de confianza del 95% ($n = 6$).

La forma de realizar estos cálculos estadísticos se ha explicado detalladamente en capítulos anteriores.

6.5.2. Estabilidad del disco sensor

Por lo que respecta al estudio de la estabilidad con el tiempo, no se observaron diferencias significativas en las propiedades ópticas de los discos con el transcurso de los días. Igualmente se comprobó la repetibilidad de la señal de un disco después de su utilización para la retención del metal con el tiempo. Los resultados obtenidos mostraron un alto grado de estabilidad de la medida óptica en las membranas. Gracias a esta propiedad, el sensor propuesto puede ser aplicado para la retención de cobre *in-situ* con la posibilidad de medir el disco en el laboratorio días después de su recogida.

6.5.3. Estudio de las interferencias

Finalmente, se evaluó la selectividad del sensor para determinar cobre en presencia de otras especies inorgánicas tales como las que se encuentran en muestras acuosas salinas como el agua de mar. El efecto de estas especies interferentes fue investigado adicionando cantidades conocidas de diferentes sales inorgánicas y metales a una disolución que contenía 1 mg L^{-1} de Cu(II) usando el método propuesto. Las concentraciones adicionadas fueron las que corresponden a la composición de agua de mar sintética [Grasshoff, 1983]. En la tabla 6.9 se detallan los resultados de este estudio sobre la respuesta del sensor. Los resultados obtenidos indicaron que prácticamente la señal del sensor era similar a la producida por el ión cobre con un error dentro del intervalo de precisión.

Para el estudio de la interferencia de otros metales sobre la respuesta del sensor se estudiaron diversos iones metálicos como Ca(II), Cd(II), Zn(II), K(I), Mg(II), Na(I), Pb(II), Fe(II) y Fe(III) a una concentración de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ sobre la señal de reflectancia para la misma cantidad de ion Cu(II). De los resultados obtenidos se dedujo que sólo Fe(III) y Zn(II) afectaban a la señal de reflectancia del sensor al pH de trabajo. La interferencia del ión férrico desapareció en presencia de ácido ascórbico al igual que ocurrió en el método anterior, pues el indicador no produce complejación con este estado de oxidación del metal.

Tabla 6.9. Estudio de las interferencias de sales inorgánicas en la determinación de 1 mg/L de iones Cu^{2+} (respuesta del sensor a 400 nm: 0,438)

Sal añadida	Concentración (g L ⁻¹)	Señal de Reflectancia (400 nm)	% Error
KCl	0,677	0,440	0,46
NaHCO ₃	0,196	0,420	-4,11
NaCl	23,939	0,450	2,74
NaF	0,003	0,450	2,74
MgCl ₂	10,825	0,450	2,74
Na ₂ SO ₄	3,994	0,450	2,74
H ₃ BO ₃	0,027	0,420	-4,11
KBr	0,098	0,460	5,02
SrCl ₂	0,024	0,460	5,02

De los resultados, se puede concluir que el sensor desarrollado se encuentra libre de las interferencias de la matriz salina, estando afectado por la presencia de Fe(III) y Zn(II) en la muestra.

6.6. Comparativa y tendencias futuras

Haciendo una revisión general de la bibliografía más actual en este campo, se puede observar como existen metodologías que inmovilizan reactivos orgánicos sobre soportes sólidos de distintos tipo, así como diferentes técnicas espectroscópicas de medida. De este modo, existen sensores químicos ópticos como el de Ensafi [Ensafi, 2009] y Fouladgar [Fouladgar 2010], que emplean películas de triacetilcelulosa y membranas de PVC, respectivamente como fase sólida y empleando absorbancia como técnica de medida.

Por otro lado, existen sensores que emplean como soporte sólido resinas quelatantes del tipo XAD-4 [Ahmad, 2002] y XAD-2 [Mahendra, 2003], y fluorescencia y reflectancia como técnicas de medida, respectivamente. Además es de destacar, publicaciones acerca de la extracción en fase sólida colorimétrica

[Arena, 2003; Fritz, 2003] las cuales hacen uso de la técnica desarrollada en este capítulo para aplicaciones espaciales (tabla 6.10).

Tabla 6.10. Comparación de sensores para iones metálicos por C-SPE con distintas formas de inmovilización

Ref.	Reactivo	Metal	Soporte sólido	Técnica medida
Ahmad, 2002	Purpurin	Al(III)	XAD-4	Fluorescencia
Mahendra, 2003	a-Benzoinoxima	Cu(II)	XAD-2	Reflectancia
Arena, 2003	DMABR	Ag(I)	SDB	Reflectancia
Fritz, 2003	Zn DTC	Cu(II) entre otros	SDB	Reflectancia
Ensafi, 2009	4-hydroxy salophen	Pb(II)	Triacetil- celulosa	Absorbancia
Fouladgar, 2010	Br-PADAP	Tl(III)	PVC	Absorbancia
Este trabajo	2-HBBH	Cu(II)	SDB	Reflectancia

Zn DTC: Zn dietilditiocarbamato; DMABR: 5-(p-dimetilaminobenzilideno) rodanina; Br-PADAP: 4-(5-bromo-2-piridilazo)-5-(dietilamino)-fenol; 2HBBH: 2-hidroxibenzaldehido benzoilhidrazona

De los resultados obtenidos de la investigación descrita en este capítulo se puede decir que se ha desarrollado un sensor rápido, sencillo y satisfactorio para el análisis de cobre en muestras acuosas. Hay que decir que el intervalo de aplicabilidad corresponde a concentraciones ligeramente elevadas de metal, por lo que el sensor puede ser muy útil como sistema de alarma en episodios de contaminación. No obstante, para estudios de monitorización de aguas se requiere disminuir el límite de detección del sensor. Por ello, y como perspectivas de futuro se pretende modificar la fibra óptica con detección por reflectancia por medidas de fluorescencia, dado que han quedado demostradas las adecuadas características fluorescentes del indicador 2-HBBH en el capítulo 5. Con este cambio se podrá mejorar la sensibilidad y selectividad del método y posiblemente se amplie su rango de linealidad. Por último, indicar que esta metodología abre un gran abanico de posibilidades para la determinación de iones metálicos en aguas, tales como la determinación del ión zinc o la especiación de hierro.

Referencias

- Ahmad, M., Narayanaswamy, R., **2002**. Optical fibre Al(III) sensor based on solid surface fluorescence measurement. *Sensors and Actuators B: Chemical* 81, 259-266.
- Anastas, P.T., **1999**. Green Chemistry and the Role of Analytical Methodology Development. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 29, 167-175.
- Araujo P.W., Brereton R.G., **1996**. Experimental design I. Screening. *Trends in Analytical Chemistry* 15(1), 26-31.
- Arena, M.P., Porter, M.D., Fritz, J.S., **2003**. Rapid, low level determination of silver(I) in drinking water by colorimetric–solid-phase extraction. *Analytica Chimica Acta* 482, 197–207.
- Armenta, S., Garrigues, S., de la Guardia, M., **2008**. Green Analytical Chemistry. *Trends in Analytical Chemistry* 27, 497-511.
- Boussetta, S., Branger, C., Margailan, A., Boudenne, J.L., Coulomb, B., **2007**. Modification of poly(styrene-co-divinylbenzene) membrane by grafting of salicylic acid via a ketone bridge. *European Polymer Journal* 43, 416-424.
- Cámara, C., Fernández, P., Martín-Esteban, A., Pérez-Conde, C., Vidal, M., **2002**. Toma y tratamiento de muestras. Editorial Síntesis. Madrid.
- Camel, V., **2003**. Solid phase extraction of trace elements. Review. *Spectrochimica Acta Part B* 58, 1177–1233.
- Culleré, L., Aznar, M., Cacho, J., Ferreira, V., **2003**. Fast fractionation of complex organic extracts by normal-phase chromatography on a solid-phase extraction polymeric sorbent: Optimization of a method to fractionate wine flavor extracts. *Journal of Chromatography A* 1017, 17–26.
- Curylo, J., Wardencki, W., Namiesnik, J., **2007**. Green aspects of sample preparation- a need for solvent reduction. *Polish Journal of Environmental Studies* 16, 5-16.
- Dias, N.C., Porter, M.D., Fritz, J.S., **2006**. Principles and applications of colorimetric solid-phase extraction with negligible depletion. *Analytica Chimica Acta*, 558, 230-236.
- Ensafi, A.A., Fouladgar, M., **2008**. Development of a Spectrophotometric Optode for the Determination of Hg(II). *IEEE Sensors Journal* 8, 347-353.
- Ensafi, A.A., Far, A.K., Meghdadi, S., **2009**. Highly selective optical-sensing film for lead(II) determination in water samples. *Journal of Hazardous Materials* 172, 1069-1075.
- Figueroa Preciado, G., **2003**. Optimización de una superficie de respuesta utilizando JMP IN. *Mosaicos Matemáticos* 11, 17-23.
- Filik, H., Yanaz, Z., **2009a**. A sensitive method for determining total vanadium in water samples using colorimetric-solid-phase extraction-fiber optic reflectance spectroscopy. *Journal of Hazardous Materials* 172, 1297-1302.

- Filik, H., Aksu, D., Apak, R., Boz, I., **2009b**. Rapid sensing of molibdenum by combined colorimetric solid-phase extraction-Reflectance spectroscopy. *Sensors and Actuators B* 141, 491-497.
- Fouladgar, M., Ensafi, A.A., **2010**. A novel optical chemical sensor for thallium(III) determination using 4-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-(diethylamino)-phenol. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 143, 590-594.
- Fritz, J.S., Arena, M.P., Steiner, S.A., Porter, M.D., **2003**. Rapid determination of ions by combined solid-phase extraction–diffuse reflectance spectroscopy. *Journal of Chromatography A*, 997, 41–50.
- Gangaiya, P., Mahendra, N., **2008**. Chapter 24: The application of fibre optic chemical sensors for heavy metal monitoring in contaminated environments. *Developments in Soil Science* 32, 589-600.
- Gazda, D.B., Fritz, J.S., Porter, M.D., **2004a**. Determination of nickel(II) as the nickel dimethylglyoxime complex using colorimetric solid phase extraction. *Analytica Chimica Acta* 508, 53-59.
- Gazda, D.B., Lipert, R.J., Fritz, J.S., Porter, M.D., **2004b**. Investigation of the iodine-poly(vinylpyrrolidone) interaction employed in the determination of biocidal iodine by colorimetric solid-phase extraction. *Analytica Chimica Acta* 510, 241-247.
- Grasshoff K., Ehrhardt M., Kremling K., **1983**. *Methods of Seawater Analysis*, 2nd Ed., Verlag Chemie, Weinheim, p.491.
- Hill, A.A., Lipert, R.J., Fritz, J.S., Porter, M.D., **2009**. A rapid, simple method for determining formaldehyde in drinking water using colorimetric-solid phase extraction. *Talanta* 77, 1405–1408.
- Hulanicki, A., Glab, S., Ingman, F., **1991**. Chemical Sensors definitions and classification. *Pure and Applied Chemistry* 63, 1247-1250.
- IUPAC. **1997**. McNaught, A.D., Wilkinson, A. *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the "Gold Book"). Oxford. Blackwell Scientific Publications.
- Kuswandi ,B., Taib, M.N., Narayanaswamy, R., **1999**. A new solid state instrument for optical toxic metal ions sensing. *Sensors and Actuators A: Physical* 76, 183-190.
- Mahendra, N., Gangaiya, P., Sotheeswaran, S., Narayanaswamy, R., **2003**. Investigation of a fibre optic copper sensor based on immobilised a-benzoinoxime (cupron). *Sensors and Actuators B: Chemical* 90, 118-123.
- Matsuoka, S., Yoshimura, K., **2010**. Recent trends in solid phase spectrometry: 2003-2009. A Review. *Analytica Chimica Acta* 664, 1-18.
- Namiesnik, J., Szefer, P., **2010**. *Analytical Measurements in Aquatic Environments*. Taylor & Francis Group.
- Narayanaswamy, R., **1993**. Optical Chemical Sensors: Transduction and signal processing. *Tutorial Review. Analyst*, 118, 317-322.
- Narayanaswamy, R., **2001**. Absorbance based sensors, Chapter in *Encyclopedia of Ocean Sciences*, Ed. J.H.Steele, S.A.Thorpe & K.K.Turekian, Academic Press, pp. 6-12.

Pons, C., Forteza, R., Cerdà, V., **2004**. Expert multi-syringe flow-injection system for the determination and speciation analysis of iron using chelating disks in water samples. *Analytica Chimica Acta* 524, 79-88.

Pons, C., Forteza, R., Cerdà, V., **2005**. The use of anion-exchange disks in an optrode coupled to a multi-syringe flow-injection system for the determination and speciation analysis of iron in natural water samples. *Talanta* 66, 210-217.

Poole, C.F., **2000**. Solid-Phase Extraction with Discs. In *Encyclopedia of Separation Science* (Eds.: Wilson, I.; Poole, C.; Cooke, M.). (Amsterdam) Academic Press (Elsevier) pp. 4141-4148.

Poole, C.F., **2003**. New trends in solid-phase extraction. *Trends in Analytical Chemistry* 22, 362-373.

Raimundo Jr, I.M., Narayanaswamy, R., **2003**. Simultaneous determination of Zn(II), Cd(II) and Hg(II) in water. *Sensors and Actuators, B* 90, 189-197.

Rodríguez-Mozaz, S., Farré, M., Barceló, D., **2005**. Screening water for pollutants: A selective report on the 1st focused workshop (validation of robustness of sensors and bioassays for screening pollutants) of the SWIFT-WFD project held in Maó, Menorca (Balearic Islands), Spain, 2 and 3 December 2004. *Trends in Analytical Chemistry* 24, 165-169.

STATISTICA (data analysis software system) version 7 (**2004**, Statsoft, Inc. USA)

Steiner, S.A., Porter, M.D., Fritz, J.S., **2006**. Ultrafast concentration and speciation of chromium(III) and (VI). *Journal of Chromatography A* 1118, 62-67.

Varney, M.S., **2000**. *Chemical Sensors in Oceanography*. Ocean Science and Technology (A series of books in oceanography, Volume 1) (Amsterdam) Gordon and Breach Science Publishers.

Anexos Parte B

Anexo B.1: Equipos instrumentales empleados

Anexo B.2: Reactivos y disoluciones empleadas en Capítulo 5

Anexo B.3: Material y disoluciones empleadas en Capítulo 6

Anexo B.1: Equipos instrumentales empleados

- Un espectrofotómetro Shimadzu UV-2400 PC (Tokio, Japón) fue usado para registrar la absorbancia en las disoluciones usando una celda de 1,0-cm de ancho (Fig. B.1.1).



Figura B.1.1. Espectrómetro UV-Vis 2400 Shimadzu

- Las medidas de fluorescencia de las muestras fueron registradas empleando un espectrómetro de Luminiscencia LS 55 Perkin Elmer (Waltham, USA) (Fig. B.1.2) con pasos de luz de excitación y emisión de 10 y 20 nm, respectivamente. Todos los datos digitalizados obtenidos fueron procesados usando el programa Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft).

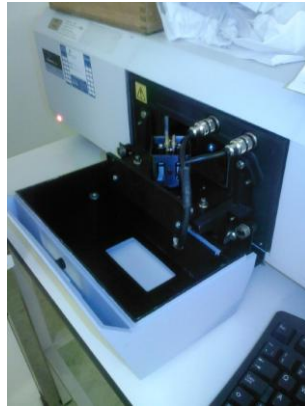


Figura B.1.2. Espectrómetro de Luminiscencia LS 55 Perkin Elmer

- Para las medidas de reflectancia se empleó el programa SpectraWin 4.2(c) 2000 Top Sensor Systems empleando una sonda FCR-14IR200-2-45-Ref 0006061.

- Para la determinación de metales tras la elución en extracción en fase sólida convencional se empleó un espectrofotómetro de absorción atómica, SolaarM, Unicam (Reino Unido).

- Las medidas de pH fueron realizadas mediante un pH-metro Hanna Turtle (Bedfordshire, Reino Unido). Y otro modelo de pH-metro 2001 equipado con un electrodo combinado de vidrio-Ag/AgCl (Crison, España).

Anexo B.2: Reactivos y disoluciones empleadas en Capítulo 5

Todos los reactivos fueron de grado analítico, comprados y empleados sin una purificación posterior. Todas las disoluciones fueron preparadas con agua destilada desionizada o etanol absoluto.

- El reactivo orgánico empleado 2-HBBH fue sintetizado de acuerdo con la reacción entre 2-hidroxibenzaldehído (2-HB) y benzoilhidracida (BH) de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania) (ver Anexos Parte A). Las disoluciones de 2-HBBH en etanol fueron preparadas y almacenadas bajo 4°C en oscuridad cuando no se usaban.

a) Disoluciones reguladoras de pH:

Se emplearon dos reguladoras diferentes para los estudios realizados:

- Por un lado, el tampón comercial Hydrion, que se prepara disolviendo el contenido de cada uno de los sobres que suministra la casa comercial (Sigma-Aldrich) con diferentes valores de pH (3–11) en 500 mL de agua destilada y desionizada.

- Por otro lado, la reguladora de hidrógeno ftalato de potasio preparada usando dos mezclas de sales: hidrógeno ftalato de potasio (PHP) y Borax (todos de Aldrich) ajustando posteriormente el pH con ácido clorhídrico (HCl, 37%) (de Fisher) y amoníaco (NH₃, 33%) (de AnalaR).

- El medio neutro seleccionado como óptimo para las medidas de fluorescencia fue obtenido mediante la adición de disolución reguladora de fosfato. Ésta fue preparada usando dihidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4) 0,5 M (Kluka) ajustando a pH 7 con NaOH 1 M (Merck).

b) Disoluciones de metales:

- Las disoluciones de Cu(II) y el resto de metales estudiados fueron preparadas semanalmente mediante dilución de una disolución estándar de 1000 mg L^{-1} (Merck, Darmstadt, Alemania) en HNO_3 0,06 M.

- Las sales de nitrato de hierro (III), cloruro potásico, cloruro de sodio, acetato de zinc, cloruro cálcico, nitrato de plomo (II), cloruro de cadmio, cloruro de magnesio y sulfato potásico de aluminio, ácido etilendiamino tetraacético (AEDT) y ácido ascórbico fueron suministradas por Sigma-Aldrich, Fluka y AnalaR.

Anexo B.3: Material y disoluciones empleadas en Capítulo 6

a) Material empleado:

- Para la extracción en fase sólida convencional se ha empleado un sistema de filtración standard Millipore 47 mm.

- Para la extracción en fase sólida colorimétrica se ha empleado un sistema de filtración Swinnex Filter Holder, 13 mm (Millipore) (Ver tabla B.3.1).

Tabla B.3.1. Características del sistema de filtración 13 mm (Millipore)

Descripción	Swinnex Filter Holder. 13 mm
Marca	Swinnex
Diámetro (cm)	1,7
Diámetro del filtro (mm)	13
Área de filtración (cm^2)	0,7
Material de construcción	Polipropileno

- Las membranas de extracción empleadas han sido discos de poliestireno divinilbenceno de 3M (Empore) de 47 mm cortadas posteriormente a 13 mm con un sacabocados de este diámetro.

b) Disoluciones empleadas:

- Además de la disolución reguladora Hydrion se emplearon otros tampones diferentes para controlar el pH de las muestras: 0,5 M HEPES preparada a partir de N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etano ácido sulfónico (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) y amoníaco suprapur (Merck, Darmstadt, Germany); 0,05 M PIPES a partir de piperazina-N,N'-bis(ácido etanosulfónico) y amoníaco suprapur (Merck, Darmstadt, Germany); 1 M de amoníaco suprapur (Merck, Darmstadt, Germany) y 1 M de ácido nítrico suprapur (Merck, Darmstadt, Germany); y 0,5 M de dihidrógeno fosfato de potasio (Fluka) ajustando el pH con hidróxido de sodio 1 M (Merck).

- Las disoluciones de Cu(II) y el resto de metales evaluados fueron preparadas semanalmente mediante dilución de una solución estándar de 1000 mg L⁻¹ (Merck, Darmstadt, Alemania) en HNO₃ 0,06 M.

- Las sales empleadas para el estudio de las interferencias fueron: cloruro sódico, fluoruro sódico, cloruro de magnesio hexahidratado, sulfato sódico, cloruro potásico, bicarbonato sódico, ácido bórico, bromuro potásico y cloruro de estroncio hexahidratado. Todas de calidad para análisis o suprapur.

Conclusiones generales

Conclusiones generales:

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos de la investigación llevada a cabo en esta Tesis, se pueden enumerar como principales conclusiones las que se muestran a continuación:

1) Se ha desarrollado una nueva metodología para el análisis de plomo en muestras de agua mediante AdCSV basada en la complejación con 2-APSH. Para el estudio de las condiciones óptimas para la determinación de Pb(II) se ha realizado una estrategia estadística en tres etapas. El nuevo método proporciona un gran número de ventajas tales como buen límite de detección, encontrándose por debajo de los publicados en este campo. También presenta un amplio rango lineal de trabajo así como aplicable a muestras de agua con matriz salina, ya sea agua de mar o de estuario. Es de destacar como al trabajar con las condiciones óptimas estudiadas, se ha observado la aparición en el voltamperograma de señales para otros metales tales como Zn(II), Ni(II) y V(V) que también reaccionan con la 2-APSH.

Por lo tanto, mediante futuros estudios se puede explorar el empleo de este ligando orgánico en AdCSV para el análisis de metales de manera simultánea.

2) Se ha evaluado la aplicabilidad de la 2-HBBH en la determinación de trazas metálicas en aguas naturales mediante AdCSV. Se ha comprobado como la adición de este ligando ofrece una buena alternativa para el análisis individual de cobre, plomo, cadmio y bismuto, con una alta sensibilidad, simplicidad y rapidez de los análisis. Además, puede ser desarrollada la determinación simultánea de los grupos de elementos formados por Cd(II)-Pb(II)-Cu(II) y Cd(II)-Pb(II)-Bi(III) en unos pocos minutos. El método fue aplicado de manera satisfactoria a la determinación simultánea de metales en aguas de referencia certificadas y en muestras de agua sintéticas. Son de destacar la buena resolución, las altas sensibilidades y la reproducibilidad obtenidas en este trabajo.

3) Se ha estudiado la capacidad que tiene la base de Schiff 2-HBBH para ser aplicada como molécula quimiosensora fluorescente (indicador) de iones Cu(II). La complejación con cobre induce una fuerte atenuación de la fluorescencia del

reactivo 2-HBBH. Se ha empleado una relación de Ster-Volmer modificada para el estudio de la curva de calibrado obteniendo un amplio rango lineal de aplicación. El sensor fluorescente presenta por otro lado una gran selectividad hacia el cobre sobre otros iones metálicos. Los resultados de esta investigación muestran un método sencillo, rápido, de bajo coste y muy selectivo, que puede operar en disoluciones neutras y útil por lo tanto en aplicaciones biológicas y medioambientales.

Los estudios dentro de este campo continúan presentando un creciente interés.

4) Por último, se ha desarrollado un sensor químico de fibra óptica sencillo y de bajo coste para el análisis de cobre en muestras de agua. Este nuevo método fue llevado a cabo mediante la miniaturización de un sistema convencional de extracción en fase sólida. Esta metodología se basa en la retención de iones Cu^{2+} sobre membranas SDB modificadas por una aroilhidrazona. Se evaluaron las variables más significativas que afectan a la respuesta del sistema para llevar a cabo la determinación de este ion metálico. No se observó interferencia de sales inorgánicas pudiendo ser aplicado a muestras acuosas salinas.

La combinación de SPE empleando discos de membrana modificados con alguna forma óptica de medida del analito en la superficie sólida presenta un amplio rango de posibilidades. Es por ello por lo que varios estudios están siendo llevados a cabo en nuestros laboratorios siguiendo esta línea de investigación.

Se puede concluir diciendo que la investigación llevada a cabo en esta Tesis ha dado lugar a métodos con diferentes selectividades y límites de detección, pudiendo atender de esta forma a las distintas necesidades analíticas que se pueden plantear en la Química Analítica Medioambiental de metales pesados en muestras acuosas.

The page features two horizontal decorative lines. The top line is composed of a thin orange line on top, a light blue segment in the middle, and a teal segment on the bottom. The bottom line is a solid teal line with a thin orange line on top. The text 'English summary' is centered between these lines.

English summary

*“Safe drinking water and adequate sanitation
are crucial for poverty reduction,
crucial for sustainable development,
and crucial for achieving any and every one
of the Millennium Development Goals”.*

*Ban Ki-moon
Secretary-General of the United Nations*

Contents

Acronyms and abbreviations & Publications

Introduction and objectives

Theoretical fundamentals

Chapter 1: Stripping voltammetry

Chapter 2: Sensitive adsorptive stripping voltammetric method for determination of lead in water using multivariate analysis for optimisation

Chapter 3: Applicability of 2-hydroxybenzaldehyde benzoylhydrazone in the determination of trace metals by adsorptive cathodic stripping voltammetry: Relevancy of simultaneous determinations

Chapter 4: Optical sensors

Chapter 5: Selective chemosensor for copper ions based on fluorescence quenching of a Schiff-base fluorophore

Chapter 6: Optical fibre Cu(II) sensor based on colorimetric-solid phase extraction using SDB disks modified with 2-HBBH

Conclusions

References

Acronyms and abbreviations

AdCSV: Adsorptive cathodic stripping voltammetry
2-APSH: 2-acetylpyridine salicyloylhydrazone
ASV: Anodic stripping voltammetry
C-SPE: Colorimetric solid phase extraction
CSV: Cathodic stripping voltammetry
FAAS: Flame atomic absorption spectrometry
2-HBBH: 2-hydroxybenzaldehyde benzoylhydrazone
HMDE: Hanging mercury drop electrode
ICP-MS: Inductively coupled plasma mass spectroscopy
NAA: Neutron activation analysis
SDB: Poly(styrene-divinylbenzene) copolymer
SPE: Solid phase extraction

Publications This Thesis is based on the following original papers:

1. Espada-Bellido, E., Galindo-Riaño, M.D., García-Vargas, M. **2009**. Sensitive adsorptive stripping voltammetric method for determination of lead in water using multivariate analysis for optimisation. *Journal of Hazardous Materials* 166, 1326-1331.
2. Espada-Bellido, E., Galindo-Riaño, M.D., Aouarram, A., García-Vargas, M. **2009**. Applicability of 2-Hydroxybenzaldehyde benzoylhydrazone in the determination of trace metals by adsorptive cathodic stripping voltammetry: Relevancy of simultaneous determinations. *Analytical Sciences* 25, 903-909.
3. Espada-Bellido, E., Galindo-Riaño, M.D., García-Vargas, M., Narayanaswamy, R. **2010**. Selective chemosensor for copper ions based on fluorescence quenching of a Schiff-base fluorophore. *Applied Spectroscopy* 64 (7) xxx-xxx
4. Espada-Bellido, E., Galindo-Riaño, M.D., García-Vargas, M., Narayanaswamy, R. Optical fibre Cu(II) sensor based on colorimetric-solid phase extraction using SDB disks modified with 2-HBBH (In preparation).

Introduction and Objectives

In recent years, persistent and toxic substances are increasing in the environment due to anthropogenic activities. Coast areas are of high priority because they are very sensitive ecosystems. Several International Organisms, as well as plenty of researchers, are very concerned about the negative consequences that the increasing population will produce in the near future. Particularly, the monitoring of low levels of heavy metals in the environment has received much attention last years. Such elements cannot be degraded or destroyed and tend to concentrate in most of the aquatic matrices of the environment being included in the food chain causing severe deleterious effects on human [Berkowitz, 2008].

Therefore, the main objective of the present Doctoral Thesis is the development of new analytical methodologies to quantify heavy metals of environmental concern.

In order to achieve the general aim, the following specific objectives have been followed:

- 1) Development of new suitable systems for determining trace levels of metal ions in natural water, either saline matrices or river and lake water.
- 2) Optimisation of the chemical and instrumental variables of the system.
- 3) Determination of the analytical performance characteristics of the method such as calibration graph, detection limit and repeatability of the method evaluated through the relative standard deviation.
- 4) Due to the possible interference by matrix of water samples, interference studies are needed.
- 5) In order to demonstrate the suitability of the new method, its application to evaluate its accuracy and/or the comparison with other methods in order to find its advantages, will be given.

To accomplish the objectives, two different techniques have been employed in this research work. On one hand, adsorptive cathodic stripping voltammetry (AdCSV) with good selectivity and sensitivity, and good performance with saline matrices like seawater, river water or estuarine water samples. On the other hand, the development of optical sensors, which can be

portable, small in size, cost-effective, highly selective, and suitable for *in-situ* and on-line detection, was studied.

Both techniques are based on the formation of a complex between the metal ion and an organic reagent. Hydrazones have shown attractive potentialities for its application to these techniques because of their donor properties in coordinating metals and their ability to behave as polydentate ligands.

Hence, the present Doctoral Thesis has been divided in two different parts: Part A and Part B.

Part A is formed of Chapters 1, 2 and 3, and part B consists of Chapters 4, 5 and 6.

In the **Part A**, the development of new methodologies employing stripping voltammetry is carried out.

Chapter 1 shows an overview of the theoretical fundamentals related to this methodology.

Chapter 2 presents a new sensitive method for the determination of lead employing 2-APSH as organic reagent.

And the applicability of another aroylhydrazone, 2-HBBH, in order to carry out simultaneous analysis of mixtures of heavy metals is described in **Chapter 3**.

On the contrary, **Part B** consists of the development of new methodologies employing optical sensors.

Within the **Chapter 4** a revision of the fundamental aspects about optical sensing technology is given.

Chapter 5 provides useful information of solution studies focused on the efficiency of a selective chemosensor for copper ions based on fluorescence quenching of a Schiff-base fluorophore.

Finally, in **Chapter 6**, the design of a novel optical fibre Cu(II) sensor employing colorimetric solid phase extraction and SDB disks modified with 2-HBBH is described.

Theoretical fundamentals

Water, which covers two-thirds of the earth's surface, is a key resource for our quality of life. Water (available from seas, oceans, rivers, underground ways and rainfall) is essential to man, as it is to all living beings and the atmospheric environment. Water is also crucial to agriculture and economy and dictates the location of many industrial facilities. Water is employed in vast amounts for a wide variety of purposes including energy production, irrigation, refrigeration and washing [Pérez-Bendito, 1999].

However, the ocean was, and still is, used as a waste-disposal site. The rationale has been that the ocean is vast enough to accommodate our waste without undergoing an unacceptable amount of change. This view has been based on the assumption that any potentially toxic wastes would be diluted to innocuous levels and carried by currents far from our coastlines [Libes, 1992]. Although this may have been true in the past, the assimilative capacity of the coastal ocean appears to have been exceeded affecting the biodiversity of thousands of kilometers of waterways only in Europe, polluting coastal and marine waters [European Environment Agency].

Heavy metals are regarded as a very serious threat because of their persistence and harmful effects [Clark, 2001]. Due to their toxicity, even at low concentrations, lead, cadmium, arsenic, mercury, aluminium or chromium are key elements, while metals such as copper, nickel, selenium, cobalt, bismuth or zinc in trace amounts, are essential to all organisms, to accomplish specific catalytic functions. However, the same metal becomes toxic when it is released into the environment in sufficient quantities to constitute a risk to human health. At levels exceeding the nutritional requirements, all metals can disturb the metabolism by binding non-specifically to biomolecules and inflicting oxidative damage, due to their ability to catalyze redox reactions. This can result in the deactivation of essential enzymatic reactions, damage to cellular structures and DNA modification. What is more, in humans, exposure to high levels of metals can cause acute toxicity symptoms, while long-term exposure to lower levels can trigger allergies and even cancers [Berkowitz, 2008; Förstner, 1979; Namiesnik, 2010].

For this reason, sites contaminated with heavy metals must be monitored regularly.

Because of national, European and international legislation are reducing the allowable concentration of metals in the environment up to trace levels, accurate measurements of these elements represents an important task of modern analytical chemistry [Brown, 2005].

Therefore, several methods have already been developed for the determination of metals. We can quote analytical techniques like neutron activation analysis (NAA) or X-ray fluorescence analysis, which provide very low detection limits. But the most widely used for this purpose are those methods based on atomic absorption and emission spectroscopy which are particularly sensitive. In the same sense, inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) has high sensitivity and wide linear dynamic range [Rahmi, 2007].

Nevertheless, several problems occur in such techniques due to the important interference effects of dissolved salts and polyatomic interferences for water samples with an elevated saline content, as seawater [Komjarova, 2006], being a preconcentration/separation step almost always required [Soylak, 2005; Saracoglu, 2006]. Removing the saline matrix before analysis consumes a lot of time and it is not suitable for routine analysis. In addition, over manipulation can increase sample contamination. Moreover, X-ray methods and activation analysis are expensive and have a relatively throughput. Besides, there is no speciation or chemical state data produced from atomic spectrometric techniques, only total element concentration, unless it is coupled with a chromatographic process [Brown, 2005]. Moreover, the instrumentation is too big to carry out *in-situ* analysis.

By contrast, stripping analysis is the best-known analytical method that incorporates an electrolytic preconcentration step which represents an efficient way for the enrichment and isolation of trace components. In recent years, stripping voltammetry techniques, particularly adsorptive cathodic stripping voltammetry (AdCSV), has shown numerous advantages, including speed of analysis, good selectivity, extremely low detection limits (10^{-10} - 10^{-11} M), low costs of instrumentation compared with other techniques, suitability for on-line and *in-situ* measurements, as well as good performance with saline matrices like seawater and estuarine water samples, the possibility of simultaneous analysis of mixtures and the analysis of the oxidation state of the elements [Kissinger, 1996].

At the same time, it is important to point out that laboratories devoted to determining the state of environmental pollution, as well as the analytical chemists applying them may, ironically, be the source of large amounts of pollutants entering the environment. The traditional analytical procedures require considerable quantities of chemical compounds and frequently involves the formation of large amounts of pollutants during the preparation of the samples. Consequently, analytical chemists strive for the traditional goals of accuracy, precision, sensitivity, and low detection limits; but by incorporating green chemistry rules in laboratory practice. The general strategy involves not only reducing the amounts of chemicals used, but also the miniaturisation and even the elimination of sampling by measuring the analytes of interest *in-situ*, in real time and on-line [Namiesnik, 2010; Curylo, 2007]. For this reason, small in size techniques capable of being used where the real problem is, are really needed.

The field of chemical sensors presents many advantages such as simplicity, geometrically flexible, small size, short sampling time, stability, easy to maintain, low cost, etc. They are capable of being miniaturised, can operate in remote and hostile environments and can deliver real time and on-line information on the presence of specific compounds in complex samples. Moreover, with the use of optical fibre, the light beam is guided out of the spectrophotometer allowing the location of the measuring instrumentation at a distance and electrically isolated from the sensing area.

The use of measurement devices such as sensors have made an important contribution to *in-situ* pollution monitoring allowing the analyst to bring the laboratory to the sample instead of the sample to the laboratory [Cámara, 1995].

Due to the numerous applications in industry, diagnostic and environment, the field of optical chemical sensors has received much attention over the last decade [Narayanaswamy, 2004; Varney, 2000; McDonagh, 2008; Gangaiya, 2008].

Chapter 1: Stripping Voltammetry

Stripping techniques are based on the measurement of a current response as a function of the potential applied to a voltammetric cell. They involve three steps: a preconcentration step in which the analyte is accumulated onto or into the working electrode, then a quiet time, and finally a stripping step in which the accumulated material is oxidized (ASV) or reduced (CSV) back into the solution (Fig. E.1). The observed current response recorded during this third step is proportional to the concentration of that analyte in the sample solution [Kissinger, 1996; Buffle, 2005]. The basic instrumentation for cathodic stripping voltammetry (CSV) consists of a potentiostat, a three-electrode cell (working electrode, reference electrode, and counter-electrode), and a computer for automated measurements and data acquisition [Achterberg, 2005].

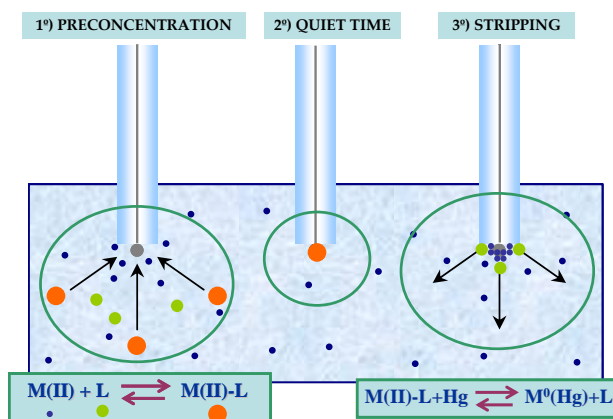


Figure E.1. Steps in the analysis for AdCSV

Mercury is the most commonly working electrode used for these determinations because it can be exchanged between experiments providing a clean, reproducible surface for each determination, it provides access to a wider range of potentials than other electrode surfaces and finally, it allows the element in question to be absorbed within the mercury, forming an amalgam, rather than just adsorbing to the surface [Brown, 2005].

The electrochemical preconcentration employing the adsorption process of the complex between a proper ligand and the target metal ion into the mercury working electrode, has been the stripping voltammetric technique studied in the first part of this Thesis (AdCSV). The development of AdCSV methods shows attractive potentialities for its application to analysis of trace and ultratrace metal in water for many reasons: the determination of trace metals is achieved with higher levels of sensitivity than ASV, the formation of intermetallic compounds at the mercury electrode is also avoided and it allows speciation studies based on ligand competition [Espada-Bellido, 2009a].

Several complexing reagents have been studied for the adsorption of the complex on the electrode, but it is still necessary to study the applicability of new ligands that may increase the sensitivity and selectivity of trace metal ion determinations.

Hydrazones are important chelating agents widely employed for spectrophotometric or fluorimetric determination of metals [Liu, 2006], being good analytical reagents owing to their metallochromic properties [Zidan, 2003]. They also have interesting donor properties in coordinating metals and a great ability to behave as polydentate ligands in neutral and deprotonated forms. Therefore, they can be applied in the determination of heavy metals by employing AdCSV [Jurado-González, 2003; Espada-Bellido, 2009a; Espada-Bellido, 2009b].

2-APSH and 2-HBBH (Fig. E.2) are aroylhydrazones characterized by the presence of the triatomic group C=N-N, forming coordination compounds with transition metal ions, being noteworthy for their remarkable versatility as chelating agents [García-Vargas, 1987; Hidalgo, 1991]. However, the complexation capacity of these reagents in the presence of metal ions for the potential use in metal determination by AdCSV has been rarely reported. Since, they were selected as the complexing reagents for our research works.

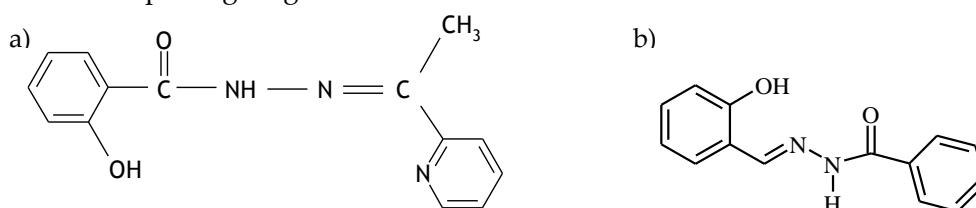


Figure E.2. Hydrazones employed in this Thesis: a) 2-APSH and b) 2-HBBH

Chapter 2: Sensitive adsorptive stripping voltammetric method for determination of lead in water using multivariate analysis for optimisation

Determination of lead has been of continuous research interest due to its toxicity to the environment and biological livings. Humans are exposed to lead from different sources, such as paint, gasoline, and solder, and through different pathways such as air, food, water, dust, and soil. Lead strongly affects the mental and physical development of children. This metal interferes with synthesis of red blood cells and causes anemia, kidney damage, impaired reproduction function, interference with vitamin D metabolism, and delayed neurological and physical development. For adult men, high blood lead can cause elevated blood pressure, hypertension, strokes, and heart attack. Pregnant women exposed to lead are at risk of complications in their pregnancies, shorter gestational period, and damage to the fetus [Berkowitz, 2008].

In waters, lead concentrations are found at nanomolar levels and a preconcentration step is needed before performing determination. In this study, a new differential pulse adsorptive cathodic stripping voltammetric method for the direct determination of lead in saline waters based on metal complexation with 2-APSH is presented. It was observed that the solution containing the metal ion without reagent showed a small peak current and with the addition of 2-APSH to Pb(II) solution, a larger stripping peak was registered showing the adsorptive characteristics of the complex. Therefore, the sensitivity for lead was found to be improved by the addition of the organic reagent.

First of all, *Job's method and mole-ratio method* were applied to study the stoichiometry of the complex formed during AdCSV process. For both of them, the lead/ligand ratio obtained was 1:1.

The *optimisation of the method* was achieved following a strategy study based on three stages: first, a set of preliminary experiments in order to help to establish the ranges of critical variables; second, a factorial design to make a

selection of the variables considered more significant; and third, a subsequent modified simplex method to locate the optimum conditions for lead analysis.

For the *Plackett-Burman design*, six variables including both chemical and instrumental were chosen, taking into account the preliminary experiments for the selection of the intervals (Table E.1). The variables were represented at three levels, low, medium and high, denoted by (-1), (0), (+1), respectively.

Table E.1. Initial variables for Plackett-Burman design

Variables	Levels (-1; 0; +1)
pH	(6; 7; 8)
Ed: Deposition voltage (V)	(-0.25; -0.35; -0.45)
ta: Deposition time (s)	(60, 90, 120)
P: Pulse amplitude (V)	(-0.04; -0.07; -0.1)
Us: Voltage step (V)	(0.004; 0.008; 0.012)
ts: Time interval for voltage step (s)	(0.2; 0.6; 1)

After applying a matrix with six codified variables in eleven experiments with three repetitions of the central point and two replicates for each experiment, the analysis of the effects was evaluated (Table E.2).

Table E.2. Analysis of the effects

Variables	Analysis of the effects
pH	---
P	+++
ts	---
Us	--
ta	+++
Ed	+++

As a consequence of the design results, it was determined that all the variables were significant in the system but to simplify the following design, pulse amplitude was set at maximum equipment value (-0.1 V) and 120 s was selected as deposition time for not having a very long analysis time but is still a high value.

Finally, a *modified simplex* was carried out to establish the optimum values of the rest of the variables: pH, deposition voltage, voltage step and time interval for voltage step. The initial intervals for each variable were defined following the trends obtained in the previous Plackett-Burman design.

A simplex is a geometric figure defined by a number of points (vertices) equal to one more than the number of variables to optimise. Each point corresponds to an experiment under the conditions to be studied. The method forces the figure to move towards a region where the response is optimum using reflection, expansion and contraction of the figure during the procedure. Sequential vertices were calculated by evaluating two response variables: the enhancement of the Pb(II)-2-APSH complex peak and the improvement of the reproducibility of the signal obtained.

The most important advantage of this method is the possibility of performing the simultaneous optimisation of several response signals, considering the interaction among the variables [Ferreirós, 2006].

The simplex was stopped using the variance criterion which compares the variance of each simplex (five experiments) with the variance of the proposed method by calculating the corresponding F-values [Bayne, 1986].

The variance of the method was obtained from voltammetric signal of five replicates of the experiment number 13, being 1.22. The tabulated F-value for $p=0.5$ was 1.00.

Hence, after 21 experiments (14 simplex), F-value of the simplex was lower than tabulated one (Table E.3). The following values of variables: pH 5.6, -0.552 V as deposition voltage, 0.0083 V for voltage step and 0.87 for time interval for voltage step, were obtained as optimum conditions for further studies.

Table E.3. Experiments, variance and F-value of each simplex

Simplex	Experiments	Variance of the simplex (σ_s) ²	F-value
1	1,2,3,4,5	9.15	7.5
2	1,2,4,5,7	9.23	7.57
3	1,4,5,7,8	8.32	6.82
4	1,4,5,7,8	8.32	6.82
5	4,5,7,8,10	14.50	11.89
6	5,7,8,10,13	21.38	17.52
7	7,8,10,13,14	17.36	14.23
8	7,8,10,13,14	17.36	14.23
9	8,10,13,14,16	8.23	6.75
10	8,10,13,14,16	8.23	6.75
11	10,13,14,16,18	2.85	2.34
12	10,13,14,18,19	1.97	1.61
13	10,13,14,18,19	1.97	1.61
14	10,13,14,19,21	0.55	0.45

The influence of ligand concentration on the stripping peak current of Pb(II)-2-APSH complex was also investigated. The experiment consisted in keeping constant lead concentration and increasing 2-APSH in order to detect the ratio of ligand/metal concentration in which current is kept constant. The obtained results are shown in figure E.3.

Adsorption appears to be enhanced with increasing 2-APSH/Pb ratio, reaching the maximum values ranged from 60:1 to 600:1 ratios. At high ligand concentrations, the current decreases as the concentration of the ligand increased, implying that the activity of the electrode can decrease due to the full coverage of the drop, since the ligand may be adsorbed on the electrode, competing with the metal-ligand complex [Limson, 1997].

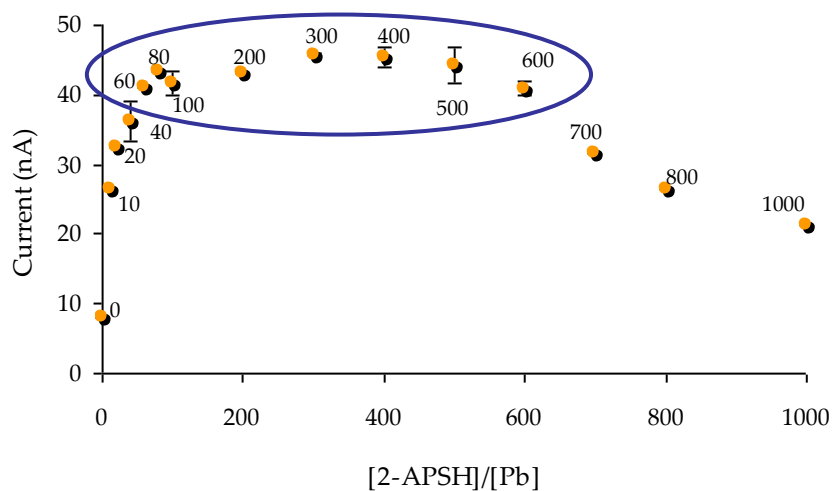


Figure E.3. Influence of ligand concentration on the stripping peak current

Analytical parameters such as linearity, accuracy and repeatability were also investigated under the optimum conditions.

The calibration graph showed linearity over the range of 2.4 to 145 nM with a correlation coefficient of 0.9988 and an equation of the linear regression being $I_p(\text{nA}) = 1.5227 + 1.016 C (\text{nM})$ (Fig. E.4).

The detection limit, calculated according to $DL = 3\sigma/m$ [IUPAC, 1997], where σ is the blank standard deviation and m is the slope of the calibration graph, was found to be 0.17 nM of lead.

The quantification limit (QL), calculated as $QL = 10\sigma/m$ [IUPAC, 1997] was 0.58 nM. By increasing the deposition time these values can be further improved.

The repeatability of the method was evaluated through the relative standard deviation (RSD) of five replicates measurements of a solution containing 17.3 nM of lead. The precision of the method was found to be 1.14 % demonstrating that the method gives very reproducible measurements.

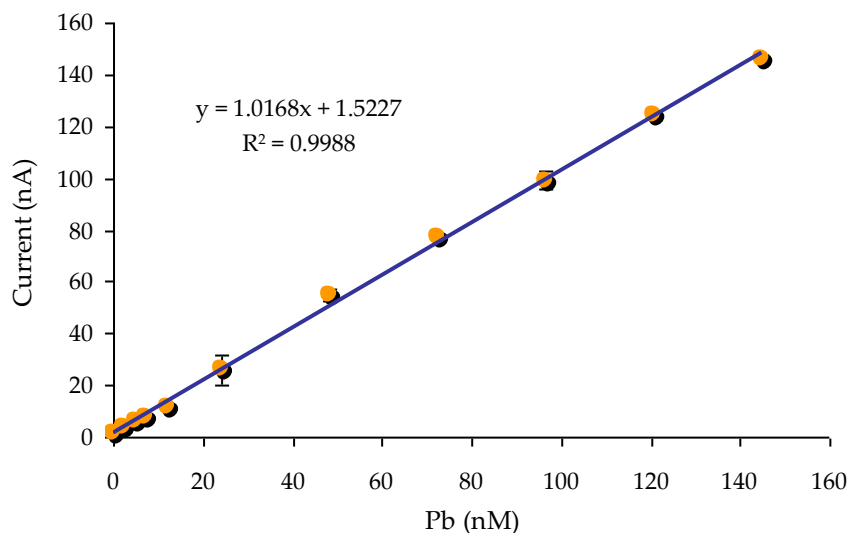


Figure E.4. Calibration graph for Pb(II) at optimum conditions ($n=2$)

Interference study: Because seawater exhibits higher saline concentrations than fresh waters, the different salts found in seawater have been used to study their influence on the determination of lead. In addition, the influence of other trace metals found in seawater has been also evaluated at higher concentrations than usually found in this sample. Neither the salts nor the metals showed interferences for lead determination.

Zn(II), Ni(II) and V(V) produced peaks at -1.00, -0.70 and -0.86 V respectively, presenting the possibility of suitable multi-element analysis with lead using 2-APSH in further works. (Table E.4).

Validation of the proposed method and real seawater sample analysis: The method was validated with certified reference estuarine water (LGC 6016) and certified drinking water (LGC 6011) showing good concordance with the certified values. It was also applied successfully to the analysis of Pb(II) in real seawater samples collected from the southwest coast of Spain (Fig. E.5). The results were compared with those obtained by ASV, a technique very reliable but with less sensibility than AdCSV (Table E.5).

Table E.4. Study of interferences by trace metals for lead determination in solutions containing $21.3 \text{ nM} \pm 2.0 \text{ nM Pb(II)}$

Metal	[Pb(II)] found $\mu\text{g L}^{-1}$	[Pb(II)] found nM	Recovery (%)	U_{Metal} (V)
V(V)	4.378	21.7	101.7	-0.86
Fe(III)	4.503	22.3	104.6	-
Ni(II)	4.540	22.5	105.5	-0.70
Cu(II)	4.198	20.8	97.6	-
Zn(II)	4.475	22.2	104.0	-1.00
Mn(II)	4.163	20.6	96.7	-
Al(III)	4.464	22.1	103.7	-
Cd(II)	4.078	20.2	94.8	-
Bi(III)	4.229	20.9	98.3	
Co(II)	4.701	23.3	109.2	
Pd(II)	4.237	21.0	98.5	
Tl(I)	4.562	22.6	106.0	

Table E.5. Determination of lead by applying the new proposed method to certified reference estuarine waters and real seawater samples

Sample	Pb(II) concentration	Pb found by proposed method	Relative error (%)
LGC 6016	$196 \pm 3 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1\text{a}}$	$191.8 \pm 2.3 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$	-2.15
LGC 6011	$43 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1\text{a}}$	$41.3 \pm 1.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	-3.9
Seawater I	$15.9 \pm 1.0 \text{ nM}^{\text{b}}$ $(3.3 \pm 0.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})^{\text{b}}$	$15.2 \pm 0.2 \text{ nM}$ $(3.14 \pm 0.04 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	-4.40
Seawater II	$21.7 \pm 0.5 \text{ nM}^{\text{b}}$ $(4.5 \pm 0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})^{\text{b}}$	$22.1 \pm 0.2 \text{ nM}$ $(4.57 \pm 0.04 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	+1.84

^a Certified value as $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$; ^b Determination by ASV



Figure E.5. Sampling in the southwest coast of Spain

A comparison study with other AdCSV methods published by different authors in terms of the analytical features [Van den Berg, 1986; Wang, 1993; Wu, 1995; Yokoi, 1995; Colombo, 1997; Fischer, 2001; Ensafi, 2003; Shams, 2004; Ensafi, 2006; Arancibia, 2009] was carried out. It can be concluded that the method proposed in this work presents not only a great sensitivity with low detection limit, a wide linear range of application, and highly reproducible, but it is also acceptable for seawater samples analysis.

As a result, a suitable method for determination of trace amounts of lead in natural water has been presented.

Further studies to explore the use of 2-APSH in AdCSV may lead to a new approach to the simultaneous metals analysis.

*Chapter 3:
Applicability of 2-hydroxybenzaldehyde
benzoylhydrazone in the determination of
trace metals by adsorptive cathodic stripping
voltammetry: Relevancy of simultaneous
determinations*

Due to the great sensitivity enhancement obtained with AdCSV methods, several complexing agents have been studied for the adsorptive collection of complexes, but there are only a few papers reported about simultaneous metal determination [Limson, 1997; Ensafi, 2006; Shams, 2004; Ensafi, 2000]. The most widely encountered interference when a simultaneous analysis is carried out in stripping voltammetry, is the overlapping between stripping peaks of different elements in the sample [Brown, 2005]. Hence, there is a great interest in developing new ligands with adequate complexing properties capable of solving that limitation.

This chapter shows a new method for determining metal ions of environmental concern simultaneously using 2-HBBH as the selective complexing ligand. Different metals such as Cd(II), Pb(II), Cu(II) and Bi(III) produced electrochemical signals by AdCSV with the addition of this reagent to metallic solutions.

These toxic metals are of environmental importance and are of biological interest, as they can be bound to natural ligands. Cadmium is of great toxicological interest because of its unusually half life and accumulation in soft tissues, chiefly in kidneys and liver in association with cadmium binding proteins [Suciu, 2000]. Lead, as aforementioned, is widely distributed in nature and exhibits severe deleterious effects on human. On the other hand, copper and bismuth are important elements as they may play a vital or a toxic role, depending on their concentrations and the nature of the organisms considered.

However, accurate determination of copper and bismuth in the presence of each other is not possible by common electroanalytical methods. Many efforts have been made to resolve overlapped signals in the voltammograms [Khaloo,

2007]. In this work, we can determine Cu(II) in the presence of Bi(III) just by modifying the electrolyte pH.

The present investigation was prompted by a desire to offer not only an alternative method for the simultaneous determination of these four toxic elements but also to resolve the overlapping of signals .

To develop the new method, the optimisation of the most important variable factors affecting the response: *pH, buffer composition, deposition voltage and deposition time*, was carried out by the univariate method.

Effect of pH: The pH was ranged from 2 to 10. The highest intensities showed that the optimum pH to carry out determination of these metals ranged from 6 to 10 using a Britton-Robinson supporting electrolyte. The Bi(III) and Cd(II) peaks were not detected below pH 6 and 4, respectively. The peaks obtained were well resolved in the wide range of pH values. Only Cu(II) and Bi(III) seemed to overlap.

Effect of supporting electrolyte: In order to determine if the composition of electrolyte could affect the voltammetry signal, different buffers were tested obtaining the best currents with NH₄Cl/NH₃. Taking into account the results, individual detection for cadmium, lead, copper and bismuth, could be developed at pH 10, 9, 9.5 and 8, respectively. Also, simultaneous determination of the two groups of elements consisting of Cd(II)-Pb(II)-Cu(II) and Cd(II)-Pb(II)-Bi(III) could be carried out using an intermediate pH among the optimum conditions of metals, being pH 9.5 and 9, respectively. On the other hand, the analysis of Cu(II) without Bi(III) interference, could be performed at pH 4 because the bismuth peak disappears at that pH in acetate buffer (Fig. E.6).

Effect of deposition voltage: E_d was also studied to improve the intensity of the peaks and to get a better separation of the Cu(II) and Bi(III) peaks. No significant variations of peak currents were found for Pb(II) at pH 9.5 and for Cd(II) at pH 9 at different deposition voltages. For Cu(II) and Cd(II) at pH 9.5 and for Bi(III) and Pb(II) at pH 9, intensities increased to -0.8 V deposition voltage.

After this study, -0.8 V was chosen as deposition voltage for further experiments (Table. E.6).

Effect of deposition time: It was varied from 30 to 180 s. For Pb(II), Cd(II) and Bi(III), peak current increased with the preconcentration time up to 120-150 s. In the case of Cu(II), it continued increasing. Thus, for further procedures, 120 s was chosen as deposition time to avoid long analysis times. In any case, the Cu peak current can be enhanced by using a longer deposition time (Fig. E.7).

Under the optimum conditions, *linear ranges, detection limits and relative standard deviations (RSD) for individual determinations* were obtained (Tables E.7 and E.8).

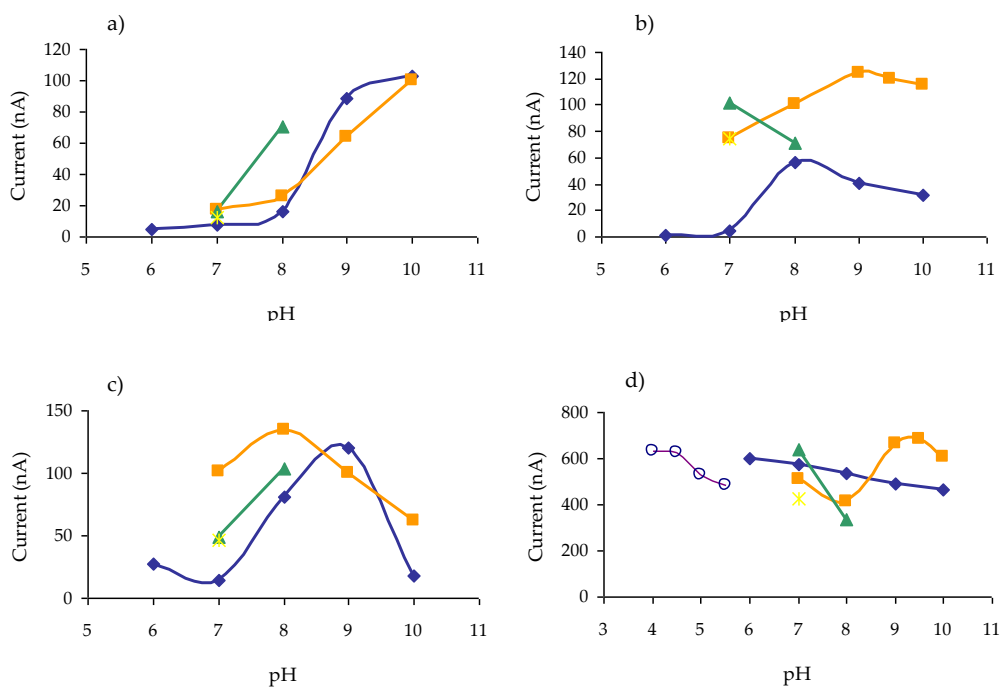


Figure E.6. Influence of composition of supporting electrolyte on the peak current for: a) Cd(II), b) Pb(II), c) Bi(III) and d) Cu(II), containing: $5.48 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ 2-HBBH, $5 \mu\text{g L}^{-1}$ metal and different buffers. Buffer solutions used: (◆) 0.12 mol L^{-1} Britton-Robinson buffer; (■) 0.3 mol L^{-1} $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$; (○) 0.3 mol L^{-1} acetic acid/sodium acetate; (▲) 0.01 mol L^{-1} HEPES; and (✱) 0.01 mol L^{-1} PIPES.

Table E.6. Effect of deposition voltage for $5 \mu\text{g L}^{-1}$ of metal at pH 9.5 and pH 9

pH 9.5			
E_d/V	-1.0	-0.8	-0.6
I_{Cu}/nA	645	680.8	513.3
(E_p/V)	(-0.455)	(-0.456)	(-0.455)
I_{Pb}/nA	126.6	127.6	123.3
(E_p/V)	(-0.557)	(-0.574)	(-0.574)
I_{Cd}/nA	67.3	109.1	2.8
(E_p/V)	(-0.693)	(-0.693)	(-0.693)
pH 9			
E_d/V	-1.0	-0.8	-0.6
I_{Bi}/nA	135.8	142.35	77.8
(E_p/V)	(-0.405)	(-0.405)	(-0.405)
I_{Pb}/nA	86.2	113.9	52.2
(E_p/V)	(-0.557)	(-0.557)	(-0.557)
I_{Cd}/nA	68.7	66.7	No peak
(E_p/V)	(-0.659)	(-0.660)	

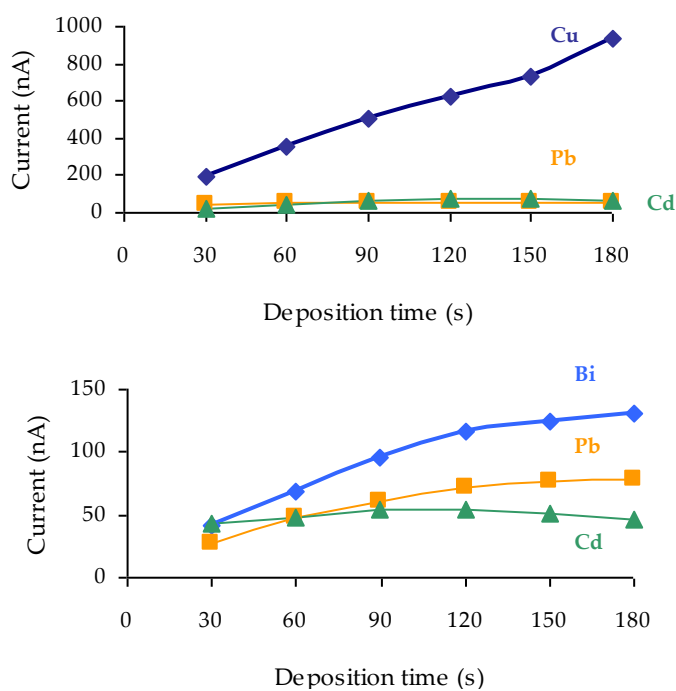


Figure E.7. Influence of deposition time for simultaneous analysis

Table E.7. Analytical performance characteristics for individual analysis of Cd(II), Pb(II), Bi(III) and Cu(II)

Parameter	Metal	pH ^a	Slope (nA μg^{-1} L)	Intercept (nA)	R ²	Linear range ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Detection limit ^b ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Individual analysis	Cd(II)	10	14.77	-0.92	0.994	0.5 - 10	0.280
	Pb(II)	9	34.74	+9.415	0.999	0.5 - 10	0.026
	Bi(III)	8	23.09	+17.74	0.995	0.5 - 10	0.285
	Cu(II)	9.5	141.60	+23.92	0.996	0.5 - 10	0.051
	Cu(II)	4	129.49	-1.45	0.998	0.5 - 12	0.038

a. Acid buffer, 0.3 mol L⁻¹ acetic acid/sodium acetate; Basic buffer, 0.3 mol L⁻¹ NH₄Cl/NH₃.

b. Calculated as 3 σ m.

Table E.8. Currents and R.S.D for individual analysis of Cd(II), Pb(II), Bi(III) and Cu(II)

Metal	pH	Current (nA)	R.S.D. (%)
Cd(II)	10	141.5 \pm 6.1	4.28
Pb(II)	9	187.8 \pm 65.6	2.99
Bi(III)	8	185.1 \pm 8.9	4.82
Cu(II)	9.5	717.2 \pm 9.7	1.35

Linear ranges and detection limits were also studied in the case of simultaneous determinations.

Cd(II)-Pb(II)-Cu(II): Three calibration graphs were constructed, for cadmium, lead and copper, by using simultaneous additions of these metal ions at pH 9.5 as the best condition for the electrolyte as shown above. The calibration curves were linear over the range of 0.5 - 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ for cadmium and lead, and over the range of 0.5 - 9 $\mu\text{g L}^{-1}$ for copper with detection limits of 0.107, 0.170 and 0.053 $\mu\text{g L}^{-1}$ for cadmium, lead and copper, respectively (see figures E.8 and E.9).

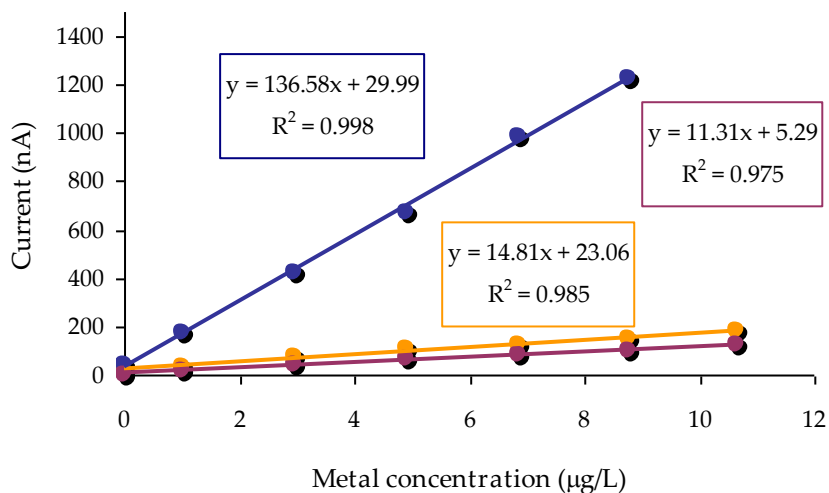


Figure E.8. Calibration curves for simultaneous determination of **Cd(II)**, **Pb(II)** and **Cu(II)** at pH 9.5

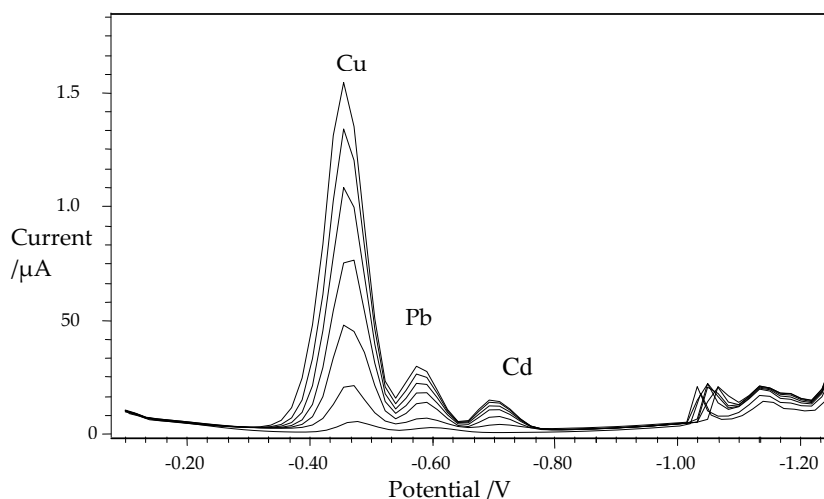


Figure E.9. Voltammograms obtained with the response peaks for **Cd(II)**, **Pb(II)** and **Cu(II)**

Cd(II)-Pb(II)-Bi(III): In the same way, three calibration graphs were constructed for cadmium, lead and bismuth by using simultaneous additions of metal ions at pH 9. The calibration curves were linear over the range of 0.5 - 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ for cadmium and lead and of 0.5 - 14 $\mu\text{g L}^{-1}$ for bismuth with detection limits of 0.032, 0.018 and 0.173 $\mu\text{g L}^{-1}$ for cadmium, lead and bismuth, respectively (See figures E.10 and E.11).

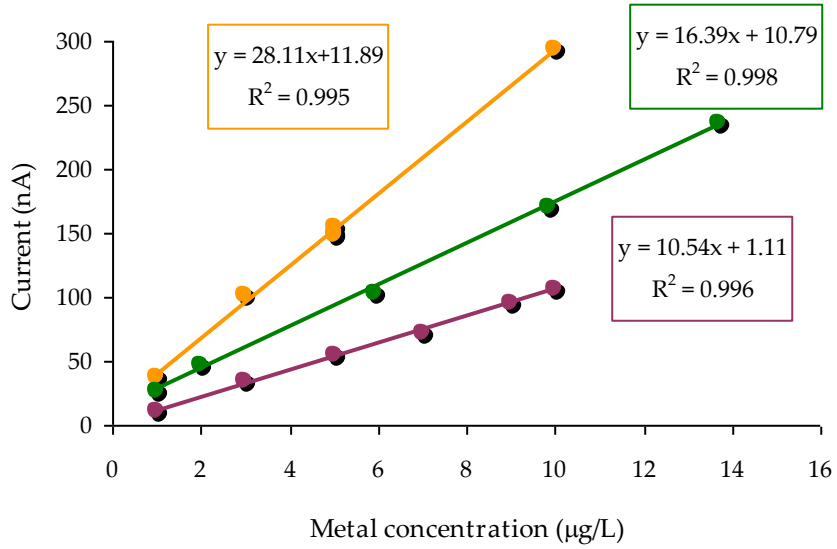


Figure E.10. Calibration curves for simultaneous determination of **Cd(II)**, **Pb(II)** and **Bi(III)** at pH 9

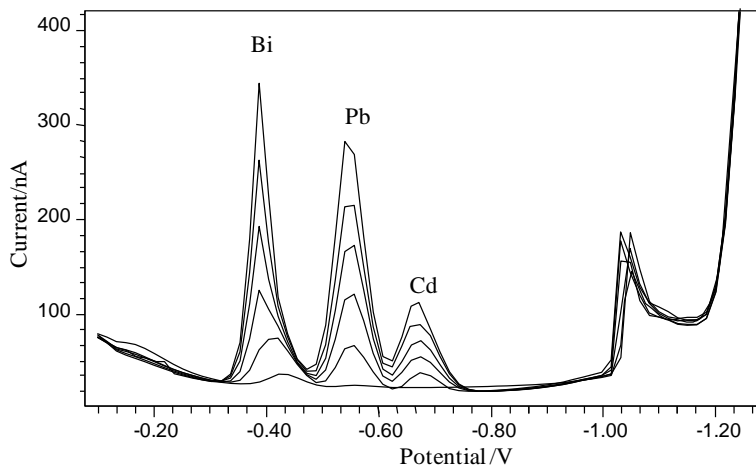


Figure E.11. Voltammograms obtained with the response peaks for **Cd(II)**, **Pb(II)** and **Bi(III)**

Possible interferences by other metals with the cathodic adsorptive stripping voltammetry were investigated by the addition of possible interfering ions. The method was found to be free from interferences of other metals which are able to

form a complex with 2-HBBH, including zinc and nickel. The only detected interference was the determination of copper in the presence of bismuth which was overcome by using the electrolyte acetic acid/ sodium acetate at pH 4.

Application of the method: Apart from the interferences, the accuracy of the analytical procedure was verified by the analysis of a certified reference water from Lake Ontario (TMDA-62) and synthetic spiked samples with satisfactory results showing the successful applicability of the proposed method (Table E.9).

Table E.9. Determination of Cd(II), Pb(II), Cu(II) and Bi(III) in certified reference materials and synthetic samples

Sample	Certified or spiked concentration / $\mu\text{g L}^{-1}$				Found concentration / $\mu\text{g L}^{-1}$			
	Cd(II)	Pb(II)	Cu(II)	Bi(III)	Cd(II)	Pb(II)	Cu(II)	Bi(III)
TMDA-62	89.9 \pm 8.69	98.7 \pm 10.9	106 \pm 10.7	50 ^a	95.1 \pm 4.9	89.3 \pm 7.2	100.6 \pm 1.6	47.8 \pm 7.1
Synthetic sample 1	2.0	1.2	0.8	---	1.84 \pm 0.09	1.71 \pm 0.91	0.78 \pm 0.05	---
Synthetic sample 2	1.0	0.6	---	0.4	1.13 \pm 0.09	0.63 \pm 0.07	---	0.45 \pm 0.04

a: Estimated value

Some organic reagents have been previously described as complexing reagents for the voltammetric determination of copper, cadmium and lead [Van den Berg, 1986; Collado-Sánchez, 1996; Colombo, 1997; Ensafi, 2000; Shams, 2004; Ensafi, 2006] and for determining copper and bismuth in the presence of each other [Hajian, 2003; Gholivand, 2006; Khaloo, 2007]. By comparing the analytical features with the presented method, it can be observed that better detection limits and application ranges are obtained with our method.

As a result, the present study offers an excellent method for the analysis of copper, cadmium, lead and bismuth, presenting advantages such as high sensitivity, high selectivity, simplicity and speed.

Chapter 4: Optical sensors

Conventional methods for measuring toxic heavy metals in aqueous environment are usually time-consuming. In addition, the sample handling and processing steps are labour intensive. Besides, the water sample is often processed days or even weeks after collection, so the addition of some preservatives is necessary for the sample storage. In spite of the care which one collects a sample, the possibility of contamination during sample collection process, sample storage and transportation cannot be neglected [Zuki, 2009].

Thus, one of the best strategies to solve that problem is the development of *in-situ* and real time analysis using environmentally friendly devices highly miniaturised to perform long term-determinations with low electric and reagent consumption [Fukuba, 2005; Clement, 2001].

The field of chemical sensors has attracted growing attention as consequence of being miniaturised devices that can deliver real time and *in-situ* information on the presence of specific analytes. A chemical sensor is a device that transforms the chemical information of the concentration of a specific component into an analytically useful signal [Hulanicki, 1991; Wolfbeis, 2006; Baldini, 2006; Narayanaswamy, 2004; Orellana, 2005].

In general, optical chemical sensors offer significant advantages, including versatility, high sensitivity, selectivity, reusability, cost-effectiveness, immunity to hazardous chemical environment, electrical noise free, small size, and remote detection [Narayanaswamy, 1993]. These numerous advantages have been highlighted by many experts in the field [Varney, 2000; Narayanaswamy, 2004; Baldini, 2006; McDonagh, 2008].

The key component in optical sensors is the chemical transducer which consists of a reagent phase capable of reacting with the target analyte changing one of the optical properties of the system.

Optical fibre chemical sensors or optodes have undergone remarkable development in recent years. In such sensors the chemical transducer contains the optically active reagent which can be immobilised directly on the optical fibre or it

can be immobilised onto an inert stable solid support by physical or chemical methods [Gangaiya, 2008; Narayanaswamy, 2001; Baldini, 1998].

Regarding the principle of optical fibre chemical sensors, light from a suitable source is launched into the optical fibre and guided to a region where it interacts with the immobilised chemical transducer which is analyte specific. This interaction results in a modulation of the optical signal encoded with chemical information, which is guided to a light-measuring system. The optical signal measured can be absorbance, reflectance, luminescence or scattering [Narayanaswamy, 1993].

One of the most attractive features of optical fibre chemical sensors is that they can be easily miniaturised. Optical sensors that make use of polymer membranes containing a reagent which reacts with the analyte to produce a distinctive color change have been well established for the trace analysis of heavy metal ions, among other applications [Gholivand, 2005].

Thus, the main research goal nowadays focuses on finding novel and appropriate reagents (chemosensors) to be used as chemical transducers in these sensors.

Among the different chemosensors, the fluorescence-based ones attract particular interest because of their high selectivity, sensitivity, low-cost, simplicity and versatility [Prodi, 2000; Martínez-Máñez, 2003].

There are three ways of observable change in the fluorescence emission by the fluorophore: fluorescence enhancement, fluorescence quenching and emission shifting [Lakowicz, 2006]. Fluorescence quenching refers to any process that decreases the fluorescence intensity of a sample as the concentration of metal ion increases.

Hence, the second part of the Thesis has been devoted to find a novel and appropriate chemosensor to be used as the chemical transducer. Once the selective reagent has been chosen, the immobilisation onto a suitable polymer support and the design of the optode was carried out. Therefore, a **chemosensor** employing an aroylhydrazone as the selective reagent and fluorescence quenching as the detection system have been employed in chapter 5. Finally in chapter 6, an **optical fibre Cu(II) sensor** was developed by using the same reagent but immobilised onto SDB polymer using fibre optic to guide the light to and from the sensing area.

Chapter 5: Selective chemosensor for copper ions based on fluorescence quenching of a Schiff-base fluorophore

In recent years, the development of chemical sensors for metal ions has been receiving much attention due to their potential applications in many disciplines such as biochemistry, clinical and medical sciences, cell biology, analytical chemistry and environmental sciences [Bargossi, 2000].

In particular, chemosensors for the detection of Cu(II) ions are actively investigated as this metal is not only a significant environmental pollutant but also an essential trace element in various physiological processes [Beltramello, 2001]. A wide range of papers have been published in this area over the last years [Koneswaran, 2008; Wu, 2006; Weng, 2007; Xiang, 2008; Liang, 2007; Kamila, 2007; Aksuner, 2009; Li, 2009]. However, many of the methods suffer from strong interference from other metal ions [Wang, 2007] or they are not applicable in aqueous or other environmentally friendly media such as ethanol [Zhao, 2009]. In addition, most of copper chemosensors need complex and expensive molecules to synthesize the ligand. Hence, the study on new efficient Cu²⁺ fluorescent chemosensors is still necessary.

In the continuous search of selective chelating agents for their use in trace metal analysis, hydrazones have shown promising results for separation and preconcentration of heavy metals. 2-HBBH was selected for our studies because it is one of the most important Schiff bases, which can react with a large variety of transition metal cations [Sazanovich, 2003; Yuan, 2001] and thus, can form a great number of complexes. This ligand has three chelating groups: the hydroxyl of phenol, the nitrogen of azomethine, and the carbonyl of benzoylhydrazine, capable of forming coordination bonds with metallic cations. This reagent was synthesized in our laboratories by simple condensation of the suitable aldehyde and hidrazide. This reagent not only has interesting biological properties, such as, antibacterial and antitumour activity related to the inhibition of DNA synthesis and cell growth, for chemotherapy of iron overload, and as a therapeutic agent

[Chan, 1995; Jhonson, 1982] but also, it is easy to prepare and can be synthesized from cheap starting compounds.

Absorption studies of this novel reagent with different metal ions of environmental concern have been carried out in this work and promising results have been obtained with Cu(II). Moreover, copper indicated that the fluorescence of the ligand is greatly reduced when this metal is present.

To the best of our knowledge, this ligand has been rarely reported as a chromophore or fluorophore based analytical reagent [Lu, 2006; Sreeja, 2005]. Therefore, the main purpose of this work is to develop a highly selective fluorescent chemosensor for the determination of copper(II) based on a Schiff base fluorophore (2-HBBH).

In this chapter, 2-HBBH was optically characterised by UV-Vis absorption spectroscopy and fluorometry.

First, the effect of pH on complex formation was investigated through absorbance measurements by using Hydrion-buffer in the range of 3-11. It can be seen in fig. E.12 that the highest absorbance values were obtained from pH 5 to 8.5, so for further experiments pH 7 was selected. It is noteworthy to mention that the best response of the chemosensor to the copper ion is found at a neutral pH value which is within an appropriate range for biological and environmental applications.

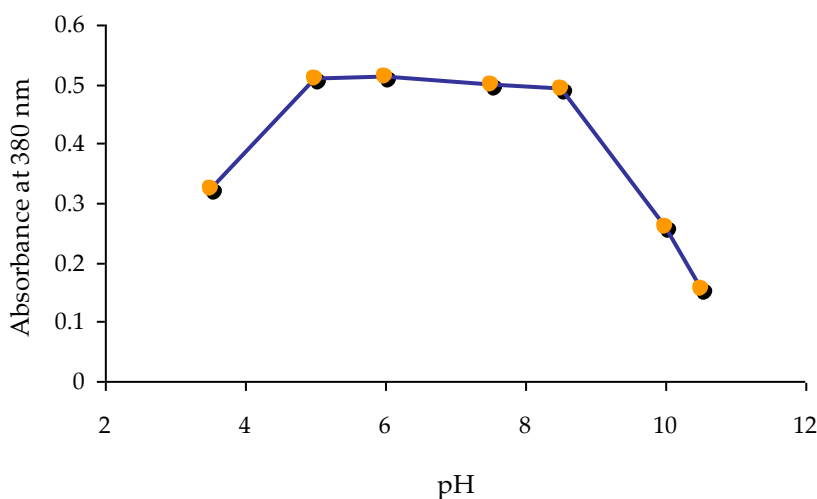


Figure E.12. Effect of pH on the absorbance of Cu-2-HBBH complex at 380 nm in aqueous/ethanolic solution ($C_{2\text{-HBBH}} = 32 \mu\text{M}$; $C_{\text{Cu}^{2+}} = 32 \mu\text{M}$)

The stoichiometry and the stability constants of the complexes can be of significance in the prediction of different chemical processes concerning the metal ions and also in the development of multi-metal ion sensing system based on the single sensing reagent.

To evaluate the stoichiometry and the formation constant of the Cu-2-HBBH complex, both Job's plot and mole-ratio methods were applied for this purpose [Job, 1928; Yoe, 1944; Kirkbright, 1965; Skoog, 2005]. The results indicated a metal/ligand ratio of 1:1 and a stability constant of $6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ showing the formation of a very stable complex. As an illustration, the results obtained with Cu-2-HBBH complex at $\lambda=380 \text{ nm}$, are described in figure E.13.

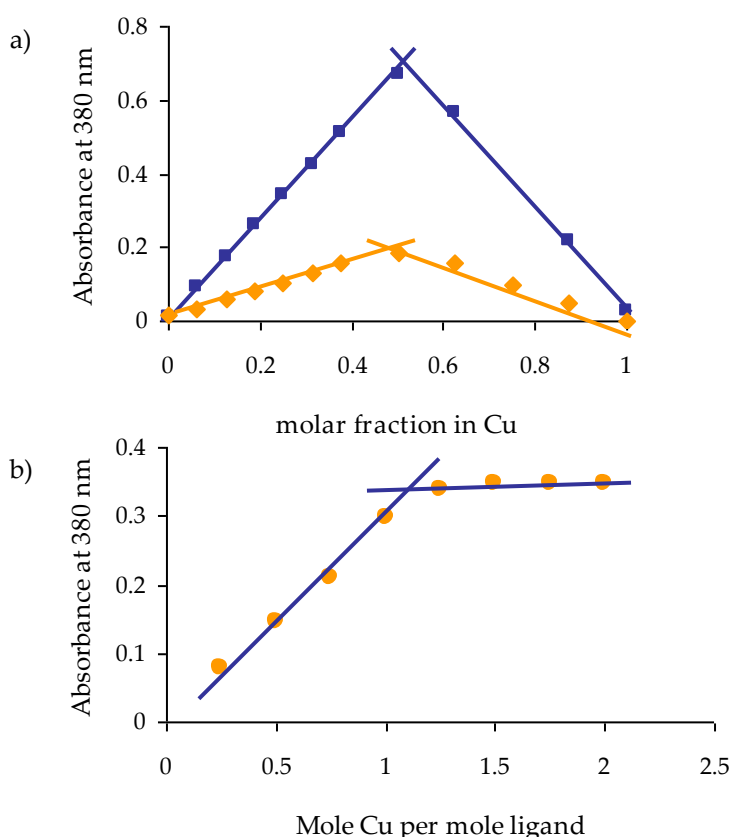


Figure E.13. Stoichiometry studies for Cu²⁺-2-HBBH complex at 380 nm: a) Job's Plot using the following total concentrations: (◆) $C_{2\text{-HBBH}} = C_{\text{Cu}^{2+}} = 1.2 \times 10^{-4} \text{ M}$ and (■) $C_{2\text{-HBBH}} = C_{\text{Cu}^{2+}} = 3.9 \times 10^{-4} \text{ M}$; b) Mole-Ratio plot using the following total concentrations: $C_{2\text{-HBBH}} = C_{\text{Cu}^{2+}} = 10^{-4} \text{ M}$

The fluorescence spectrum of the ligand in aqueous ethanolic solution showed a band at 490 nm upon excitation at 424 nm. When copper ion solution was added, a significant fluorescence quenching of the sensor molecule was observed (fig. E.14).

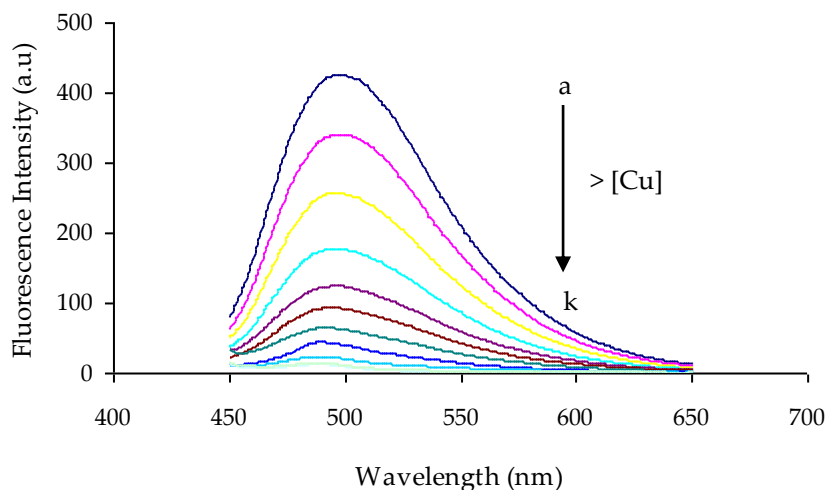


Figure E.14. Fluorescence emission spectra of 2-HBBH in the presence of different concentrations of Cu^{2+} in aqueous/ethanolic solution. Conditions: $C_{2\text{-HBBH}} = 180 \mu\text{M}$; $C_{\text{Cu}^{2+}} (\mu\text{M})$: (a) 0; (b) 15.7; (c) 31.4; (d) 47.1; (e) 62.8; (f) 78.5; (g) 94.2; (h) 109.9; (i) 125.6; (j) 141.3; (k) 157. Excitation and emission wavelength were 424 and 490 nm, respectively.

The effect occurred quantitatively with increase in concentration of the metal and without significant change in the position of the emission maximum.

As it is well known, copper(II) is a paramagnetic ion with an empty d shell and can strongly quench the emission of a fluorophore [Gunnlaugsson, 2004]. The complex formation produced the quenching of 2-HBBH fluorescence probably due to an electronic energy or electron transfer involving the copper and the excited organic ligand [Boiocchi, 2003]. Hence, the development of this sensor forms a simple procedure for the detection of copper ions.

The fluorescence quenching data were analyzed by the Stern-Volmer relationship, which is given by the following equation:

$$F_0 / F = 1 + K_{sv}[Q] \quad (\text{E.1})$$

where F and F_0 are the fluorescence intensities of the reagent in the presence and absence of Cu^{2+} ion, respectively. $[Q]$ is the copper ion concentration (quencher) and K_{SV} is the Stern-Volmer quenching constant.

If the system follows the Stern-Volmer relationship, the plot of F_0/F versus $[Q]$ should be linear and the quenching mechanism would be mainly due to the dynamic process, where the diffusion process is the dominant one. However, a non-linear plot with a positive deviation was obtained as it can be seen in figure E.15. In this case, the quenching was not purely collisional and this finding may be due to the formation of the ground state complex or static quenching process [Lakowicz, 2006].

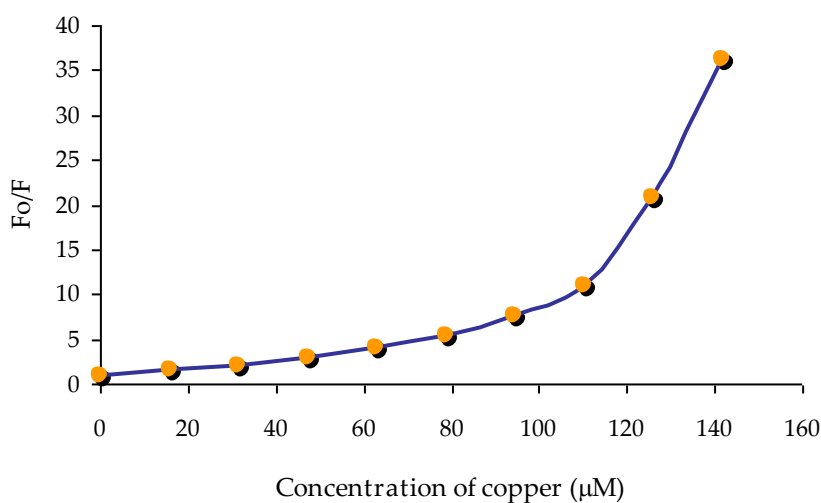


Figure E.15. Stern-Volmer plot of 2-HBBH with increasing concentrations of Cu^{2+} ions

In order to linearize the non-linearity of response, a modified Stern-Volmer relationship was employed. In this case, the static quenching is explained by introducing an additional factor C in the linear Stern-Volmer equation (Eq. 2) and using the logarithmic form of the equation (Eq. 3):

$$F_0 / F = (1 + K_{SV}[Q]) / C \quad (\text{E.2})$$

$$\log (F_0 / F) = K_{SV}[Q] + C \quad (\text{E.3})$$

The modified Stern-Volmer plot of $\log(F_0/F)$ versus $[Q]$ showed a good linear relationship ($R^2 = 0.998$) in the studied range from 0.0 to 157.4 μM of copper ion solutions as shown in fig. E.16. K_{sv} and C were evaluated from the slope and intercept of the calibration plot, obtaining $9.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ and -0.006 , respectively.

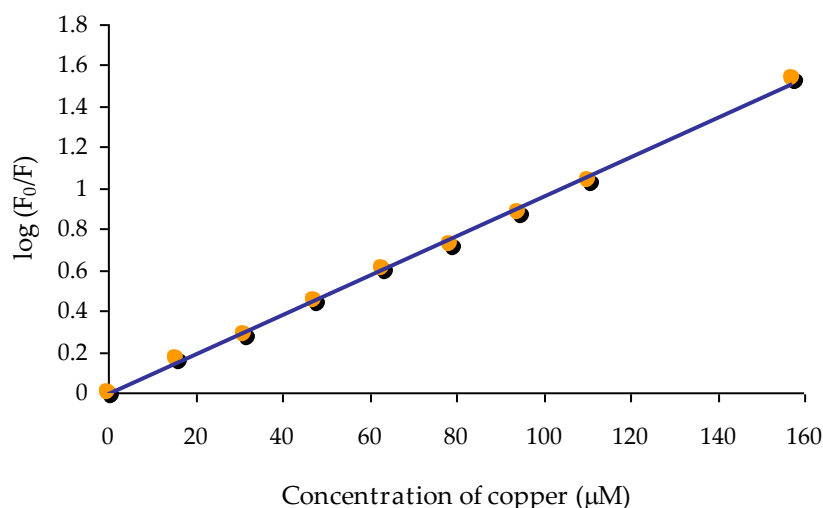


Figure E.16. Modified Stern-Volmer plot of 2-HBBH with increasing concentrations of Cu^{2+} ions

Detection limit was calculated according to $DL=3\sigma/S$ equation [IUPAC, 1997], where σ is the standard deviation of the blank signal ($n=5$), and S is the slope of the calibration curve. DL was found to be 5.6 μM of Cu^{2+} .

The repeatability of the method was evaluated through the relative standard deviation (RSD) of five replicate measurements of a solution containing 78.7 μM of Cu^{2+} ion giving a value of 5.2%.

The effect of different metal ions was evaluated with the comparison of the quenching of fluorescence between copper ion and several other metal cations (fig. E.17).

The results showed that 2-HBBH was significantly quenched by the presence of Cu^{2+} ion. Many of other cations did not produce such effects under identical conditions, producing only minor changes in fluorescence intensity. According to Irving-Williams rule, among the relevant paramagnetic metal ions,

copper(II) has a particularly high thermodynamic affinity for typical *N,O*-chelate ligands and fast metal-to-ligand binding kinetics [Zhou, 2004; Li, 2009]. Although the other metal ions have also the same complex ability, which is not as strong as the one copper ions have, they only lead to the decreasing of fluorescence to a certain degree [Liang, 2007].

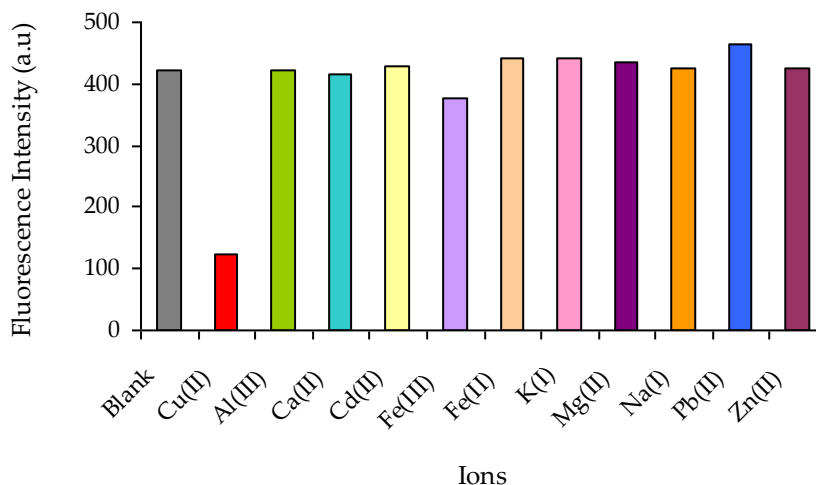


Figure E.17. Effect of metal ions on fluorescence of 2-HBBH at pH 7

The above results implied that the selectivity of the reagent for Cu^{2+} was remarkable and suitable in this system.

The selectivity of the sensor was tested, which is the ability to sense the Cu^{2+} ion in the presence of other metal ions. Table E.10 shows the results obtained using two different concentrations at a ratio of 1:1 (Cu^{2+} ion: interference ion). When comparing the RSD value and the results obtained at both concentrations, it was found that many ions did not interfere the metal determination and yielded errors lower than 5.2 %. It can be noted that only Fe^{3+} showed higher relative errors.

To overcome such interference, Fe^{3+} was reduced to Fe^{2+} by ascorbic acid 4 mM causing an error not higher than 5.2 %, within the range of RSD.

Table E.10. Interfering effect of other cations on the fluorescence signal of the copper sensor ($C_{2\text{-HBBH}} = 94 \mu\text{M}$ and 1:1 copper/interferent ratio): a) low concentration $C_{\text{Cu}^{2+}} = C_{\text{interferent}} = 7.9 \mu\text{M}$; b) high concentration $C_{\text{Cu}^{2+}} = C_{\text{interferent}} = 31.5 \mu\text{M}$

Interfering ion	Relative error (%)	
	$C_{\text{Cu}^{2+}} = C_{\text{interferent}} = 7.9 \mu\text{M}$	$C_{\text{Cu}^{2+}} = C_{\text{interferent}} = 31.5 \mu\text{M}$
Al ³⁺	-3.45	+1.16
Ca ²⁺	-4.66	-0.36
Cd ²⁺	-3.62	-3.03
K ⁺	+0.33	+3.57
Mg ²⁺	-1.51	-3.03
Na ⁺	-4.18	+2.50
Pb ²⁺	+0.79	-4.28
Zn ²⁺	-3.32	-3.03
Fe ²⁺	+1.45	+3.74
Fe ³⁺	-6.49	-18.98
Fe ³⁺ + ascorbic acid (4 mM)	+1.95	+4.99

Apart from the selectivity and sensitivity of the sensor, there is a need in finding proper reagents which also react reversibly with heavy metals. Hence, *the reversibility of the sensor* was examined by adding a strong chelate ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) to the complexed solution of 2-HBBH and Cu(II).

As expected, because of the great difference in the formation constant between EDTA and 2-HBBH with copper ions, the absorption band peak at 380 nm was completely removed from the spectra in the presence of EDTA, demonstrating the reversibility of the binding. Further addition of copper could recover the absorption band (fig. E.18).

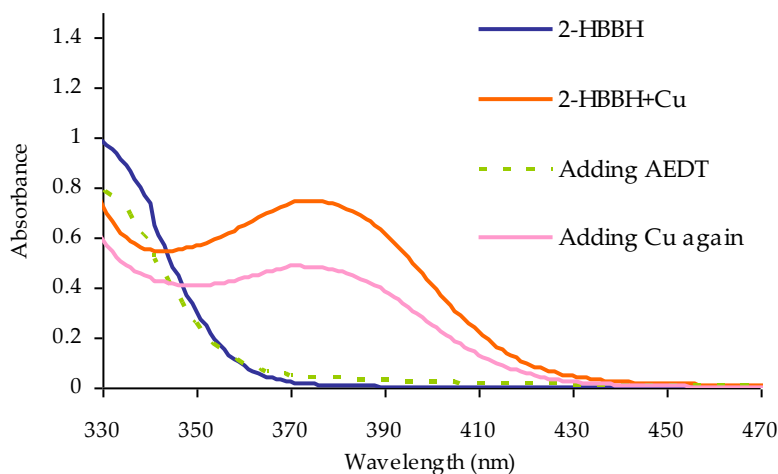


Figure E.18. Effect of the recovery of the sensor upon the addition of EDTA

A simple, rapid, low cost fluorescent Cu²⁺ chemosensor based on the use of a common and easy to prepare reagent was developed. This method can operate in neutral aqueous solutions and it is useful for biological and environmental applications showing a high selectivity to Cu²⁺ over other metal cations that may co-exist. The reversibility of the sensor in the presence of EDTA has also been shown.

Due to its excellent behaviour with this metal, 2-HBBH can be further investigated towards its immobilisation onto a suitable polymer support for the development of an optical fibre Cu(II) sensor.

Chapter 6:

Optical fibre Cu(II) sensor based on colorimetric-solid phase extraction using SDB disks modified with 2-HBBH

Solid-phase extraction technique is known as a suitable strategy to achieve increased sensitivity in analytical processes and determines very low trace concentration of metal ions. SPE is a technique for the isolation, preconcentration and matrix simplification of a selected analyte in samples with unfavourable properties for direct analysis [Poole, 2003; Khorrami, 2004]. However, the use of this classical method is usually time-consuming and requires relatively a large volume of high purity solvents in the elution step.

Miniaturisation is one way to avoid side effects of analytical methods, and has been the subject of a significant number of research efforts. In this respect, a combination of modern analytical techniques with miniaturisation allows the development of powerful analytical devices for the effective control of processes and pollution [Armenta, 2008].

Because of this, colorimetric solid phase extraction (C-SPE) has received much attention over the last few years [Dias, 2006]. By employing this technique, the elution step is eliminated from the process and the amount of analyte is measured directly on the disk surface using diffuse reflectance spectroscopy (DRS) eliminating the need for an elution step.

The aim of this research study is to design a highly selective and portable sensor for the detection of copper ions in the aqueous environment. The chemical sensor will be based on the application of optical fibre technique which is known to be simple, versatile, highly sensitive and selective, immune to hazardous chemical environment, electrical noise free, small in size and geometrically flexible. Thus, chemical sensors based on optical signal measurements have been accepted as advantageous because they can be miniaturised and can be manufactured at low cost [Vaughan, 1998; Aksuner, 2008; Raimundo Jr., 2003].

Currently, the great interest is to find novel and appropriate reagents to be used as the chemical transducer in these sensors.

The method carried out in this chapter is based on two steps: (1) the solid-phase extraction (SPE) of copper (II) from a water sample onto a disk impregnated with a copper-selective colorimetric reagent and (2) the determination of the amount of complexed analyte extracted by the disk using reflectance detection.

Modified disks were made by immobilising the colorimetric reagent (2-HBBH) on an appropriate support (SDB membranes).

After some preliminary experiments, it was found that the bare membrane disk did not show any tendency for the retention of copper ions, while the modified SDB disks with 2-HBBH were capable to retain Cu^{2+} ions onto the surface.

Previous optimisation of chemical parameters such as pH, amount of reagent and type of buffer was carried out by the univariate method in order to achieve high efficiency and good selectivity. For this previous optimisation the conventional solid phase extraction with FAAS was employed.

Effect of pH on the adsorption of Cu^{2+} : The influence of the pH on the recovery of $40 \mu\text{g L}^{-1}$ was studied in the range from 3 to 9 by adjusting pH with Hydrion buffer. The plot of copper recovery versus pH showed pH 7 as the optimum condition being selected for further experiments (Fig. E.19).

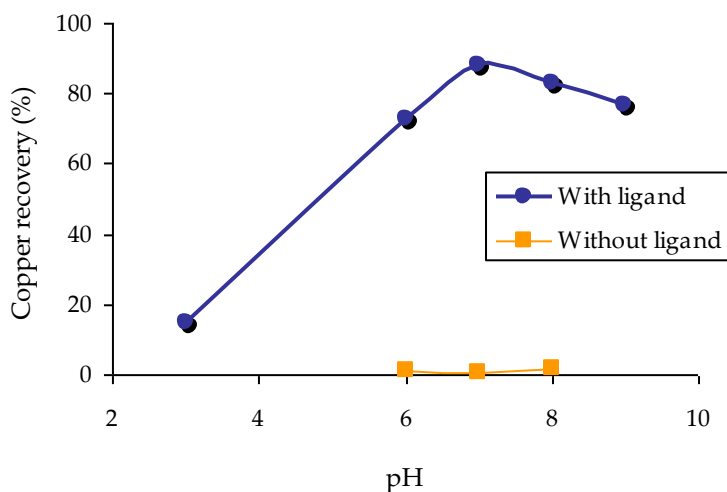


Figure E.19. Effect of pH on the extraction of Cu^{2+} by the modified membrane disk

Effect of amount of 2-HBBH: The extraction of copper at pH 7 was studied with each SDB disk modified with different quantities of ligand (Fig. E.20). The minimum quantity of 2-HBBH required to achieve the maximum recovery of copper was 1.25 mg. In order to assure that there is enough ligand to form a complex with copper ions, 2.5 mg was selected as the adequate amount of 2-HBBH.

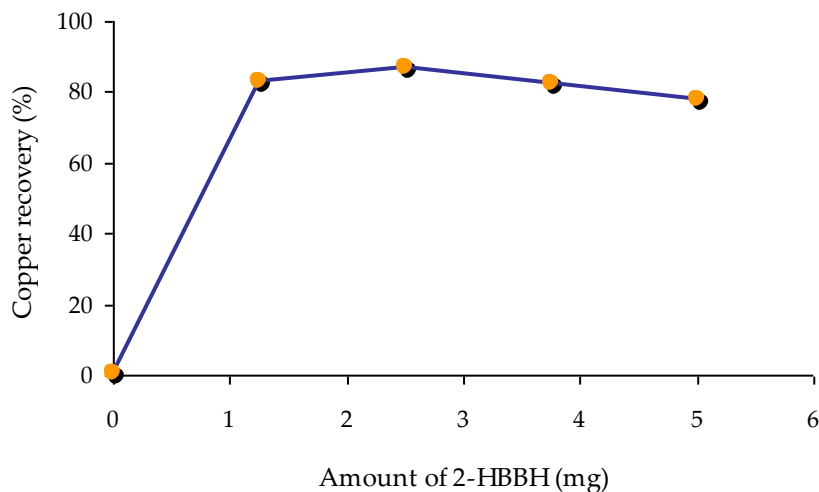


Figure E.20. Effect of amount of 2-HBBH on extraction of copper ($40 \mu\text{g L}^{-1}$)

Effect of supporting electrolyte: In order to choose the proper buffer for the retention of copper ions, the pH of the solution was adjusted by using five different buffers (Table E.11).

Table E.11. Influence of different buffers to adjust pH 7 in the retention of Cu^{2+}

Buffer employed	Recovery (%)
Hydrion-Buffer	88.06
NH_3 1M/ HNO_3 1M	74.35
HEPES 0.5 M	55.15
$\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ 0.5 M	88.73
PIPES 0.05 M	67.27

The best recoveries were achieved using both $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ and Hydrion buffer.

Taking into account these suitable parameters obtained with the conventional method, the new colorimetric-solid phase extraction was investigated.

Preparation of modified extraction disks: After placing the membrane disk in the filtration apparatus, it was washed with different solvents (nitric acid, methanol and acetonitrile) and air dried for several minutes. Then, the membranes of 47-mm were cut into 13-mm disks by means of a cork borer. Then, the small extraction disks were prepared by impregnating with the appropriate reagent: 6.25 mg of 2-HBBH in 6.25 mL of ethanol. This process was carried out by mounting the membrane on a 13-mm plaster Fisherbrand SyringeSwinnex Filter Holders (Millipore). In order to pass the reagent through the disk, a 5-mL plastic syringe was connected to the holder. After impregnation, the disk was dried for a few minutes. Subsequently, the modified disk was washed with 5 mL of water to prewet the surface of the disk prior to the extraction of copper ions. Finally, the sample (50 mL) containing trace amounts of copper, and the buffer ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ 0.05 M) to adjust the optimum pH=7, was passed through the modified membrane disk using another syringe pushing manually at a rate of approximately one drop per second. This step required about 10 minutes. After the extraction, 10 mL of air was passed through the holder to remove the remaining sample. Finally, the disk was removed from the holder and placed under a sample area locator; the optical fibre was placed onto the disk in the dark in order to acquire the spectrum. (Fig. E.21).

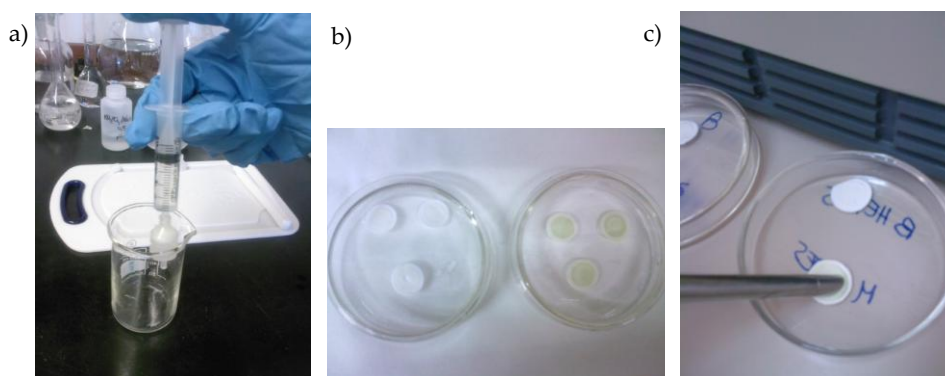


Figure E.21. a) Preparation of modified extraction disks; b) Disks after passing 0 mg/L (left) and 1 mg/L (right) of Cu^{2+} through them; c) detection using optical fibre

The optical signal recorded by the detector as counts is indicative of reflectance of the incident light by the sensing membrane.

The effect of buffer was repeated again in order to select the most favourable buffer between $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ and Hydrion buffer by applying reflectance measurements. The results showed that the difference of signal is greater using $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ buffer. In this case, the colour of the disk changes with the concentration of copper from white to green, which is detected with reflectance measurements using optical fibre.

To select the optimum conditions for pH, amount of ligand immobilised on the disk and time for immobilisation, a reduced factorial design was employed (*Fractional factorial design* 3^{3-1}). With this kind of design the factors can be efficiently evaluated using a small fraction of the experiments of the full factorial design.

A total of ten experiments were carried out including two repetitions of the central point. The variables were represented at three levels, high, medium and low, denoted by (+1), (0), (-1), respectively.

The different variables and levels evaluated and the Pareto chart are shown in table E.12 and figure E.22, respectively.

Table E.12. Variables and levels of the fractional factorial design 3^{3-1}

Variable	Low level	Intermedium level	High level
pH ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$)	5	7	9
Immobilisation time (min)	5	10	15
Amount of ligand immobilised (mg)	0.25	3.25	6.25

From the Pareto chart, it can be concluded that pH and amount of ligand showed a significant effect. On one hand, pH showed a quadratic positive effect over the reflectance signal. On the other hand, amount of ligand immobilised showed a linear positive effect.

Due to this design, the values selected for the sensing of copper ions were: pH=7, 10 min as immobilisation time and 6.25 mg for the optimum amount of ligand.

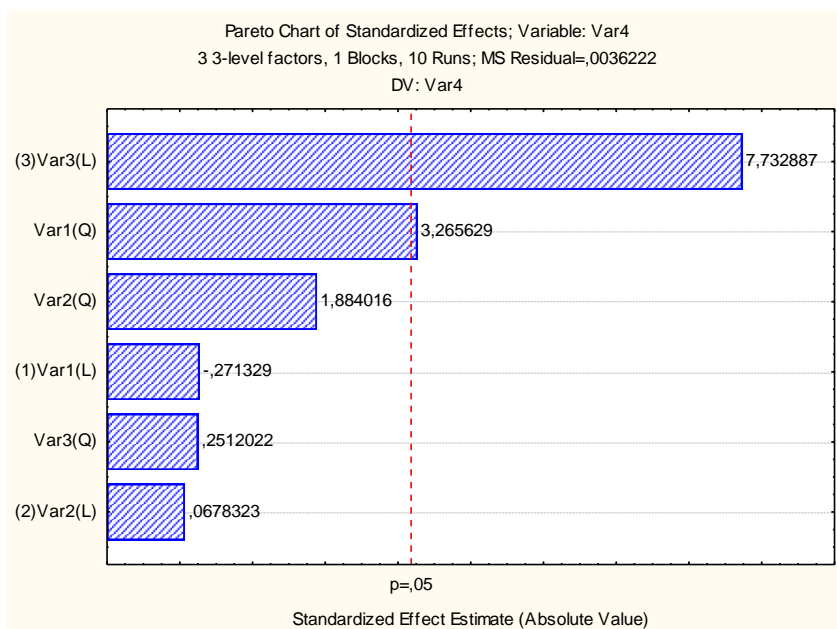


Figure E.22. Pareto chart for fractional factorial design by using reflectance measurements

Under the optimum experimental conditions, the *analytical performance characteristics of the method* were determined.

The calibration graph for Cu(II) was linear over the range of 0 to 2.5 mg L⁻¹ of Cu²⁺ with an equation of the linear regression being $y = 0.2445 C \text{ (mg/L)} + 0.1602$. (Fig. E.23).

Detection limit, calculated according to $DL=3\sigma/m$ [IUPAC, 1997], where σ is the blank standard deviation and m is the slope of the calibration graph, was found to be 0.28 mg L⁻¹ of Cu²⁺.

The *repeatability of the method* was evaluated through the relative standard deviation (RSD) of six replicate measurements of a solution containing 1 mg L⁻¹ of

copper ion. The RSD was found to be 4.87 % and the precision of the method was 4.01 % at a significance level of 95 % (n = 6).

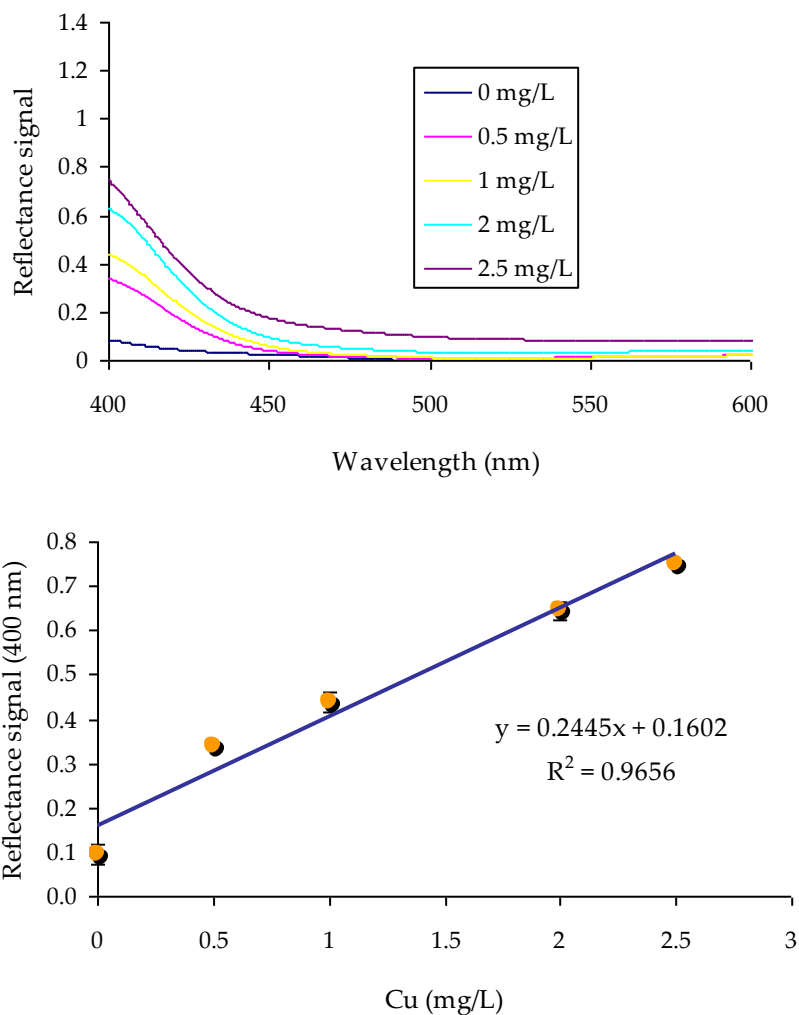


Figure E.23. Top: copper-2-HBBH reflectance spectra; bottom: copper calibration plot at 400 nm

As far as *the study in time* is concerned, no significant differences in the optical properties of the disk were found over several days. Thus, the results obtained showed a high degree of stability of the sensing membrane. Because of

that, the sensor proposed can be applied to the retention of copper *in-situ* with the possibility of measuring the disk in the lab days after collection.

Interference study: The effect of foreign ions on the C-SPE determination of copper(II) was investigated by adding a known concentration of different inorganic salts and trace metals present in seawater to a solution containing 1 mg L⁻¹ of Cu(II) using the proposed method. From the results, it can be concluded that the method was free from interferences of saline matrix being only affected by Fe(III) and Zn(II). Some of the interferences tested are shown in table E.13.

Table E.13. Study of interferences by inorganic salts for the determination of 1 mg/L of copper ions

Added salt	Concentration (g L ⁻¹)	Reflectance signal (400 nm)	Error (%)
KCl	0.677	0.440	0.46
NaHCO ₃	0.196	0.420	-4.11
NaCl	23.939	0.450	2.74
NaF	0.003	0.450	2.74
MgCl ₂	10.825	0.450	2.74
Na ₂ SO ₄	3.994	0.450	2.74
H ₃ BO ₃	0.027	0.420	-4.11
KBr	0.098	0.460	5.02
SrCl ₂	0.024	0.460	5.02

A rapid, easy and successful two-step procedure for the sensing of Cu(II) in natural waters is described.

The detection limit and the calibration curve restrict the use of the sensor to samples that are reasonably contaminated with copper. An application could be in using the sensor as an alert in the waste stream of a copper-based industry where the concentration of copper is not allowed to exceed a maximum level.

This field opens extensive possibilities for the determination of metal ions in aqueous samples.

Conclusions

Taking into account all the results obtained from the research, the **main conclusions** can be enumerated as follows:

1) A new AdCSV method for lead analysis in water samples based on complexation with 2-APSH has been developed. A three-stage strategy has been followed to study the optimum conditions for the determination of Pb(II). The new method provides a large number of advantages such as a very good detection limit, which is lower than those showed by the other AdCSV published methods when they are applied to seawater. The results also showed a large linear range of applicability and the application to water samples with high saline matrix like seawater and estuarine water. Using the optimised conditions, other metals can be detected (Zn(II), Ni(II), V(V)).

Further studies to explore the use of 2-APSH in AdCSV may lead to a new approach for the simultaneous metals analysis.

2) The applicability of 2-HBBH in the determination of trace metals in natural waters by AdCSV has been evaluated. The addition of this ligand offers a practical potential for the individual analysis of copper, lead, cadmium and bismuth traces, with high sensitivity, simplicity and speed. In addition, the simultaneous determination of the two groups of elements consisting of Cd(II)-Pb(II)-Cu(II) and Cd(II)-Pb(II)-Bi(III) can be performed within a few minutes. The method was applied to the simultaneous determination of metals in certified reference water and in synthetic water samples with satisfactory results. The good resolution, sensitivities and reproducibility obtained in this work should be pointed out.

3) A Schiff base-based fluorescent chemosensor for divalent copper detection using a common reagent has been developed. The complexation of Cu²⁺ ion induced a strong fluorescence quenching of 2-HBBH. A modified Stern-Volmer relationship was employed to obtain a linear calibration plot, obtaining a dynamic working range. This fluorescent chemosensor also showed a high selectivity for copper over other metal ions. The results of this investigation show a simple,

rapid, of low cost and selective method, that can operate in neutral solutions and is useful for biological and environmental applications.

Works related to this area are still of great challenge and increasing interest.

4) A simple, non-expensive optical fibre sensor for the analysis of copper in water samples was developed. This new method was carried out by means of the miniaturization of the conventional solid phase extraction. It is based on the separation of Cu^{2+} on a SDB membrane disk modified by an aroylhydrazone. The most relevant variables affecting the response were evaluated in order to carry out the determination of this metal ion. The interference from inorganic salts and other metals was found not to be of major concern in field monitoring of copper ion.

The combination of SPE onto a modified membrane disk with some form of measurement of the analyte on the solid surface has a wide range of possibilities. Because of that, several studies in this direction are now in progress in our laboratory.

The research developed in this Thesis results in methods with different detection ranges and different selectivity, which can therefore meet different analytical needs.

References

- Achterberg, E.P., Barriada, J.L., Braungardt, C.B., **2005**. Cathodic Stripping Voltammetry. Encyclopedia of Analytical Sciences. Academic Press. Amsterdam.
- Aksuner, N., Henden, E., Yilmaz, I., Cukurovali, A., **2008**. Selective optical sensing of copper(II) ions based on a novel cyclobutane-substituted Schiff base ligand embedded in polymer films. *Sensors and Actuators B* 134, 510–515.
- Aksuner, N., Henden, E., Yilmaz, I., Cukurovali, A., **2009**. A highly sensitive and selective fluorescent sensor for the determination of copper(II) based on a Schiff base. *Dyes and pigments* 83, 211–217.
- Arancibia, V., Nagles, E., Cornejo, S., **2009**. Determination of lead in the presence of morin-5'-sulfonic acid and sodium dodecyl sulfate by adsorptive stripping voltammetry. *Talanta* 80, 184–188.
- Armenta, S., Garrigues, S., de la Guardia, M., **2008**. Green Analytical Chemistry. *Trends in Analytical Chemistry* 27, 497–511.
- Baldini, F., Bracci, S., **1998**. Adsorption-based optical transduction in optical fibre chemical sensors for environmental and industrial applications. *Adsorption and its Applications in Industry and Environmental Protection Studies in Surface Science and Catalysis* 120, 925–948.
- Baldini, F., Chester, A.N., Homola, J., Martellucci, S., **2006**. *Optical Chemical Sensors*; NATO Science Series 224. Springer. New York.
- Bargossi, C., Fiorini, M.C., Montalti, M., Prodi, L., Zaccheroni, N., **2000**. Recent developments in transition metal ion detection by luminescent chemosensors. *Coordination Chemistry Reviews* 208, 17–32.
- Bayne, C.K., Rubin, I.B., **1986**. *Practical experimental designs and optimisation methods for chemists*, VCH Publishers, Deefiel Beach, FL, p. 205.
- Beltramello, M., Gatos, M., Mancin, F., Tecilla, P., Tonellato, U., **2001**. A new selective fluorescence chemosensor for Cu(II) in water. *Tetrahedron Letters*, 42, 9143–9146.
- Berkowitz, B., Dror, I., Yaron, B., **2008**. *Contaminant Geochemistry. Interactions and transport in the subsurface environment*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Boiocchi, M., Fabbrizzi, L., Licchelli, M., Sacchi, D., Vázquez, M., Zampa, C., **2003**. A two-channel molecular dosimeter for the optical detection of copper(II). *Chemical Communications* 15, 1812–1813.
- Brown, R.J.C., Milton, M.J.T., **2005**. Analytical techniques for trace element analysis: an overview. *Trends in Analytical Chemistry*, 24, 266–274.
- Buffle, J., Tercier-Waeber, M.L., **2005**. Voltammetric environmental trace- metal analysis and speciation: from laboratory to in situ measurements. *Trends in Analytical Chemistry*, 24, 172–191.
- Cámara, C., Pérez-Conde, C., Moreno-Bondi, M.C., Rivas, C., **1995**. *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry* 17, 165–193.

English summary

Chan, S.C., Koh, L.L., Leung, P.H., Ranford, J.D., Sim, K.Y., **1995**. Copper(II) complexes of the antitumour-related ligand salicylaldehyde acetylhydrazone (H₂L) and the single-crystal X-ray structures of [[Cu(HL)H₂O]₂] · 2(NO₃) and [[Cu(HL) (pyridine) (NO₃)₂]. *Inorganica Chimica Acta* 236, 101-108.

Clark, R.B., **2001**. *Marine Pollution*, 5th Edition (New York) Oxford University Press.

Clement, R.E., Yang, P.W., **2001**. *Environmental analysis. Analytical Chemistry* 73, 2761-2790.

Collado-Sánchez, C., Pérez-Peña, J., Gelado-Caballero, M.D., Herrera-Melian, J.A., Hernández-Brito, J.J., **1996**. Rapid determination of copper, lead and cadmium in unpurged seawater by adsorptive stripping voltammetry. *Analytica Chimica Acta* 320, 19-30.

Colombo, C., Van den Berg, C.M.G., **1997**. Simultaneous determination of several trace metals in seawater using cathodic stripping voltammetry with mixed ligands. *Analytica Chimica Acta* 337, 29-40.

Curylo, J., Wardencki, W., Namiesnik, J., **2007**. Green aspects of sample preparation- a need for solvent reduction. *Polish Journal of Environmental Studies* 16, 5-16.

Dias, N.C., Porter, M.D., Fritz, J.S., **2006**. Principles and applications of colorimetric solid-phase extraction with negligible depletion. *Analytica Chimica Acta* 558, 230-236.

Ensafi A. A., Zarei, K., **2000**. Simultaneous determination of trace amounts of cadmium, nickel and cobalt in water samples by adsorptive voltammetry using ammonium 2-amino-cyclopentene dithiocarboxylate as a chelating agent. *Talanta* 52, 435-440.

Ensafi, A.A., Khayamian, T., Atabati, M., **2003**. Differential pulse cathodic stripping adsorption voltammetric determination of trace amounts of lead using factorial design for optimisation. *Talanta* 59, 727-733.

Ensafi, A.A., Khayamian, T., Benvidi, A., Mirmomtaz, E., **2006**. Simultaneous determination of copper, lead and cadmium by cathodic adsorptive stripping voltammetry using artificial neural network. *Analytica Chimica Acta* 561, 225-232.

Espada-Bellido, E., Galindo-Riaño, M.D., García-Vargas, M., **2009a**. Sensitive adsorptive stripping voltammetric method for determination of lead in water using multivariate analysis for optimisation. *Journal of Hazardous Materials* 166, 1326-1331.

Espada-Bellido, E., Galindo-Riaño, M.D., Aouarram, A., García-Vargas, M., **2009b**. Applicability of 2-Hydroxybenzaldehyde benzoylhydrazone in the determination of trace metals by adsorptive cathodic stripping voltammetry: Relevancy of simultaneous determinations. *Analytical Sciences* 25, 903-909.

European Environment Agency. www.eea.europa.eu

Ferreirós, N., Iriarte, G., Alonso, R.M., Jiménez, R.M., **2006**. MultiSimplex and experimental design as chemometric tools to optimize a SPE-HPLC-UV method for the determination of eprosartan in human plasma samples. *Talanta* 69, 747-756.

Fischer, E., Van den Berg, C.M.G., **2001**. Determination of lead complexation in lake water by cathodic stripping voltammetry and ligand competition. *Analytica Chimica Acta* 432, 11-20.

- Förstner, U., Wittmann, G.T.W., **1979**. Metal pollution in the aquatic environment. (New York) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Fukuba, T., Imhof, A., Matsunaga, M., Takagi, N., Yamamoto, T., Okamura, K., Naganuma, T., Fujii, T., **2005**. Development of miniaturised In Situ Analysis Devices for Biological and Chemical Oceanography, Proceedings of the 3rd Annual International IEEE EMBS Special Topic Conference on Microtechnologies in Medicine and Biology, Kahuhu, Oahu, Hawaii, 12-15 May 2005.
- Gangaiya, P., Mahendra, N., **2008**. Chapter 24: The application of fibre optic chemical sensors for heavy metal monitoring in contaminated environments. *Developments in Soil Science* 32, 589-600.
- García-Vargas, M., Milla, M., Hidalgo, J.L., Bautista-Rodríguez, J.M., **1987**. Spectral (u.v.-vis, i.r. and MS), electrochemical and metallochromic properties of 2-hydroxy-benzoylhydrazones of acetylpyridines. *Spectrochimica Acta* 43, 355-360.
- Gholivand, M.B., Niroomandi, P., Yari, A., Joshagani, M., **2005**. Characterization of an optical copper sensor based on *N,N'*-bis(salicylidene)-1,2-phenylenediamine. *Analytica Chimica Acta* 538, 225-231.
- Gholivand, M.B., Romiani, A.A., **2006**. Application of adsorptive stripping voltammetry to the simultaneous determination of bismuth and copper in the presence of nuclear fast red. *Analytica Chimica Acta* 571, 99-104.
- Gunnlaugsson, T., Leonard, J.P., Murray, N.S., **2004**. Highly Selective Colorimetric Naked-Eye Cu(II) Detection Using an Azobenzene Chemosensor. *Organic Letters* 6, 1557-1560.
- Hajian, R., Shams, E., **2003**. Application of adsorptive stripping voltammetry to the determination of bismuth and copper in the presence of morin. *Analytica Chimica Acta* 491, 63-69.
- Hidalgo, J.L.; Milla, M.; García-Vargas, M., **1991**. Electrochemical behaviour and pulse polarographic determination of 2-hydroxy benzoylhydrazones of acetylpyridines. *Bulletin of Electrochemistry* 7, 580-585.
- Hulanicki, A., Glab, S., Ingman, F., **1991**. Chemical Sensors definitions and classification. *Pure and Applied Chemistry* 63, 1247-1250.
- IUPAC. **1997**. McNaught, A.D., Wilkinson, A., *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the "Gold Book"). Oxford. Blackwell Scientific Publications.
- Jhonson, D.K., Murphy, T.B., Rose, N.J., Goodwin, W.H., Pickart, L., **1982**. Cytotoxic chelators and chelates 1. Inhibition of DNA synthesis in cultured rodent and human cells by aroylhydrazones and by a copper(II) complex of salicylaldehyde benzoyl hydrazone. *Inorganica Chimica Acta* 67, 159-165.
- Job, P., **1928**. Formation and stability of inorganic complexes in solution. *Annales de Chimie*. 9, 113-203.
- Jurado-González, J.A., Galindo-Riaño, M.D., García-Vargas, M., **2003**. Experimental designs in the development of a new method for the sensitive determination of cadmium in seawater by adsorptive cathodic stripping voltammetry. *Analytica Chimica Acta* 487, 229-241.
- Kamila, S., Callan, J.F., Mulrooney, R.C., Middleton, M., **2007**. A novel fluorescent chemosensor for Cu(II) in aqueous solution based on a β -aminobisphosphonate receptor. *Tetrahedron Letters* 48, 7756-7760.

- Khaloo, S.S., Ensafi, A.A., Khayamian, T., **2007**. Determination of bismuth and copper using adsorptive stripping voltammetry couple with continuous wavelet transform. *Talanta* 71, 324–332.
- Khorrani, A.R., Naeimi H., Fakhari, A.R., **2004**. Determination of nickel in natural waters by FAAS after sorption on octadecyl silica membrane disks modified with a recently synthesized Schiff's base. *Talanta* 64, 13-17.
- Kirkbright, G.F., West, T.S., Woodward, C., **1965**. Spectrofluorometric Determination of Submicrogram Amounts of Aluminum and Beryllium with 2-Hydroxy-3-naphthoic Acid. *Analytical Chemistry* 37, 137-143.
- Kissinger, P.T., Heineman, W.R., **1996**. Laboratory techniques in electroanalytical chemistry. Second edition, revised and expanded (New York) Marcel Dekker, Inc. 719.
- Komjarova, I., Blust, R., **2006**. Comparison of liquid–liquid extraction, solid-phase extraction and coprecipitation preconcentration methods for the determination of cadmium, copper, nickel, lead and zinc in seawater. *Analytica Chimica Acta* 576, 221-228.
- Koneswaran, M., Narayanaswamy, R., **2008**. L-Cysteine-capped ZnS quantum dots based fluorescence sensor for Cu²⁺ ion.. *Sensors and actuators B: Chemical*, 139, 104-109.
- Lakowicz, J.R., **2006**. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Third Edition, Springer United State pp. 277.
- Li, H.G., Yang, Z.Y., Qin, D.D., **2009**. A new Schiff-base type selective fluorescent chemosensor for Cu²⁺. *Inorganic Chemistry Communications* 12, 494-497.
- Liang, Z., Liu, Z., Jiang, L., Gao, Y., **2007**. A new fluorescent chemosensor for copper(II) and molecular switch controlled by light. *Tetrahedron Letters* 48, 1629-1632.
- Libes, S.M., **1992**. An introduction to Marine Biogeochemistry. John Wiley & Sons.
- Limson, J., Nyokong, T., **1997**. Substituted catechols as complexing agents for the determination of bismuth, lead, copper and cadmium by adsorptive stripping voltammetry. *Analytica Chimica Acta* 344, 87-95.
- Liu, J., Zhang, B., Wu, B., Liu, Y., Yu, X., **2006**. Spectrofluorimetric determination of trace amounts of cadmium with 2,4-dihydroxyacetophenone benzoylhydrazone. *Rare Metals* 25, 184-189.
- Lu, Y.H., Lu, Y.W., Wu, C.L., Shao, Q., Chen, X.L., Bimbong, R.N.G., **2006**. UV–visible spectroscopic study of the salicylaldehyde benzoylhydrazone and its cobalt complexes. *Spectrochimica Acta Part A* 65, 695-701.
- Martínez-Máñez, R., Sancenón, F., **2003**. Fluorogenic and Chromogenic Chemosensors and Reagents for Anions. *Chemical Reviews* 103, 4419-4476.
- McDonagh, C., Burke, C.S., MacCraith, B.D., **2008**. Optical Chemical Sensors. *Chemical Reviews* 108, 400-422.
- Namiesnik, J., Szefer, P., **2010**. Analytical Measurements in Aquatic Environments. Taylor & Francis Group.
- Narayanaswamy, R., **1993**. Optical Chemical Sensors: Transduction and signal processing. *Tutorial Review. Analyst*, 118, 317-322.

- Narayanaswamy, R., **2001**. Absorbance based sensors, Chapter in Encyclopedia of Ocean Sciences, Ed. J.H.Steele, S.A.Thorpe & K.K.Turekian, Academic Press, pp. 6-12.
- Narayanaswamy, R., Wolfbeis, O.S., **2004**. Optical Sensors: Industrial, Environmental and Diagnostic Applications. Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors, Springer, Heidelberg. Germany.
- Orellana, G., Moreno-Bondi, M.C., **2005**. Frontiers in Chemical Sensors: Novel Principles and Techniques. Springer. New York.
- Pérez-Bendito, D., Rubio, S., **1999**. Comprehensive Analytical Chemistry. Volume XXXII Environmental Analytical Chemistry. Edited by S.G. Weber.
- Poole, C.F., **2003**. New trends in solid-phase extraction. Trends in Analytical Chemistry 22, 362-373.
- Prodi, L., Bolletta, F., Montalti, M., Zaccheroni, N., **2000**. Luminescent chemosensors for transition metal ions. Coordination Chemistry Reviews 205, 59-83.
- Rahmi, D., Zhu, Y., Fujimori, E., Umemura, T., Haraguchi, H., **2007**. Multielement determination of trace metals in seawater by ICP-MS with aid of down-sized chelating resin-packed minicolumn for preconcentration. Talanta 72, 600-606.
- Raimundo Jr, I.M., Narayanaswamy, R., **2003**. Simultaneous determination of Zn(II), Cd(II) and Hg(II) in water. Sensors and Actuators, B 90, 189-197.
- Saracoglu, S., Soylak, M., Kacar Peker, D.S., Elci, L., dos Santos, W.N.L., Lemos, V.A., Ferreira, S.L.C., **2006**. A pre-concentration procedure using coprecipitation for determination of lead and iron in several samples using flame atomic absorption spectrometry. Analytica Chimica Acta 575, 133-137.
- Sazanovich, I.V., Balakumar, A., Muthukumar, K., Hindin, E., Kirmaier, C., Diers, J.R., Lindsey, J.S., Bocian, D.F., Holten, D., **2003**. Excited-State Energy-Transfer Dynamics of Self-Assembled Imine-Linked Porphyrin Dyads. Inorganic Chemistry 42, 6616-6628.
- Shams, E., Babaei A., Soltaninezhad, M., **2004**. Simultaneous determination of copper, zinc and lead by adsorptive stripping voltammetry in the presence of Morin. Analytica Chimica Acta 501, 119-124.
- Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Crouch, S.R., **2005**. Fundamentals of Analytical Chemistry. 8th Edition, International Thomson Editors.
- Soylak, M., Narin, I., Bezerra, M.A., Costa Ferreira, S.L., **2005**. Factorial design in the optimisation of preconcentration procedure for lead determination by FAAS. Talanta 65, 895-899.
- Sreeja, P.B., Prathapachandra Kurup, M.R., **2005**. Synthesis and spectral characterization of ternary complexes of oxovanadium(IV) containing some acid hydrazones and 2,2'-bipyridine. Spectrochimica Acta Part A 61, 331-336.
- Suciu, P., Vega, M., Roman, L., **2000**. Determination of cadmium by differential pulse adsorptive stripping voltammetry. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 23, 99-106.
- Van den Berg, C.M.G., **1986**. Determination of copper, cadmium and lead in seawater by cathodic stripping voltammetry of complexes with 8-hydroxyquinoline. Journal of Electroanalytical Chemistry 215, 111-121.

Varney, M.S., **2000**. Chemical Sensors in Oceanography. Ocean Science and Technology (A series of books in oceanography, Volume 1) (Amsterdam) Gordon and Breach Science Publishers.

Vaughan, A.A., Narayanaswamy, R., **1998**. Optical fiber reflectance sensors for the detection of heavy metal ions based on immobilized Br-PADAP. *Sensors and Actuators B* 51, 368–376.

Wang, J., Lu, J., Yarnitzky, C., **1993**. Highly sensitive and selective measurements of lead by stripping voltammetry/potentiometry following adsorptive accumulation of the lead-o-cresolphthalexon complex. *Analytica Chimica Acta* 280, 61-67.

Wang, M.X., Meng, X.M., Zhu, M.Z., Guo, Q.X., **2007**. A novel selective fluorescent chemosensor for Cu(II). *Chinese Chemical Letters* 18, 1403-1406.

Weng, Y.Q., Teng, Y.L., Yue, F., Zhong, Y.R., Ye, B.H., **2007**. A new selective fluorescent chemosensor for Cu(II) ion based on zinc porphyrin-dipyridylamino. *Inorganic Chemistry Communications* 10, 443-446.

Wolfbeis, O.S., **2006**. Fiber-Optic Chemical Sensors and Biosensors. *Analytical Chemistry* 78, 3859-3874.

Wu, Q., Batley, G.E., **1995**. Determination of sub-nanomolar concentrations of lead in seawater by adsorptive stripping voltammetry with xylenol orange. *Analytica Chimica Acta* 309, 95-101.

Wu, J.S., Wang, P.F., Zhang, X.H., Wu, S.K., **2006**. Novel fluorescent sensor for detection of Cu(II) in aqueous solution. *Spectrochimica Acta Part A*, 65, 749-752.

Xiang, Y., Li, Z., Chen, X., Tong, A., **2008**. Highly sensitive optical chemosensor for determination of Cu²⁺ in aqueous solution. *Talanta* 74, 1148-1153.

Yoe, J.H., Jones, A.L., **1944**. Colorimetric determination of iron with disodium-1,2-dihydroxybenzene-3,5-disulfonate. *Ing. Eng. Chem. Anal.* 16, 111-115.

Yokoi, K., Yamaguchi, A., Mizumachi, M., Koide, T., **1995**. Direct determination of trace concentrations of lead in fresh water samples by adsorptive cathodic stripping voltammetry of a lead-Calcein Blue complex. *Analytica Chimica Acta* 316, 363-369.

Yuan, Y.F., Cao, Y., Fu, N.Y., Wang, L., Weng, H., de Carvalho, A.B., Peppe, C., **2001**. Preparation, characterization, electrochemical studies and crystal structure determination of salicylaldehyde-arylhydrazone, ferrocenyl-arylhydrazone and salicylaldehyde-ferrocenylhydrazone complexes of indium. *Journal of Organometallic Chemistry* 637-639, 631-641.

Zhao, M., Yang, X.F., He, S., Wang, L., **2009**. A rhodamine-based chromogenic and fluorescent chemosensor for copper ion in aqueous media. *Sensors and Actuators B: Chemical* 135, 625-631.

Zhou, L.L., Sun, H., Zhang, X.H., Wu, S.K., **2004**. An effective fluorescent chemosensor for the detection of copper(II). *Spectrochimica Acta Part A* 61, 61-65.

Zidan, A.S.A., **2003**. Mixed Ligand Complexes of Nickel (II) Dialkyldithiophosphates with 2-Acetylpyridine Semicarbazone and 2-Acetylpyridine Benzoylhydrazone. *Phosphorus, Sulfur and Silicon* 178, 567-582.

Zuki, H.M., PhD Thesis December **2009**. Optical multi-metal ion sensing systems based on immobilised fluorescent reagents. University of Manchester.

Artículos derivados de la Tesis



Sensitive adsorptive stripping voltammetric method for determination of lead in water using multivariate analysis for optimization

E. Espada-Bellido, M.D. Galindo-Riaño*, M. García-Vargas

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Cádiz, P.O. Box 11510, Campus Río S. Pedro, Puerto Real, Cádiz 11510, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 August 2008

Received in revised form

26 November 2008

Accepted 9 December 2008

Available online 14 December 2008

Keywords:

Lead

Water

Stripping voltammetry

2-Acetylpyridine salicyloylhydrazone

Multivariate optimization

ABSTRACT

A sensitive adsorptive cathodic stripping voltammetric (AdCSV) method is presented for direct determination of Pb(II) at nanomolar levels in water based on metal complexation with 2-acetylpyridine salicyloylhydrazone (2-APSH) and subsequent adsorptive deposition onto hanging mercury drop electrode (HMDE). The instrumental and chemical factors were optimized using exploratory (Plackett–Burman) and sequential (Simplex) designs. Under optimal conditions (pH 5.6, -0.552 V for deposition voltage, 0.0083 V for voltage step and 0.87 s for time interval for voltage step) a limit of detection of 0.17 nM was obtained and the relative standard deviation of five measurements of 17.3 nM was 1.20% . The voltammetric responses increased linearly with metal ion concentrations ranging from 2.4 to 145 nM. The method was free from interferences of inorganic salts and trace metals usually present in seawater. The proposed method was successfully validated using certified reference estuarine water (LGC 6016) with relative error of -2.15% and applied to real seawater samples (relative errors of -4.40% and $+1.84\%$).

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Among the many concerns of environmental lists, the levels of heavy metals (tin, lead, mercury and arsenic) present in environmental systems are of high priority since they have been recognised as significant pollutants [1].

Monitoring low levels of lead in the environment has received much attention as consequence of being serious cumulative body poison and it is capable to enter through air, water and food. This metal exhibits severe deleterious effects on human. In particular, it strongly affects the mental and physical development of children [2]. Acute lead poisoning in humans causes severe damage in the liver, brain, kidneys, reproductive system and central nervous system and sometimes causes death. Mild lead poisoning causes anemia, headache and the victim may feel fatigued and irritable. Besides, chronic exposure to lead causes nephritis, scarring and the shrinking of kidney tissues.

Therefore, several methods have already been developed for the determination of lead in water samples. We can quote the analytical techniques like neutron activation analysis (NAA) or X-ray fluorescence analysis, but mainly those methods based on atomic absorption and emission spectroscopy are the most widely used for this purpose. Flame absorption atomic spectroscopy (FAAS) and inductively coupled plasma emission spectroscopy (ICP-OES)

have high detection limit for lead determination and preconcentration procedures are required [3]. Electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS) has been extensively used for determination of lead in several samples because of the high sensitivity achieved. In the same sense, inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) has high sensitivity and wide linear dynamic range [4]. Nevertheless, several problems occur due to the important interference effects of dissolved salts and polyatomic interferences for water samples with an elevated saline content, as seawater [5], and a preconcentration/separation step is almost always required [3,6]. Removing the saline matrix before analysis consumes a lot of time and is not suitable for routine analysis. In addition, over manipulation can increase sample contamination.

In recent years, stripping voltammetry techniques, particularly anodic (ASV) and adsorptive cathodic (AdCSV) stripping voltammetry, are very useful methods to determine trace elements in natural waters. They provide speed of analysis, good selectivity and sensitivity, excellent accuracy and precision, low costs of instrumentation and maintenance compared with other techniques, the possibility of simultaneous analysis of mixtures and good performance with saline matrices like seawater and estuarine water samples [7].

AdCSV applies metallic complexes formation adsorbed on the working electrode prior to the voltammetric scan in order to develop analysis methods with higher levels of sensitivity than ASV; furthermore, the formation of intermetallic compounds at the mercury electrode is avoided [8,9]. Besides, it allows speciation studies based on ligand competition to be accomplished. Therefore, AdCSV

* Corresponding author. Tel.: +34 956 016362; fax: +34 956 016460.

E-mail address: dolores.galindo@uca.es (M.D. Galindo-Riaño).

Table 1
Analytical features of different methods using AdCSV for determination of lead.

Ligand	LOD (nM)	RSD (%)	Linear range (nM)	Application	Reference
8-Hydroxyquinoline	0.3	18	0–60	Sea water	Van den Berg [10]
Calcein blue	0.04	–	0–100	Fresh water	Yokoi et al. [12]
Dimethylglyoxime and 8-hydroxyquinoline	0.18	10.0	0–2.5	Sea water	Colombo and van den Berg [8]
Calcein blue	0.1	–	0–10	Lake water	Fisher et al. [13]
Pyrogallol red	0.3	3.6	0.5–145	River and tap water	Ensafi et al. [14]
Morin	0.4	–	1.5–386	Tap water	Shams et al. [15]
Xylenol orange	4.8	2.0	24–724	Tap and river water	Ensafi et al. [11]
2-Acetylpyridine salicyloylhydrazone	0.17	1.20	2.4–145	Sea water	This paper

shows attractive potentialities for its application to analysis of trace and ultratrace metal in water.

Some organic reagents have been studied for the adsorption of complex with lead on the hanging mercury drop electrode (HMDE) and applied to environmental samples. It has been previously described the use of oxine (8-hydroxyquinoline) [10], a combination of DMG (dimethylglyoxime) and oxine [8], xylenol orange [11], calcein blue (8-[*N,N*-bis(carboxyl-methyl)aminomethyl]-4-methylumbelliferone) [12,13], PGR (pyrogallol red) [14], morin [15] as complexing agents for the voltammetric determination of lead.

For the first method [10], the selectivity was not good and Pb peak was affected by interference of copper. Colombo and van den Berg [8] used a combination of DMG and oxine for several trace metals determination in seawater, but linear range of application for lead was very small (0–2.5 nM). Linear range was increased to 24–724 nM for xylenol orange method [11] but the detection limit was high (4.8 nM Pb), being applied to tap and river water. Methods with calcein blue [12,13] showed a good limit of detection (0.04 nM Pb [12] and 0.1 nM Pb [13]) but they were not applied to complex environmental matrices, only for fresh water and lake water. Pb AdCSV with PGR [14] was applied to river and tap water with detection limit of 0.3 nM Pb. Recently, Shams et al. [15] used morin for Pb analysis from tap water and artificial synthetic mixtures of alloys with a good detection limit (0.4 nM) but with less linear range of application than that obtained with xylenol orange (linear range of 1.5–386 nM Pb). Table 1 includes the analytical features of these methods.

In this work, lead analysis by AdCSV employing 2-acetylpyridine salicyloylhydrazone (2-APSH) as organic reagent is proposed and applied to water samples like seawater. This reagent has been used previously as chelating agent for determination of cadmium by cathodic adsorptive stripping voltammetry and applied satisfactorily to estuarine water [16]. 2-APSH is an aroylhydrazone studied in previous works. They were regarded to spectral and metalochromic properties of 2-APSH as well as electrochemical properties by direct current polarography (DCP), differential pulse polarography (DPP) and alternating current polarography (ACP), showing interesting properties as complexing agent of metal ions [17]. The influence of variables on the peak current was studied by using exploratory (Plackett–Burman) and sequential (Simplex) experimental designs to detect significant variables and to obtain optimal conditions, respectively.

2. Experimental

2.1. Apparatus

Stripping measurements were obtained with a Metrohm 757 VA Computrace Stand (Metrohm, Switzerland) with automated hanging mercury drop electrode as working electrode. The cell also included an Ag/AgCl reference electrode (saturated with 3 M KCl) and a platinum wire as auxiliary electrode. The stand was controlled by PC software VA Computrace 2.0 installed in a personal computer using a 5326 VA Computrace Interface (Metrohm, Switzerland).

Organic matter was removed for real water samples by UV irradiation with a Metrohm model 705 UV Digester (Metrohm, Switzerland) in quartz tubes. A model 2001 pH-meter equipped with 52-02 combined glass-Ag/AgCl electrode (Crison, Spain) was used for pH measurements.

A Unicam Helios Gamma&Delta (Unicam Limited, UK) spectrophotometer was used for UV–vis spectroscopic measurements with 1 cm quartz glass cells (1 cm × 1 cm × 4.5 cm), for determining the stoichiometry of lead complex formed in AdCSV experiments.

2.2. Cleaning protocol

Because of high sensitivity of proposed AdCSV method for analysis of lead, a strict protocol was followed to avoid contamination of solutions and samples.

Low-density polyethylene bottles (LDPE, Nalgene) and polystyrene flasks were acid cleaned and used to store samples and reagent solutions.

Sample handling and preparation of solutions were performed using polyethylene gloves under a class 100 laminar flow hood cabinet Crusair model 9005-FL (Cruma, Spain). All the clean material was kept in plastic bags to avoid lab air pollution.

Water was purified by reverse osmosis with an Elix 3 (Milli-RO) system followed by ion exchange with an 18 M Ω cm⁻¹ deionised Milli-Q⁵⁰ system (Millipore, USA).

2.3. Reagents and solutions

All reagents were of analytical-reagent or Suprapur grade and all solutions were prepared using Milli-Q deionised water (Millipore, USA) and distilled or extrapure ethanol (Scharlab, Spain). During voltammetric analysis, solutions were deoxygenated with high purity nitrogen (Air Liquide, Spain) prior to each experiment.

Stock aqueous solutions of Pb(II) were prepared weekly by dilution of Pb standard solution of 1000 mg l⁻¹ (Merck, Darmstadt, Germany) in 0.06 M HNO₃. 2-APSH reagent was synthesised by reaction between 2-acetylpyridine and 2-hydroxybenzohydrazide from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany) as previously reported [17]. A 2 × 10⁻⁴ M stock solution of 2-APSH in extrapure absolute ethanol was prepared weekly and stored at 4 °C in darkness.

Britton–Robinson buffer solutions were used to adjust the pH (range 2–12) during the optimization of the method. These solutions were prepared according to previously reported [18], using *o*-boric acid, *o*-phosphoric acid, acetic acid and sodium hydroxide (Merck); constant ionic strength of 1.5 M was obtained by adding KCl. Ammonium acetate buffer was prepared using 1 M NH₄Ac and 0.5 M HCl, purchased from Merck, and used to adjust the pH at optimal conditions. Both reagents were of Suprapur grade.

LGC 6016 Certified reference estuarine water supplied by LGC Promochem SL (Spain) was chosen for validation of the proposed method.

The proposed method was applied to real surface water samples from coast of Huelva (southwest of Spain). Samples were filtered through 0.45 μ m pore size filters, acidified with HNO₃ of Suprapur

grade (Merck) and stored until application of the method. Before analysis, organic matter of samples was destroyed by adding of 0.02 M hydrogen peroxide Suprapur (Merck) and UV digestion during 2 h.

2.4. General procedure

The sample solution (25 mL) containing $(0.5\text{--}50) \times 10^{-6}$ M 2-APSH, 0.12 M Britton–Robinson buffer (pH 2–12) for optimization experiments or 0.08 M ammonium acetate buffer (pH 5.6) for optimum conditions, and Pb(II) ion was pipetted into the voltammetric cell. In all cases, the solution contained 1.25 mL ethanol (from 2-APSH solution and/or extrapure absolute ethanol) to keep up the dielectric constant. The stirrer was switched on and the solution was purged with nitrogen gas for 100 s. After forming a new HMDE, deposition began according to conditions determined for each experiment. Then, the stirring was stopped and the solution was left settle for an equilibration time of 5 s and after that, the voltammogram was recorded by applying a negative-going differential pulse scan. Scans of each experiment were repeated twice with a new hanging drop.

Statistical analysis was performed using The Unscrambler 7.01 [19] for factorial design (Plackett–Burman design) and MultiSimplex 2.0.4 [20] for the modified simplex method.

3. Results and discussion

2-APSH is an aroylhydrazone characterized by the presence of the triatomic group C=N–N, forming coordination compounds with transition metal ions, being noteworthy for its remarkable versatility as chelating agent [17]. Pb(II) is complexed by 2-APSH and the suitability of this ligand for the proposal of a new AdCSV method for lead analysis was examined. Preliminary studies showed that depending on the pH, a peak of Pb(II)–2-APSH complex appeared, whilst one peak corresponding to a reduction process of 2-APSH also appeared but at more negative potential without overlapping between them. Fig. 1 displays cathodic stripping differential pulse voltammograms for the following solutions: (a) 49.5 nM Pb(II) at pH 5.6 without 2-APSH; (b) 9×10^{-6} M 2-APSH at pH 5.6 without metal; and (c) 49.5 nM Pb(II) with 9×10^{-6} M 2-APSH at pH 5.6. The solution containing the metal ion without 2-APSH showed a small peak current. With the addition of 2-APSH to Pb(II) solution, a larger stripping peak was registered at about -0.488 V, showing the adsorptive characteristics of the complex. The blank solution

Table 2

Selected levels for each factor of the Plackett–Burman design.

Parameter	Symbol	–1	0	+1
pH	pH	6	7	8
Deposition voltage (V)	E_d	–0.25	–0.35	–0.45
Deposition time (s)	t_d	60	90	120
Pulse amplitude (V)	P	–0.04	–0.07	–0.1
Voltage step (V)	U_s	0.004	0.008	0.012
Time interval for voltage step (s)	t_s	0.2	0.6	1

(2-APSH without metal) did not show peak current in the measure potential.

The continuous variation (Job's method) and the molar ratio methods were applied to establish the stoichiometry of the complex formed during AdCSV process. Visible spectrophotometry measurements of 9:1 aqueous-ethanolic solutions of Pb(II) chelate buffered at pH 5.6 were made at 410 nm. The lead/ligand ratio obtained was 1:1.

3.1. Optimization of parameters

A set of preliminary experiments was performed to study the electrochemical behaviour of the Pb(II)–2-APSH complex and to acquire information about chemical and instrumental variables using the univariate model. Significant parameters were subsequently optimized.

A two-stage study was accomplished for the optimization of variables: a Plackett–Burman exploratory design used to select the most significant variables and a modified simplex method with selected variables to obtain the optimum conditions.

The Plackett–Burman design is a powerful technique for screening important variables and it has been successfully used by many workers [21,22]. A total of six variables were studied in eleven experiments with three repetitions of the central point and two replicates for each experiment. The variables were represented at three levels, high, medium and low, denoted by (+1), (0), (–1), respectively. Selected levels of the studied variables on the exploratory design according to preliminary experiments are shown in Table 2. No significant parameters were kept fixed: pulse time (t_p), 0.04 s; drop size (d_s), 9 a.u.; stirring speed (r_s) 2000 rpm; buffer concentration (Britton–Robinson), 0.12 M; and volume of sample solution, 25 mL. For this design, 4×10^{-6} M 2-APSH and 19.3 nM Pb(II) concentrations were used. The response variable evaluated with the Plackett–Burman design was the intensity of the measurement of lead–2-APSH complex peak. The matrix and results of the Plackett–Burman design and Pareto chart are shown in Table 3 and Fig. 2. Following conclusions were obtained from the effects analysis for the studied variables: pulse amplitude, deposition time and deposition voltage showed positive significant effects over the peak high of the metal complex with P -value < 0.001 ; pH and time interval for voltage step exhibited negative effects with

Table 3

Design of screening (Plackett–Burman) experiment: factor levels and response values (solutions containing 19.3 nM Pb(II) and 4×10^{-6} M 2-APSH).

Experiment	pH	P	t_s	U_s	t_d	E_d	I_p Pb (–nA)	SD ($n=2$)
1	+1	+1	+1	–1	+1	–1	–	–
2	–1	+1	+1	+1	–1	+1	5.63	0.71
3	–1	–1	+1	+1	+1	–1	2.11	0.11
4	+1	–1	–1	+1	+1	+1	3.81	0.18
5	–1	+1	–1	–1	+1	+1	11.59	0.76
6	+1	–1	+1	–1	–1	+1	1.05	0.08
7	+1	+1	–1	+1	–1	–1	–	–
8	–1	–1	–1	–1	–1	–1	2.76	0.00
9a	0	0	0	0	0	0	1.33	0.53
9b	0	0	0	0	0	0	0.98	0.06
9c	0	0	0	0	0	0	0.92	0.12

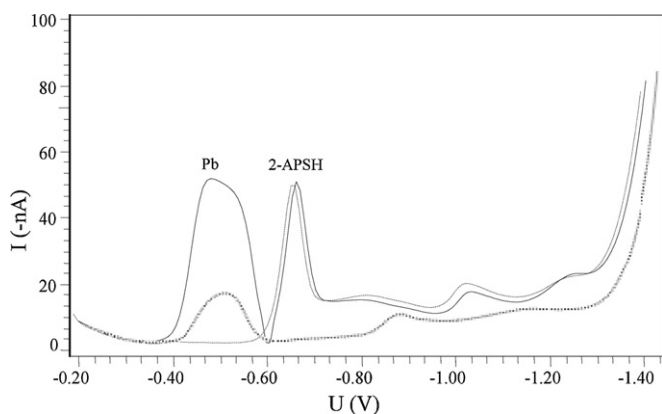


Fig. 1. Differential pulse voltammograms of: (a) 49.5 nM Pb(II) at pH 5.6 without 2-APSH (.....); (b) 9×10^{-6} M 2-APSH at pH 5.6 without metal (---); and (c) 49.5 nM Pb(II) with 9×10^{-6} M 2-APSH at pH 5.6 (—). Experimental conditions: pH 5.6; deposition time 120 s; deposition voltage -0.552 V; pulse amplitude -0.1 V; voltage step 0.0083 V and time interval for voltage step 0.87 s.

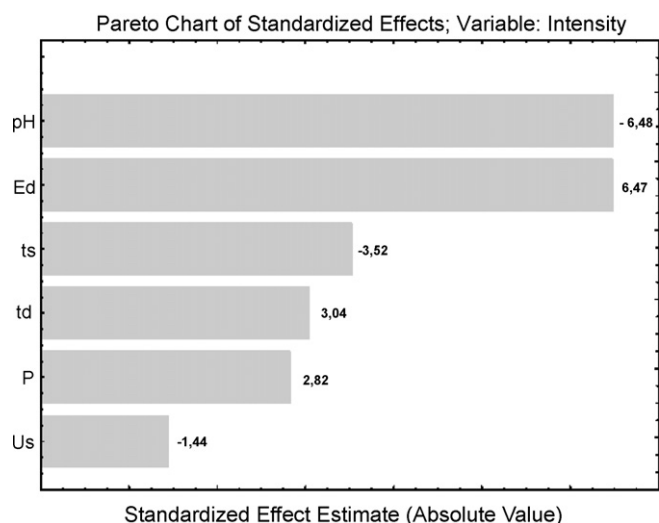


Fig. 2. Pareto chart for Plackett–Burman design for intensity of measurement of Pb(II)-2-APSH complex peak.

the same P -value; and voltage step showed similar behaviour with $0.001 < P\text{-value} < 0.01$. Few experiments stood out slight no reproducible peak currents.

As a consequence of the design results, pulse amplitude was set at maximum equipment value (-0.1 V). The increase of deposition time usually results in a better voltammetric peak, but 120 s was selected for following experiments to have not very long analysis time, being a high value but not too much. Remaining variables showed high significant effects, principally pH, E_d and t_s , being very interesting their study using a sequential optimization technique.

Therefore, variables above mentioned were kept fixed, whilst a modified simplex with selected significant variables was carried out (Table 4). The selection of the initial simplex (vertices 1–5) was software-performed by assignment of a reference value and a step size for each variable using the previous known behaviour of the system, being pH: 5–7; deposition voltage: (-0.350) – (-0.550) V; voltage step: 0.0040–0.0120 V; and time interval for voltage step: 0.20–1.00 s. Sequential vertices were calculated by evaluating two

Table 4

Simplex design with significant variables and values for two responses: stripping peak intensity and standard deviation of current (solutions containing 19.3 nM Pb(II) ion and 4×10^{-6} M 2-APSH).

Vertex	Type	pH	E_d (V)	U_s (V)	t_s (s)	I_p Pb (–nA)	SD ($n=4$)
1	F	5	–0.350	0.0040	0.20	2.12	0.06
2	F	7	–0.350	0.0120	0.20	1.70	0.06
3	F	7	–0.350	0.0040	1.00	1.43	0.20
4	F	5	–0.550	0.0120	1.00	6.79	0.22
5	F	7	–0.550	0.0040	0.20	7.66	0.38
6	R	5	–0.550	0.0120	–0.20	*	*
7	C–	6.5	–0.400	0.0060	0.70	7.77	0.29
8	R	4.8	–0.575	0.0010	0.85	9.92	0.17
9	E	3.6	–0.688	–0.0045	1.18	*	*
10	R	6.7	–0.688	0.0075	1.18	16.15	0.66
11	E	7.5	–0.856	0.0092	1.66	5.58	0.18
12	R	7.5	–0.556	–0.0027	0.46	*	*
13	C–	5.6	–0.552	0.0083	0.87	17.25	0.23
14	R	4.8	–0.557	0.0074	1.60	15.23	0.08
15	R	4.5	–0.786	0.0061	1.55	7.44	0.29
16	C–	6	–0.496	0.0060	0.91	13.40	0.10
17	R	6.8	–0.572	0.0136	1.43	10.44	0.53
18	C+	6.3	–0.572	0.0105	1.28	13.44	0.13
19	R	5.7	–0.689	0.0109	1.55	15.81	0.17
20	R	5.1	–0.671	0.0066	1.32	11.60	0.31
21	C–	6	–0.597	0.0095	1.29	15.86	0.17

F: first simplex; R: reflexion; E: expansion; C+: positive contraction; C–: negative contraction; *: not possible.

response variables: considering the enhancement of the Pb(II)-2-APSH complex peak (high influence) and the improvement of the reproducibility of the signal obtained by minimizing the standard deviation of four replicates (medium influence). The simplex was stopped using the variance criterion. This criterion compares the variance of each simplex (five experiments with four freedom degrees) with the variance of the proposed method by calculating the corresponding F -values [23]. The variance of the method was obtained from voltammetric signal of five replicates (four freedom degrees) of experiment number 13, being 1.22. The simplex was stopped after 14 simplex (21 experiments) (tabulated F -value = 1.00 for $p = 0.5$) being the last simplex performed by 10, 13, 14, 19 and 21 vertices. Estimate of response variance from these replicate experiments of the last simplex was 0.55.

Optimum conditions were obtained for trial 13 as following conditions: pH 5.6, -0.552 V for deposition voltage, 0.0083 V for voltage step and 0.87 s for time interval for voltage step.

3.2. Influence of ligand concentration

The effect of 2-APSH concentration on the stripping peak current of Pb(II)-2-APSH complex in aqueous solutions containing 49.5 nM Pb(II), applying the proposed method, was also studied. The obtained results are shown in Fig. 3. Adsorption appears to be enhanced with increasing 2-APSH/Pb ratio, reaching a maximum values ranged 60:1–600:1 ratios. At high ligand concentrations, the current decreases as the concentration of the ligand increased, implying that the activity of the electrode can decrease due to the full coverage of the electrode, since the ligand may be adsorptive on the electrode, competing with the metal-ligand complex [24].

3.3. Analytical performance characteristics of the method

Under the optimum conditions (pH 5.6, -0.552 V for deposition voltage (E_d), 0.0083 V for voltage step (U_s) and 0.87 s for time interval for voltage step (t_s)), the peak current was found to increase linearly with the lead concentration between 2.4 and 145 nM. A calibration graph was obtained with eleven concentration levels with duplicate analysis, employing 9×10^{-6} M reagent concentration and 0.08 M buffer concentration (ammonium acetate). Other parameters were: pulse amplitude (P) of -0.1 V, a deposition time (t_d) of 120 s, a pulse time (t_p) of 0.04 s, a drop size (d_s) of 9 a.u. and a stirring speed (r_s) of 2000 rpm. The correlation coefficient and equation of the linear regression were $R^2 = 0.9988$ and $I_p(-nA) = 1.5227 + 1.016 C$ (nM), respectively (Fig. 4).

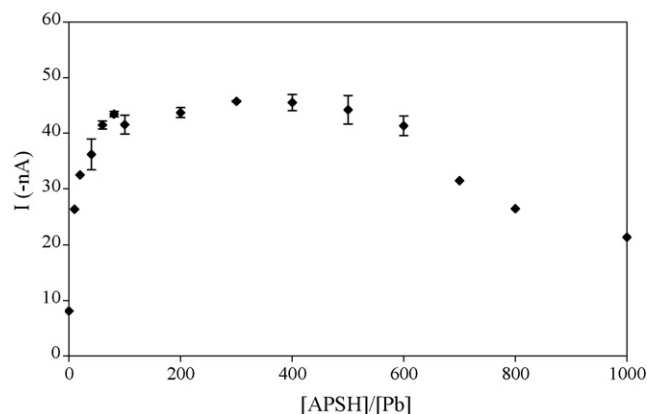


Fig. 3. Effect of 2-APSH concentration on the stripping peak current of Pb(II)-2-APSH complex in solutions containing 49.5 nM Pb(II). Experimental conditions: pH 5.6; deposition time 120 s; deposition voltage -0.552 V; pulse amplitude -0.1 V; potential step 0.0083 V and time interval for voltage step 0.87 s ($n=2$).

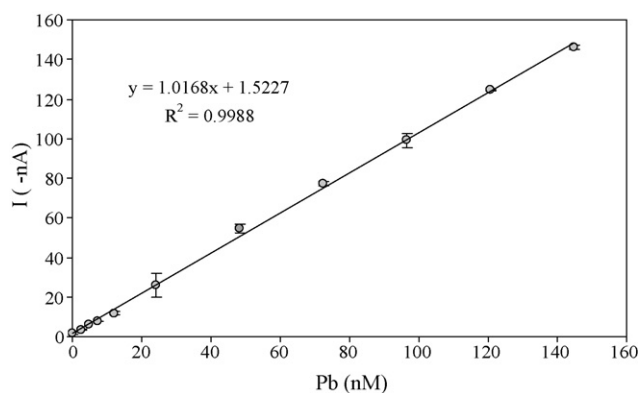


Fig. 4. Calibration graph for Pb(II) at optimum conditions (pH 5.6, -0.552 V for deposition voltage, 0.0083 V for voltage step and 0.87 s for time interval for voltage step) ($n = 2$).

Table 5
Study of interferences by inorganic salts for the lead determination in solutions containing $21.3 \text{ nM} \pm 2.0 \text{ nM}$ Pb(II).

Interference	Concentration	Pb(II) recovery (%)
NaCl	23.94 g l^{-1}	103.8
MgCl ₂	10.83 g l^{-1}	106.6
Na ₂ SO ₄	3.99 g l^{-1}	102.3
CaCl ₂	1.49 g l^{-1}	95.2
KCl	0.677 mg l^{-1}	102.6
NaHCO ₃	196 mg l^{-1}	92.7
KBr	98 mg l^{-1}	107.1
H ₃ BO ₃	27 mg l^{-1}	107.9
SrCl ₂	24 mg l^{-1}	96.6
NaF	3 mg l^{-1}	104.1

Table 6
Study of interferences by trace metals for the lead determination in solutions containing $21.3 \text{ nM} \pm 2.0 \text{ nM}$ Pb(II).

Interference	Concentration (nM)	Pb(II) recovery (%)
V(V)	100	101.7
Fe(III)	100	104.6
Cu(II)	100	97.3
Zn(II)	100	104.0
Al(III)	100	103.7
Mn(II)	100	96.7
Ni(II)	100	105.5
Co(II)	3	109.2
Pd(II)	3	98.5
Bi(III)	3	98.3
Cd(II)	3	94.8
Tl(I)	3	106.0

Detection limit, calculated according $DL = 3\sigma/m$ [25], where σ is the S.D. of the blank and m the slope of the calibration curve, was found to be 0.17 nM . The quantification limit (QL), calculated as $QL = 10\sigma/m$ [25], was 0.58 nM . By increasing the deposition time these values can be further improved.

The repeatability of the method was evaluated through the relative standard deviation (RSD) of five replicates measurements of a solution containing 17.3 nM of Pb(II) ions. The adsorptive accumu-

Table 7
Determination of Pb(II) in certified reference water (LGC 6016, estuarine water) and real seawater (from Spain southwest coast) by the proposed AdCSV method ($n = 4$).

Sample	Pb(II) concentration	Pb found by proposed method	Relative error (%)
LGC 6016 (estuarine water)	$196 \pm 3 \mu\text{g kg}^{-1a}$	$191.8 \pm 2.3 \mu\text{g kg}^{-1}$	-2.15
Seawater 1	$15.9 \pm 1.0 \text{ nM}^b$ ($3.3 \pm 0.2 \mu\text{g l}^{-1}$)	$15.2 \pm 0.2 \text{ nM}$ ($3.14 \pm 0.04 \mu\text{g l}^{-1}$)	-4.40
Seawater 2	$21.7 \pm 0.5 \text{ nM}^b$ ($4.5 \pm 0.1 \mu\text{g l}^{-1}$)	$22.1 \pm 0.2 \text{ nM}$ ($4.57 \pm 0.04 \mu\text{g l}^{-1}$)	+1.84

^a Certified value as $\mu\text{g kg}^{-1}$.

^b Determination by ASV [26].

lation of the Pb(II)-APSH complex under the optimized conditions resulted in reproducible measurements with RSD value of 1.20%. These results have been compared with those obtained with other ligands (Table 1). This novel method provides a low limit of detection and a wide linear range of application.

3.4. Interference studies

Possible interference by matrix of water samples with the cathodic adsorptive stripping voltammetry of lead was investigated by addition of different inorganic salts present in seawater to a solution containing 21.3 nM of Pb(II) using the proposed method. In this way, the most complex matrix for natural water was studied, because seawater contains higher saline concentrations than fresh water. Furthermore, the influence of other trace metals present in seawater was evaluated at higher concentrations than usually found in this sample. The quantification was accomplished by the standard addition method. The results of this study are summarized in Tables 5 and 6. From the results, it can be concluded that the method was free from interferences of inorganic salts and trace metals. Zn(II), Ni(II) and V(V) showed adsorptive accumulation of the metal-APSH complex at -1.00 , -0.70 and -0.86 V respectively, using the proposed method for Pb(II), but they were not interfering the determination of lead. These results show the possibility of suitable multi-elemental analysis using 2-APSH by AdCSV.

3.5. Validation of the proposed method and real seawater sample analysis

The accuracy of the method was evaluated by the determination of Pb(II) in a LGC 6016 certified reference estuarine water. The method was also applied successfully to the analysis of Pb(II) in two real seawater samples collected from the southwest coast of Spain. Samples were analysed by stripping voltammetry after UV digestion procedure for organic matter removal. The quantification was accomplished by the standard addition method.

The results (Table 7) showed a very good agreement between the experimental and certified values for reference water with a relative error of -2.15% . Measurements of Pb(II) ions in two seawater samples obtained by the proposed method (Table 7) were compared with those obtained by differential pulse anodic stripping voltammetry (DPASV) (Application Bulletin No. 231/1 e; B12916, Metrohm) [26]. The relative errors were -4.40% and $+1.84\%$, respectively. In both studies, significant differences at 95% confidence limit were not found.

4. Conclusion

The present study shows that the adsorptive cathodic stripping voltammetry of Pb(II) ions in the presence of 2-APSH is a suitable method for determination of trace amounts of this metal in natural water. This new method for lead offers a large number of advantages compared with other methods for metal analysis, such as a low limit of detection, a wide linear range of application and the application to water samples with high saline matrix like seawater and estuarine water.

Acknowledgement

The authors acknowledge the support of this research by Ministry of Science and Technology (Project REN 2003-09361CO3-02).

References

- [1] P. Apostoli, R. Cornelis, J. Duffus, P. Hoet, D. Lison, D. Templeton, Monographs on elemental speciation in human health risk assessment (environmental health criteria; 234), World Health Organization (WHO Press), Geneva Switzerland, 2006.
- [2] R.L. Boeckx, *Anal. Chem.* 58 (1986) 274 A.
- [3] M. Soylyak, I. Narin, M.A. Bezerra, S.L. Costa Ferreira, *Talanta* 65 (2005) 895.
- [4] D. Rahmi, Y. Zhu, E. Fujimori, T. Umemura, H. Haraguchi, *Talanta* 72 (2007) 600.
- [5] I. Jomjarova, R. Blust, *Anal. Chim. Acta* 576 (2006) 221.
- [6] S. Saracoglu, M. Soylyak, D.S. Kacar Peker, L. Elci, W.N.L. dos Santos, V.A. Lemos, S.L.C. Ferreira, *Anal. Chim. Acta* 575 (2006) 133.
- [7] P. Zuman, *Electroanalysis* 12 (2000) 1187.
- [8] C. Colombo, C.M.G. van den Berg, *Anal. Chim. Acta* 337 (1997) 29.
- [9] J.Y. Jin, F. Xu, T. Miwa, *Electroanalysis* 12 (2000) 610.
- [10] C.M.G. van den Berg, *J. Electroanal. Chem.* 215 (1986) 111.
- [11] A.A. Ensafi, T. Khayamian, A. Benvidi, E. Mirmomtaz, *Anal. Chim. Acta* 561 (2006) 225.
- [12] K. Yokoi, A. Yamaguchi, M. Mizumachi, T. Koide, *Anal. Chim. Acta* 316 (1995) 363.
- [13] E. Fischer, C.M.G. Van den Berg, *Anal. Chim. Acta* 432 (2001) 11.
- [14] A.A. Ensafi, T. Khayamian, M. Atabati, *Talanta* 59 (2003) 727.
- [15] E. Shams, A. Babaei, M. Soltaninezhad, *Anal. Chim. Acta* 501 (2004) 119–124.
- [16] J.A. Jurado-González, M.D. Galindo-Riaño, M. García-Vargas, *Anal. Chim. Acta* 487 (2003) 229–241.
- [17] M. Garcia-Vargas, M. Milla, J.L. Hidalgo, J.M. Bautista, *Spectrochim. Acta* 43 (1987) 355.
- [18] C. Mongay, V. Cerda, *Anal. Chim.* 64 (1977) 23.
- [19] The Unscrambler 7.01, CAMO ASA, 1986–1998.
- [20] MultiSimplex, version 2.0.4, MultiSimplex AB (publ.), Karlskrona, Sweden, 1998.
- [21] P. Kumar, T. Satyanarayana, *Bioresour. Technol.* 98 (2007) 1252.
- [22] K. Chauhan, U. Trivedi, K.C. Patel, *Bioresour. Technol.* 98 (2007) 98.
- [23] C.K. Bayne, I.B. Rubin, *Practical experimental designs and optimization methods for chemists*, VCH Publishers, Deefiel Beach, FL, 1986, p. 205.
- [24] J. Limson, T. Nyokong, *Anal. Chim. Acta* 344 (1997) 87.
- [25] M. Valcárcel, *Principios de Química Analítica*, Springer, Barcelona, 1999, pp 80.
- [26] Metrohm. Determination of zinc, cadmium, lead, copper, thallium, nickel and cobalt in water samples after DIN 38406 E16. Application Bulletin No. 231/2 e; B12916, 1990, 6 pp (http://www.metrohm.com/infocenter/download.php4?doc=applications/bulletins/pdf_e/231_e.PDF).

Applicability of 2-Hydroxybenzaldehyde Benzoylhydrazone in the Determination of Trace Metals by Adsorptive Cathodic Stripping Voltammetry: Relevancy of Simultaneous Determinations

Estrella ESPADA-BELLIDO, M. Dolores GALINDO-RIAÑO,[†] Abdellah AOUARRAM, and Manuel GARCÍA-VARGAS

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Cadiz, P. O. Box 40, Campus Río S. Pedro, Puerto Real, Cádiz 11510, Spain

The applicability of 2-hydroxybenzaldehyde benzoylhydrazone (2-HBBH) for determining Cd(II), Cu(II), Pb(II) and Bi(III) ions by adsorptive cathodic stripping voltammetry was studied. The sensitivity of metal reduction peak currents was highly enhanced with the addition of 2-HBBH to metallic solutions, showing the adsorptive characteristics of the complexes. Variable factors affecting the response (mainly: the influences of pH, supporting electrolyte and deposition potential on selectivity and sensitivity) were investigated. Limits of detection suitable for trace analysis were obtained: 0.28 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Cd(II) at pH 10; 0.026 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Pb(II) at pH 9; 0.285 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Bi(III) at pH 8 and 0.051 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Cu(II) at pH 9.5. Simultaneous determinations of two groups of elements, consisting of Cd(II)-Pb(II)-Cu(II) and Cd(II)-Pb(II)-Bi(III), at pH 9.5 and 9, respectively, were described with good resolution and sensitivities. Metals were quantified at concentrations in the range from 0.5 to 14 $\mu\text{g L}^{-1}$. The RSD at a concentration level of 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ of metal was 4.28% for Cd(II), 2.99% for Pb(II), 4.82% for Bi(III) and 1.35% for Cu(II). The method was applied to the simultaneous determination of metals in certified reference water (TMDA-62) and in synthetic water samples with satisfactory results.

(Received March 3, 2008; Accepted September 24, 2008; Published July 10, 2009)

Introduction

Electroanalytical procedures have been proposed for the determination of trace metals because they can be a valid option in the multicomponent analysis of several species; they can also be used for natural water, especially seawater.¹ The sensitivity and selectivity of these methods can be improved either by the introduction of new types of electrodes or by the development of new analysis procedures. Electrochemical methods include stripping voltammetric techniques, principally anodic stripping (ASV) and adsorptive cathodic stripping (AdCSV) voltammetry,² which show numerous advantages, such as minimum sample pretreatment, high speed of analysis, good performance with saline matrix, low cost, and good selectivity and sensitivity.³

The development of AdCSV methods has allowed the determination of many trace metals; this was not limited to amalgam-forming elements such as ASV.⁴ The method is based on the interaction between metal ion and a ligand, followed by the accumulation of the complex onto the electrode surface, from which it is subsequently stripped during the cathodic voltammetric scan. The ligand forms a complex with the target metal, which is adsorbed and later reduced on the electrode. The adsorption of the complex is often related to the solubility.⁵ In addition, the size of the metal complex determines the surface coverage, and thus the sensitivity. Therefore, it is necessary to study the applicability of new ligands that may increase the

sensitivity and selectivity of trace metal ion determinations.

A possible limitation of AdCSV is that sometimes only one or two metals can be determined in a single scan, depending on the metal specificity of the ligand used for the determinations.⁴ Because of the great sensitivity enhancement obtained with AdCSV methods, several complexing agents have been studied for use during the adsorptive collection of complexes, but there are only few studies about simultaneous metal determination.⁵⁻⁸ These proposed methods use different ligands: for example, dimethyl glyoxime⁸ to detect Co, Zn, Cd and Ni, but with high detection limits (2.3 - 5.1 $\mu\text{g L}^{-1}$) or substituted catechols⁵ that lack much sensitivity (>5 $\mu\text{g L}^{-1}$). Moreover, a mixture of ligands has been proposed for the multi-elemental determinations of several elements (Cu, Pb, Cd, Ni, Co and Zn) in seawater.⁴ The detection limits of 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Cu(II), 0.4 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Pb and 0.12 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Cd were obtained using dimethyl glyoxime and 8-hydroxyquinoline as ligand by AdCSV. Therefore, there is a great interest in developing new ligands with adequate complexing properties, which may perform the simultaneous determination of several metals at trace levels.

Hydrazones are important chelating agents because of their donor properties in coordinating metals and their ability to behave as polydentate ligands in neutral and deprotonated forms. They are widely employed for the spectrophotometric or fluorometric determination of metals,⁹ being good analytical reagents due to their metallochromic properties.¹⁰ Because of their interesting properties, they can be applied in the determination of heavy metals by AdCSV.³

The present paper researches the AdCSV of heavy metal complexes with a new reagent, 2-hydroxybenzaldehyde

[†] To whom correspondence should be addressed.
E-mail: dolores.galindo@uca.es

benzoylhydrazone (2-HBBH). This reagent was selected because it is one of the important Schiff bases; it can react with a large variety of transition metal cations¹¹⁻¹³ and can form numerous complexes. Different metals such as Cu(II), Pb(II), Cd(II) and Bi(III) produced electrochemical signals using 2-HBBH by AdCSV. Therefore, the possibility of the simultaneous determination of several metals was also studied.

These toxic metals are significant for environmental surveillance and biological interest, as they can be bound to natural ligands. Due to their toxicity, even at low concentrations, Pb and Cd are key elements; however, Cu and Bi are important as they may play a vital or a toxic role, depending on their concentrations and the nature of the organisms considered. In addition, it has been recognized that the bioavailability of trace metals depends on their chemical speciation; AdCSV can provide the best information on the metal complexing capacity.¹⁴ Therefore, the measurements of metal concentrations are essential and there is a huge potential for developing voltammetric environmental trace-metal analysis, particularly in the aquatic matrix field where other techniques are much more limited.¹⁵

Experimental

Apparatus

Stripping voltammetry measurements were obtained by means of a Metrohm 757 VA Computrace Stand (Metrohm, Switzerland) with an automated hanging mercury drop electrode as working electrode. The cell also included an Ag/AgCl reference electrode (saturated with 3 mol L⁻¹ KCl) and a platinum wire as auxiliary electrode. The stand was controlled by the PC software VA Computrace 2.0 installed in a personal computer using a 5326 VA Computrace Interface (Metrohm, Switzerland).

Cleaning protocol

Because of the high sensitivity of the proposed AdCSV method for analysis of trace metals, a strict protocol was followed in order to avoid contamination of solutions and samples. Low-density polyethylene bottles (LDPE, Nalgene) and polystyrene flasks were used to store samples and reagent solutions. They were acid cleaned by soaking sequentially with detergent solution, water and 2 mol L⁻¹ HNO₃ for one week; as a final step, they were rinsed several times with ultra pure water.

Sample handling and preparation of solutions were performed using polyethylene gloves under a class 100 laminar flow hood cabinet Crusair Model 9005-FL (Cruma, Spain). All the clean material was kept in plastic bags in order to avoid lab air pollution.

Water was purified by reverse osmosis with an Elix 3 (Milli-RO) system followed by ion exchange with an 18 MΩ cm⁻¹ deionized Milli-Q⁵⁰ system (Millipore, USA).

Reagents and solutions

All reagents were of analytical-reagent or Suprapur grade and all solutions were prepared using Milli-Q deionized water (Millipore, USA) or distilled ethanol. During voltammetric analysis, solutions were deoxygenated with high purity nitrogen (Nitrogen 5.0, Air Liquid, Spain) prior to each experiment.

Stock aqueous solutions of Cd(II), Pb(II), Bi(III) and Cu(II) were prepared each week by dilution of a standard solution of 1000 mg L⁻¹ (Merck, Darmstadt, Germany) in 0.06 mol L⁻¹ HNO₃.

2-HBBH was synthesized by the reaction between 2-hydroxybenzaldehyde (2-HB) and benzoylhydrazone (BH)

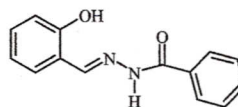


Fig. 1 2-Hydroxybenzaldehyde benzoylhydrazone (2-HBBH).

purchased by Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). An ethanolic solution of 2-HB (1 mL in 20 mL) and an aqueous solution of BH (1.11 g in 30 mL) were mixed. The complex formed by condensation was filtered and subsequently crystallized three times from 1:1 ethanol/water. The last yellow product obtained was dried in the oven at 50°C for 6 h. This ligand obtained (C₁₄H₁₂N₂O₂; formula weight, 240; m.p., 203 - 205°C) is shown in Fig. 1. A 10⁻³ mol L⁻¹ stock solution of 2-HBBH in absolute ethanol extrapure (Scharlab, Spain) was prepared each week and stored at 4°C in darkness when not used.

Different buffer solutions were prepared depending on the range of studied pH: 0.5 mol L⁻¹ HEPES (pH 7 and 8) from *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethane sulfonic acid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) and suprapur ammonia (Merck, Darmstadt, Germany); 0.5 mol L⁻¹ PIPES (pH 7) from piperazine-*N,N'*-bis(ethanesulfonic acid) and Suprapur ammonia (Merck); 1.5 mol L⁻¹ Britton-Robinson (pH 2 to 10), prepared according to a previously reported method¹⁶ using *o*-boric acid, *o*-phosphoric acid, acetic acid and sodium hydroxide (Merck), with a constant ionic strength obtained by adding KCl (Merck); 6 mol L⁻¹ ammonium chloride/ammonia (pH 7 - 10) (Merck); and 6 mol L⁻¹ acetic acid/sodium acetate (pH 4 - 5.5).

General procedure

The sample solution (25 mL) contained the following: 5.48 × 10⁻⁶ mol L⁻¹ 2-HBBH, buffer solution (0.12 mol L⁻¹ Britton-Robinson buffer or 0.3 mol L⁻¹ NH₄Cl/NH₃ or 0.3 mol L⁻¹ AcH/Ac⁻ or 0.01 mol L⁻¹ HEPES or 0.01 mol L⁻¹ PIPES) and metal. In all cases, the solution contained 0.5 mL ethanol (from 2-HBBH solution and/or extrapure absolute ethanol) in order to keep up the dielectric constant of the supporting electrolyte. The sample pipetted into the voltammetric cell was stirred and purged with nitrogen gas for 100 s. After a new HMDE was formed, deposition began according to the conditions determined for each experiment. Then, the stirring was stopped and the solution was left to settle for an equilibration time of 10 s; after this, the voltammogram was recorded by applying a negative-going differential pulse scan. Scans for each experiment were repeated at least twice with a new hanging drop.

Results and Discussion

2-HBBH is an aroylhydrazone characterized by the presence of the triatomic group C=N-N. It forms coordination compounds with transition metal ions, being noteworthy for its remarkable versatility as a chelating agent. It is one of the important Schiff bases with outstanding biological activities, physicochemical properties and industrial applications. Its solubility in water is low, but it has two acidic functions: OH (pK_a 6.77) and NH (pK_a 9.11).¹⁷ IR spectroscopy analysis has provided the following information (nujol, cm⁻¹): ν(N-H) + ν(O-H) 3175(w); ν(C=O) 1675(s); ν(C=N) + amide(II) 1620(m).¹⁸ This ligand showed a band around 3400 and 3200 cm⁻¹, due to OH stretching mode and NH stretching mode of free OH and NH groups, respectively.

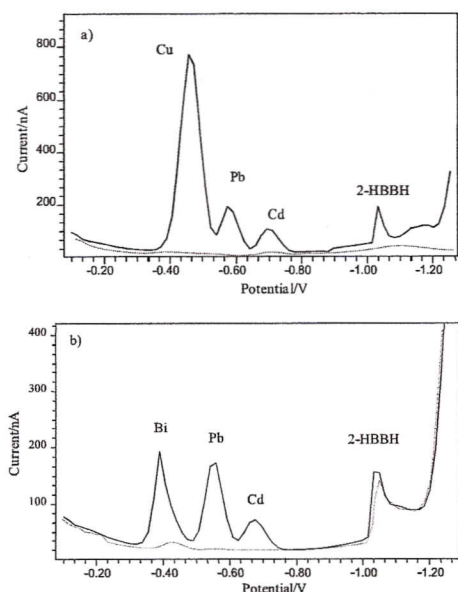


Fig. 2 Simultaneous adsorptive stripping voltammograms of $5 \mu\text{g L}^{-1}$ of (a) Cd(II)-Pb(II)-Cu(II) at pH 9.5 and (b) Cd(II)-Pb(II)-Bi(III) at pH 9 in the presence (—) and absence (····) of $5.48 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ 2-HBBH. Deposition potential at -0.8 V and deposition time of 120 s.

These bands are absent in metal complexes, which suggests deprotonation of the phenolic group and the coordination through phenolic oxygen and enolization of the carbonyl group, followed by deprotonation.¹⁹

This ligand has three suitable groups for forming coordination bonds with transition metallic cations: the phenolic hydroxyl group, the azomethine nitrogen group and the carbonyl group of the amide. The reactivity of the first group strongly depends on the medium, so this group is not involved in the coordination of metals at neutral or slightly acid mediums. Therefore, the carbonyl of amide and the nitrogen of azomethine play a bigger role in the coordination than the phenol oxygen when the hydroxyl group is not ionized. In this case, 2-HBBH behaves as a bidentate ligand, while it is a tridentate ligand in a basic medium.¹³

The electrochemical behavior of this reagent was studied in the pH range from 4 to 10. A cathodic peak for the ligand alone in the absence of metals was found around -1.0 V , with shifts and diminishing to high negative values as the pH increased (-1.2 V at pH 10). Another smaller second wave appeared at pH 7; this covered the whole polarogram at pH 10. The change of cathodic peak position to more negative potentials indicated that protons were involved in the reduction process. In acid solutions, the reduction of the azomethine group (C=N) involved a four-electron transfer, corresponding to the first peak. The second peak corresponded to the reduction of the 2-hydroxybenzaldehyde formed by the hydrolysis of the hydrazide at pH > 7; in this case, two electrons participated in the electrode reaction. Two proton ions were consumed per electron along the first reduction and only one along the second reaction. The C=O group was inactive towards reduction.²⁰

Preliminary studies were carried out to identify the general features; these studies detected the adsorptive characteristics of the Cu(II)-, Cd(II)-, Bi(III)- and Pb(II)-2HBBH complexes. Cathodic peaks appeared for the metals and the peak

Table 1 Fixed instrumental variables for voltammetric procedures

Variable	Value
Electrode	HMDE
Drop size	9 a.u.
Stirring speed	2000 rpm
Deposition time	120 s
Voltage step	0.017 V
Voltage step time	0.050 s
Pulse amplitude	-0.070 V
Pulse time	0.040 s

corresponding to a reduction process of 2-HBBH appeared at a more negative potential without overlapping. The sensitivities of metal reduction peak currents were highly enhanced by the addition of 2-HBBH to the metallic solution. This reaction showed the formation and accumulation of metal-ligand complexes onto the working electrode during the preconcentration step, due to the adsorptive characteristic of the complexes. Then, metallic complexes were reduced to elemental metals during the voltammetric scan. Figure 2 shows an example of the simultaneous voltammograms of Cd(II), Cu(II) and Pb(II) and Cd(II), Bi(III) and Pb(II) obtained in the absence and presence of 2-HBBH. No peaks or very small peaks were obtained for the metal ions alone in the absence of ligands.

In order to obtain the adequate conditions for the individual and simultaneous determinations of Cd(II), Pb(II), Bi(III) and Cu(II), we studied the effect of varying pH, the effect of supporting electrolyte and the effect of deposition potential at room temperature with $5 \mu\text{g L}^{-1}$ metal and $5.48 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ 2-HBBH. Table 1 shows the rest of the fixed parameters.

Effect of pH

The CSV peak intensities for Cd(II), Pb(II), Bi(III) and Cu(II) were measured as a function of the pH in the presence of 0.12 mol L^{-1} Britton-Robinson containing $5.48 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ 2-HBBH and -0.8 V deposition potential (Fig. 3). Such a high concentration of ligand (around hundred times) led to a fast formation of complexes.

The pH was changed in the range from 2 to 10. The highest intensities showed that the optimum pH to carry out determination of these metals ranged from 6 to 10 using a Britton-Robinson supporting electrolyte. As can be seen, the Cd(II) peak increased as the pH increased to pH 9 - 10; the Pb(II) peak height reached its maximum at pH 8; the Bi(III) signal increased as the pH increased to pH 9 and then decreased after pH 9; while Cu was most sensitive from 6 up to 10, slightly diminishing to pH 10. The Bi(III) and Cd(II) peaks were not detected below pH 6 and 4, respectively. The peaks obtained were well resolved in the wide range of pH values. Only Cu(II) and Bi(III) seemed to overlap in a pH range 6 - 10.

Effect of supporting electrolyte

After the study of the pH effects on metal peak currents, we tested different buffers as supporting electrolytes. This study was developed to determine if the presence of concentrations of inorganic or organic anions in the electrolyte could deteriorate the stripping voltammetry signal, due to the formations of sparingly soluble compounds on the electrode or of many soluble metallic compounds in the solution during the electrochemical steps. Furthermore, the overlap between Bi(III) and Cu(II) was also researched.

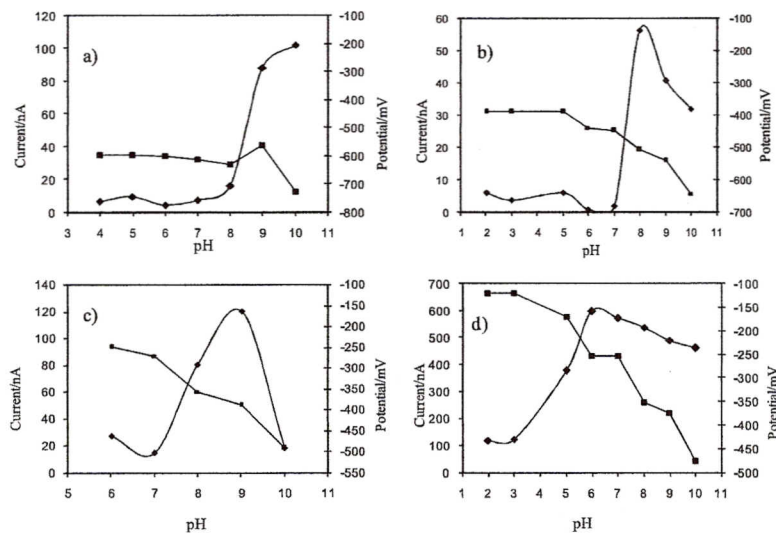


Fig. 3 Influence of pH of the supporting electrolyte on the peak current (◆) and peak potential (■) for: a) Cd(II), b) Pb(II), c) Bi(III) and d) Cu(II), containing: 5.48×10^{-6} mol L⁻¹ 2-HBBH, 5 μ g L⁻¹ metal and 0.12 mol L⁻¹ Britton-Robinson buffer. Deposition potential at -0.8 V and deposition time of 120 s.

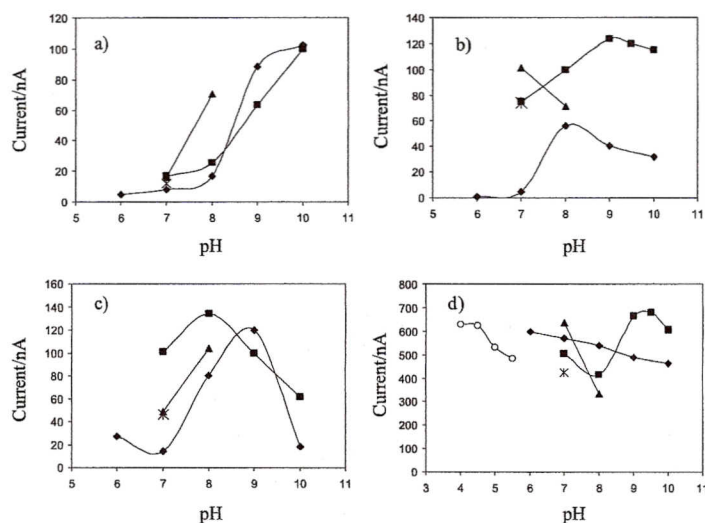


Fig. 4 Influence of composition of supporting electrolyte on the peak current for: a) Cd(II), b) Pb(II), c) Bi(III) and d) Cu(II), containing: 5.48×10^{-6} mol L⁻¹ 2-HBBH, 5 μ g L⁻¹ metal and different buffers. Buffer solutions used: (◆) 0.12 mol L⁻¹ Britton-Robinson buffer, (■) 0.3 mol L⁻¹ NH₄Cl/NH₃, (○) 0.3 mol L⁻¹ acetic acid/sodium acetate, (▲) 0.01 mol L⁻¹ HEPES, and (*) 0.01 mol L⁻¹ PIPES. Deposition potential at -0.8 V and deposition time of 120 s.

Solutions of 0.3 mol L⁻¹ ammonium chloride/ammonia, 0.12 mol L⁻¹ Britton-Robinson, 0.01 mol L⁻¹ HEPES and PIPES between 6 and 10 were employed. Figure 4 shows the results obtained for -0.8 V deposition potential. Ammonium chloride/ammonia yielded the best responses for the four metals studied; the peak potentials (E_p) were around the following values: Cd(II) at pH 10 and $E_p = -0.728$ V; Pb(II) at pH 9 and $E_p = -0.542$ V; Cu(II) at pH 9.5 and $E_p = -0.406$ V; Bi(III) at pH 8 and $E_p = -0.339$ V.

Taking into account the results obtained above for Cu(II) using Britton-Robinson (peak current slightly higher at pH values lower), a study using acetic acid/sodium acetate buffer at pH (below 6) from 4 to 5.5 was also performed for this metal.

The Cu(II) peak currents are included in Fig. 4d. As it can be seen, Cu(II) voltammetric signal tended to increase as the pH decreased to 4 in the pH range studied. The Bi(III) peak disappeared in acetate buffer, allowing the Cu(II) detection without any interference. Cd(II) and Pb(II) yielded negligible voltammetric signals, with very low sensitivities.

In conclusion, individual detection for all the metals studied and simultaneous determination of the two groups of elements consisting of Cd(II)-Pb(II)-Cu(II) and Cd(II)-Pb(II)-Bi(III) can be carried out; their determinations are allowed at pH 9.5 and pH 9, respectively. The analysis of Cu(II), without Bi(III) interference, can be performed at pH 4.

Table 2 Effect of deposition potential on the peak current for $5 \mu\text{g L}^{-1}$ metal, containing $5.48 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ 2-HBBH and $0.3 \text{ mol L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl/NH}_3$ buffer pH 9.5 and 9

E_d/V	pH 9.5		
	-1.0	-0.8	-0.6
I_{Cu}/nA	645	680.8	513.3
(E_p/V)	(-0.455)	(-0.456)	(-0.455)
I_{Pb}/nA	126.6	127.6	123.3
(E_p/V)	(-0.557)	(-0.574)	(-0.574)
I_{Cd}/nA	67.3	109.1	2.8
(E_p/V)	(-0.693)	(-0.693)	(-0.693)
E_d/V	pH 9		
	-1.0	-0.8	-0.6
I_{Bi}/nA	135.8	142.35	77.8
(E_p/V)	(-0.405)	(-0.405)	(-0.405)
I_{Pb}/nA	86.2	113.9	52.2
(E_p/V)	(-0.557)	(-0.557)	(-0.557)
I_{Cd}/nA	68.7	66.7	No peak
(E_p/V)	(-0.659)	(-0.660)	

Effect of deposition potential

In order to improve the intensity of the peaks, we have also studied the effect of the deposition potential for Cd(II), Pb(II) and Cu(II) at pH 9.5 and for Cd(II), Pb(II) and Bi(III) at pH 9, using $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ buffer (an intermediate pH among the optimum conditions of these groups of metals). The deposition potential was varied from -1.0 to -0.6 V range and the voltammetric scan was from -0.1 to -1.25 V. Table 2 shows intensities (I) and peak potentials (E_p) for this study. No significant variations were found of peak currents for Pb(II) at pH 9.5 and for Cd(II) at pH 9 at different deposition potentials. For Cu(II) and Cd(II) at pH 9.5 and for Bi(III) and Pb(II) at pH 9, intensities increased to -0.8 V deposition potential. Peak potentials showed very low variations with this variable. For further procedures, -0.8 V deposition potential was chosen. At this potential, the metals studied are reduced and amalgamated into the Hg drop. Therefore, the possible mechanism of metal preconcentration on the electrode-sample solution is first a reduction of metal and subsequently the oxidation at the initial potential of the voltammetric scan (-0.1 V) during the equilibration time (10 s). The metal ions diffuse out of the mercury drop and they are retained at its surface by complexation with 2-HBBH in the adsorption layer. The complexation reaction depends on the pH. Strong adsorptions and stability of the metal complexes are required. Finally, the reduction voltammetric scan produces stripping peaks for metal determinations.

On the other hand, as aforementioned, bismuth and copper exhibited interfering effects on the simultaneous determination. So, the effect of the deposition potential was studied in order to get a better separation of the Cu(II) and Bi(III) peaks, using $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ at pH 7. This pH value was chosen after previous experiments with different buffers at different pH values, which yields the highest peak separations. In this case, the deposition potential was varied from -1.0 to +0.4 V. This study also showed a -0.8 V deposition potential as the potential with the best resolution. In this condition, the peak potentials obtained were: $E_p = -0.271 \text{ V}$ for Cu(II) and $E_p = -0.220 \text{ V}$ for Bi(III), but there was not enough data for the determination of one in the presence of the other one. Thus, the analysis of Bi(III) in

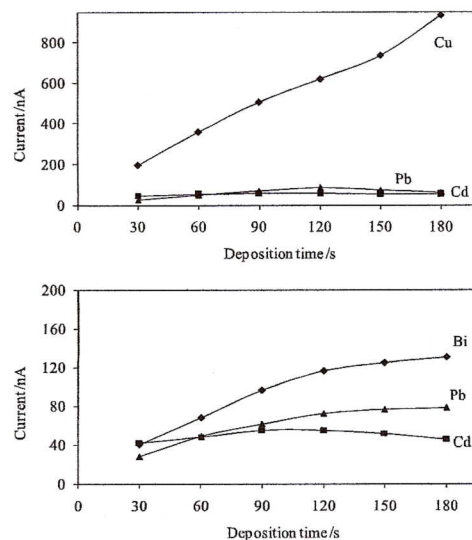


Fig. 5 Influence of deposition time on the peak currents for simultaneous analysis of Cd(II)-Pb(II)-Cu(II) (at pH 9.5) and Cd(II)-Pb(II)-Bi(III) (at pH 9). Conditions: $5.48 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ 2-HBBH, $4 \mu\text{g L}^{-1}$ metal and $0.3 \text{ mol L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl/NH}_3$; deposition potential at -0.8 V.

the presence of Cu(II) would require a calibration by using multivariate calibration applying models such as artificial neural networks (ANN) or partial least squares (PLS), using multivariate signals and establishing a linear regression model.

Effect of deposition time

The effect of the deposition time on the stripping peak currents for the metals studied in the range 30 - 180 s was investigated at two different pH values of supporting electrolyte: Cd(II)-Pb(II)-Cu(II) at pH 9.5 and Cd(II)-Pb(II)-Bi(III) at pH 9 (Fig. 5). The peak current for all the metals increased initially with an increase in the preconcentration time up to 120 - 150 s, except for Cu(II) that continued increasing. This metal showed higher intensity values and was more influenced with the increase of the deposition time. Pb(II), Cd(II) and Bi(III) peak currents at pH 9 showed lower influence with the increase of the deposition time. For further procedures, the deposition time of 120 s was chosen to avoid long analysis times. In any case, the Cu peak current can be enhanced by using a longer deposition time.

Linear ranges and detection limits for individual analysis

To verify the linear relationship between peak currents and metal concentrations, we adjusted the five calibration graphs under optimum conditions for each metal separately, after 120 s of accumulation time using a -0.8 V deposition potential. For Cu(II), the two pH values were used to evaluate the calibration with both acid and basic electrolytes. The results are shown in Table 3. The correlation coefficients obtained were greater than 0.99, indicating that in all the cases the current-concentration relationships were linear in the concentration range of $0.5 - 10 \mu\text{g L}^{-1}$ for Cd(II), Pb(II), Bi(III) and Cu(II) in basic medium and in the range of $0.5 - 12 \mu\text{g L}^{-1}$ for Cu(II) in acid medium. The detection limit, DL, is defined as $3S_{\text{blank}}/m$ (where S_{blank} is the SD of blank signal ($n = 5$) and m is the slope of the calibration curve). The detection limits of 0.28, 0.026 and $0.285 \mu\text{g L}^{-1}$ were obtained for cadmium, lead and bismuth, respectively; the limit was 0.051 and $0.038 \mu\text{g L}^{-1}$ for copper at pH 9.5 and 4,

Table 3 Analytical parameters obtained for individual and simultaneous analysis for Cd(II), Pb(II), Bi(III) and Cu(II) ions (deposition potential: -0.8 V)

Determination		pH ^a	Slope/nA μg^{-1} L	Intercept/nA	R ²	Linear range/ $\mu\text{g L}^{-1}$	Detection limit ^b / $\mu\text{g L}^{-1}$
Individual analysis	Cd(II)	10	14.77	-0.92	0.994	0.5 - 10	0.280
	Pb(II)	9	34.74	+9.415	0.999	0.5 - 10	0.026
	Bi(III)	8	23.09	+17.74	0.995	0.5 - 10	0.285
	Cu(II)	9.5	141.60	+23.92	0.996	0.5 - 10	0.051
Simultaneous determination	Cu(II)	4	129.49	-1.45	0.998	0.5 - 12	0.038
	Cd(II)	9.5	11.31	+5.29	0.975	0.5 - 10	0.107
	Pb(II)		14.81	+23.06	0.985	0.5 - 10	0.170
	Cu(II)		136.58	+29.99	0.998	0.5 - 9	0.053
	Cd(II)	9	10.54	+1.11	0.996	0.5 - 10	0.032
	Pb(II)		28.11	+11.89	0.995	0.5 - 10	0.018
	Bi(III)		16.39	+10.79	0.998	0.5 - 14	0.173

a. Acid buffer, 0.3 mol L^{-1} acetic acid/sodium acetate; basic buffer, 0.3 mol L^{-1} $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$. b. Calculated as $3s/m$, s the standard deviation of blank peak, and m the slope of the calibration plot.

respectively. These values were very satisfactory and adequate for trace analysis. The reasons for differences between slopes for the various ions studied is due to the differences in the formation constant of the complexes with 2-HBBH aforementioned. Besides, the reason for the differences among detection limits is also due to the differences in the blank signal at different pH values used for each metal. Therefore, the blank signal was obtained using electrolyte containing 2-HBBH, and its signal depended on the pH and measurement potential, as has been proved.

The adsorptive accumulations of the Cu(II)-, Cd(II)-, Bi(III)- and Pb(II)-2-HBBH complexes under the optimized conditions resulted in reproducible peak currents. The measurements of five solutions containing $5 \mu\text{g L}^{-1}$ metal ions gave a mean peak current (nA) of 141.5 ± 6.1 , 187.8 ± 65.6 , 185.1 ± 8.9 , 717.2 ± 9.7 , and a relative standard deviation (RSD) of 4.28% for Cd(II), 2.99% for Pb(II), 4.82% for Bi(III) and 1.35% for Cu(II).

Linear ranges and detection limits for simultaneous determinations

Cd(II)-Pb(II)-Cu(II). In this case, three calibration graphs were constructed, for cadmium, lead and copper, by using simultaneous additions of metal ions at pH 9.5, selected above as the best condition for the electrolyte. Moreover, 120 s for accumulation time and -0.8 V deposition potential were used. The calibration data are shown in Table 3 and Fig. 6 plots voltammograms obtained with the response peaks for these metals.

The calibration curves were linear over the range $0.5 - 10 \mu\text{g L}^{-1}$ for cadmium and lead, and over the range $0.5 - 9 \mu\text{g L}^{-1}$ for copper with detection limits of 0.107, 0.17 and $0.053 \mu\text{g L}^{-1}$ for cadmium, lead and copper, respectively. The slopes obtained for simultaneous analysis were similar to those obtained for individual analyses. Only Pb(II) showed a slightly lower slope, probably because the response peaks were significantly affected by the pH of the electrolyte. In the presence of high copper concentrations, the standard addition method considerably improved the resolution of the voltammetric measurements of lead, because the method was highly sensitive for copper.

Cd(II)-Pb(II)-Bi(III). In the same way, three calibration graphs were constructed for cadmium, lead and bismuth by using simultaneous additions of metal ions at pH 9, selected above as the best condition for the electrolyte. As before, 120 s for accumulation time and -0.8 V deposition potential were used. The calibration data are shown in Table 3; Fig. 6 plots voltammograms obtained with the response peaks for these metals.

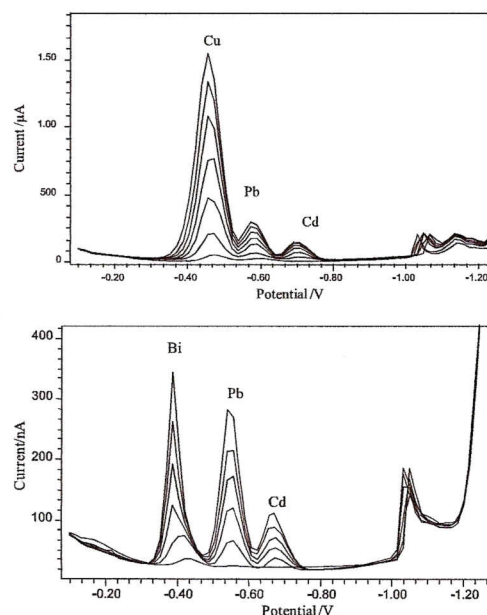


Fig. 6 Response peaks for different concentrations of metal ions used for calibration graphs of simultaneous analysis of Cd(II)-Pb(II)-Cu(II) (at pH 9.5) and Cd(II)-Pb(II)-Bi(III) (at pH 9).

The calibration curves were linear over the range $0.5 - 10 \mu\text{g L}^{-1}$ for cadmium and lead and $0.5 - 14 \mu\text{g L}^{-1}$ for bismuth with detection limits of 0.032, 0.018 and $0.173 \mu\text{g L}^{-1}$ for cadmium, lead and bismuth, respectively. The slopes of individual analysis were in the same order of magnitude as those obtained for simultaneous analysis.

Interferences

Possible interferences by other metals with the cathodic adsorptive stripping voltammetry of cadmium, lead, bismuth and copper were investigated by the addition of the interfering ions such as zinc and nickel, which are able to form a complex with 2-HBBH. The results showed that the method was free from interferences such as zinc and nickel.

The only mentioned interference in these determinations was the simultaneous presence of copper and bismuth, with stripping voltammograms overlapping. This implies that it is not possible

Table 4 Determination of Cd(II), Pb(II), Bi(III) and Cu(II) ions in certified reference materials and synthetic samples

Sample	Certified or spiked concentration/ $\mu\text{g L}^{-1}$				Found concentration/ $\mu\text{g L}^{-1}$			
	Cd(II)	Pb(II)	Cu(II)	Bi(III)	Cd(II)	Pb(II)	Cu(II)	Bi(III)
TMDA-62 ^a	89.9 \pm 8.69	98.7 \pm 10.9	106 \pm 10.7	50 ^b	95.1 \pm 4.9	89.3 \pm 7.2	100.6 \pm 1.6	47.8 \pm 7.1
Synthetic sample 1	2.0	1.2	0.8	—	1.84 \pm 0.09	1.71 \pm 0.91	0.78 \pm 0.05	—
Synthetic sample 2	1.0	0.6	—	0.4	1.13 \pm 0.09	0.63 \pm 0.07	—	0.45 \pm 0.04

a. Certified reference material (fortified water from Lake Ontario). b. Estimated value.

to simultaneously determine these two metals in the presence of each other by the proposed electroanalytical method. However, the determination of Cu(II) in the presence of Bi(III) has been solved using the electrolyte at pH 4. This problem has been mentioned in other reports. Thus, a reported method for the determination of bismuth in the presence of copper is based on the accumulation of Bi(III) onto the surface of a chemically modified electrode containing 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol.²¹ By adding an excess amount of iodide, the copper interference was overcome, although it was not possible to determine this ion. With the proposed method in this paper and conversely, we can determine Cu(II) in the presence of Bi(III) just by modifying the electrolyte pH (pH 4).

Application of the method

The accuracy of the proposed AdCSV method using 2-HBBH was assessed by analysis of certified reference water (CRW), fortified water from Lake Ontario (TMDA-62). This sample contains different metals including Cu(II), Pb(II), Cd(II) and Bi(III) ions among others. In order to resolve the simultaneous presence of copper and bismuth, the proposed method was applied by using two steps: first, the Cu concentration was evaluated at pH 4. Then, the sample was analyzed at pH 9, evaluating the Pb and Cd concentrations; Bi(III) and Cu(II) produced overlapped signals and the Bi(III) concentration was determined by subtracting the known Cu(II) signal from the total signal. Four replicates of reference material were preconcentrated and analyzed after UV digestion with hydrogen peroxide 30% Suprapur (Merck). In addition, the method was applied to the determination of synthetic mixtures with two proposed simultaneous determinations: samples spiked with Cu(II)-Pb(II)-Cd(II) measured at pH 9.5 and those spiked with Cu(II)-Pb(II)-Bi(III) measured at pH 9. The results are shown in Table 4. The data obtained for CRW and spiked samples showed good recoveries of metal ions, indicating the successful applicability of the proposed method.

Conclusions

The present study has demonstrated the applicability of 2-hydroxybenzaldehyde benzoylhydrazone (2-HBBH) for the determination of Cd(II), Cu(II), Pb(II) and Bi(III) ions by adsorptive cathodic stripping voltammetry (AdCSV).

The addition of this ligand offers a practical potential for the individual analysis of copper, lead, bismuth and cadmium traces, with high sensitivity, simplicity and speed. In addition, the simultaneous determination of the two groups of elements consisting of Cd(II)-Pb(II)-Cu(II) and Cd(II)-Pb(II)-Bi(III) can be performed within a few minutes. Good resolution, sensitivities and reproducibility were obtained.

Acknowledgements

This work has been supported by Ministerio de Ciencia y Tecnología: Project REN2003-09361CO3-02 and CTM-2007-64678. The authors gratefully acknowledge the help of Bárbara Eizaga Rebollar for English revision of the manuscript.

References

1. C. Locatelli and G. Torsi, *Microchem. J.*, **2000**, *65*, 203.
2. J. Wang, "Stripping Analysis-Principles, Instrumentation and Application", **1985**, VCH, Deerfield Beach.
3. J. A. Jurado-González, M. D. Galindo-Riaño, and M. García-Vargas, *Anal. Chim. Acta*, **2003**, *487*, 229.
4. C. Colombo and C. M. G. van der Berg, *Anal. Chim. Acta*, **1997**, *337*, 29.
5. J. Limson and T. Nyokong, *Anal. Chim. Acta*, **1997**, *344*, 87.
6. A. A. Ensafi, T. Khayamian, A. Benvidi, and E. Mirmomtaz, *Anal. Chim. Acta*, **2006**, *561*, 225.
7. E. Shams, A. Babaei, and M. Soltaninezhad, *Anal. Chim. Acta*, **2004**, *501*, 119.
8. A. A. Ensafi and K. Zarei, *Talanta*, **2000**, *52*, 435.
9. J. Liu, B. Zhang, B. Wu, Y. Liu, and X. Yu, *Rare Met.*, **2006**, *25*, 184.
10. A. S. A. Zidan, *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.*, **2003**, *178*, 567.
11. I. V. Sazanovich, A. Balakumar, K. Muthukumar, E. Hidin, C. Kirmaier, J. R. Diers, J. S. Lindsey, D. F. Bocian, and D. Holten, *Inorg. Chem.*, **2003**, *42*, 6616.
12. Y. F. Yuan, Y. Cao, N. Y. Fu, L. Wang, H. Weng, A. B. de Carvalho, and C. Peppe, *J. Organomet. Chem.*, **2001**, *637-639*, 631.
13. Y. H. Lu, Y. W. Lu, C. L. Wu, Q. Shao, X. L. Chen, and R. N. G. Bimbong, *Spectrochim. Acta, Part A*, **2006**, *65*, 695.
14. L. Jin and N. J. Gogan, *Anal. Chim. Acta*, **2000**, *412*, 77.
15. J. Buffle and M. L. Tercier-Waeber, *Trends Anal. Chem.*, **2005**, *24(3)*, 172.
16. C. Mongay and V. Cerda, *Ann. Chim.*, **1974**, *64*, 409.
17. C. Cordier, E. Vauthier, A. Adenier, Y. Lu, A. Massat, and A. Cossé-Barbi, *Struct. Chem.*, **2004**, *15(4)*, 295.
18. E. W. Ainscough, A. M. Brodie, A. J. Dobbs, J. D. Ranford, and J. M. Waters, *Inorg. Chim. Acta*, **1998**, *267*, 27.
19. P. B. Sreeja and M. R. P. Kurup, *Spectrochim. Acta, Part A*, **2005**, *61*, 331.
20. Y. A. M. Temerk, I. M. Issa, and A. Z. Abu Zuhri, *Trans SAEST*, **1979**, *14*, 17.
21. K. L. Dong, L. Kryeger, J. K. Christensen, and K. N. Thomsen, *Talanta*, **1991**, *38*, 101.

Selective Chemosensor for Copper Ions Based on Fluorescence Quenching of a Schiff-Base Fluorophore

ESTRELLA ESPADA-BELLIDO, MARIA DOLORES GALINDO-RIAÑO,* MANUEL GARCÍA-VARGAS, and RAMAIER NARAYANASWAMY

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Cádiz, P.O. Box 11510, Campus Río S. Pedro, Puerto Real, Cádiz 11510, Spain (E.E.-B., M.D.G.-R., M.G.-V.); and Centre for Instrumentation and Analytical Science, School of Chemical Engineering and Analytical Science, The University of Manchester, Manchester, M60 1QD, UK (R.N.)

A Schiff base-based fluorescent chemosensor has been studied for divalent copper detection. The formation of 2-hydroxybenzaldehyde benzoylhydrazone-Cu²⁺ complex induced a fluorescence quenching of this compound in a medium of water/ethanol (53% v/v) and 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0). The continuous variations and mole-ratio plots of absorbance suggested a complex formation with a 1:1 metal-ligand stoichiometry. The conditional stability constant for the complex was evaluated to be $6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. A modified Stern-Volmer relationship was employed to obtain a linear calibration plot, obtaining a dynamic working range up to 157.4 μM . The detection limit of this system was found to be 5.6 μM and the relative standard deviation for five measurements of 78.7 μM concentration was 5.2%. This fluorescent chemosensor also showed a high selectivity for copper ions over other metal ions, such as Al³⁺, Ca²⁺, Cd²⁺, Fe²⁺, K⁺, Mg²⁺, Na⁺, Pb²⁺, or Zn²⁺. The results of this investigation show a simple, rapid, low-cost, and selective method that can operate in neutral solutions and is useful for biological and environmental applications.

Index Headings: 2-Hydroxybenzaldehyde benzoylhydrazone; Copper (II); Chemosensor; Fluorescence quenching.

INTRODUCTION

In recent years, the development of chemical sensors for metal ions in aqueous solution has been of increasing importance due to their potential applications in many disciplines such as biochemistry, clinical and medical sciences, cell biology, analytical chemistry, and environmental sciences.¹ Among the different chemosensors, fluorescence-based ones attract particular interest because of their high selectivity, sensitivity, low cost, simplicity, and versatility.^{2,3}

Special attention has been paid to finding sensors for the most hazardous or essential metals (Hg, Cd, Cu, or Zn).⁴ Copper plays an important role as an essential element in biological systems, but at the same time, this metal represents an environmental concern when it is present in uncontrolled amounts, producing severe or lethal intoxications.^{2,5} It is an important element in geochemistry and can be easily released from silicates, sulfites, and oxides after some physical and chemical weathering and then be transferred by water into soil and sediments. On the other hand, increases of copper concentration in the environment also come from metal processing and mining industries, waste discharge, refineries, and from the use of copper as a base compound for antifouling paints.⁶

There are some fluorescent reagents that have been used as chemosensors for copper ion, including 1-(rhodamine B)lactam-thiosemicarbazide,⁷ all *cis* 2,4,6-triamino-1,3,5-trihydrox-

ycyclohexane,⁸ 1-phenyl-3-methyl-5-hydroxypyrazole-4-carbaldehyde (benzoyl)hydrazone,⁹ 5-(p-N,N'-bis(2-pyridyl)amino)phenyl-10,15,20-tris(p-methoxy-phenyl)porphyrin zinc,¹⁰ or derivatives of aminonaphthol,¹¹ 2-aza-1,3-butadiene,¹² monopyrenylalkylamine,¹³ calix[4]arene,¹⁴ and 8-hydroxyquinoline.¹⁵ However, many of these suffer from strong interference from other metal ions¹⁶ or they are not applicable in aqueous or other environmentally friendly media such as ethanol;⁷ also, most copper chemosensors require complex and expensive molecules to synthesize the ligand. Hence, the study on new, efficient Cu²⁺ fluorescent chemosensors is still necessary.

Aroylhydrazones are Schiff bases with chelating ability to form stable complexes with transition metal ions because additional N, and frequently O, behave as donor atoms. However, they have been rarely reported as fluorescent chemosensors.^{9,17,18} 2-Hydroxybenzaldehyde benzoylhydrazone (2-HBBH) is described in the literature as a tridentate chelating agent with outstanding biological relevance to both copper and iron complexes. This reagent not only has interesting biological properties, such as antibacterial and antitumor activity related to the inhibition of DNA synthesis and cell growth, for chemotherapy of iron overload, and as therapeutic agent,^{19,20} but also, it can be synthesized from inexpensive starting compounds. Studies reported in the literature about this ligand have discussed the relationships between the structure of the solid metal complexes and their observed biological activity,²¹ but this ligand has been rarely used as a chromophore- or fluorophore-based analytical reagent.^{22,23}

Therefore, the main purpose of this work is to develop a highly selective fluorescent sensor for measurement of copper using this common fluorescent ligand that is easy to prepare.

EXPERIMENTAL

Apparatus. A Shimadzu UV-2400 PC Spectrophotometer (Tokio, Japan) was used for recording absorbance of solutions using a cell with a path length of 1.0 cm. Fluorescence measurements of samples were recorded using an LS 55 Perkin Elmer Luminescence Spectrometer (Waltham, MA) with excitation and emission slit widths set at 10 and 20 nm, respectively. All digitized data obtained were processed using the Microsoft Office Excel 2003 Program (Microsoft). A Hanna Turtle pH Meter (Bedfordshire, UK) was used for pH measurements. All of the measurements were operated at room temperature at about 298 K.

Reagents. 2-HBBH reagent was synthesized according to the published method²⁴ by reaction between 2-hydroxybenzaldehyde (2-HB) and benzoylhydrazone (BH) obtained from

Received 25 January 2010; accepted 6 April 2010.

* Author to whom correspondence should be sent. E-mail: dolores.galindo@uca.es.

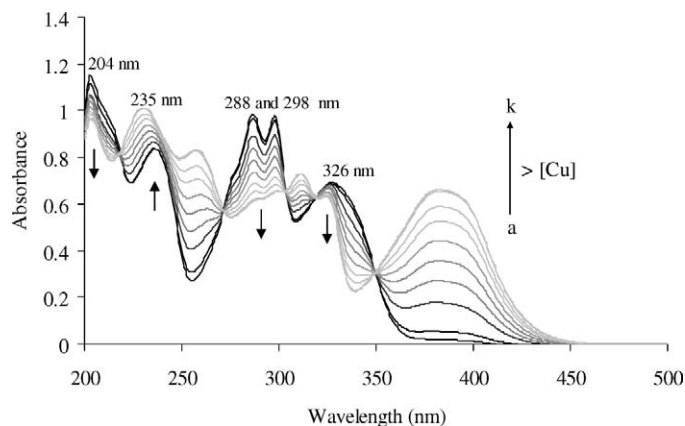


FIG. 1. UV-vis spectra of 2-HBBH in aqueous/ethanolic solution in the presence of different amounts of copper ion. Conditions: $C_{2\text{-HBBH}} = 47.6 \mu\text{M}$; $C_{\text{Cu}^{2+}}$ (μM): (a) 0; (b) 6.3; (c) 12.6; (d) 18.9; (e) 25.2; (f) 31.5; (g) 37.8; (h) 44.1; (i) 50.4; (j) 56.7; and (k) 63.0.

Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). The stock solutions of 2-HBBH in ethanol were prepared and stored at 4 °C in darkness when not in use.

The buffer solutions were prepared using Hydrion Phosphate Buffer Chemvelopes purchased from Sigma-Aldrich at different pH values (pH 3–11) by adding to 500 mL of distilled deionized water. A neutral medium was selected for fluorescence measurements and obtained by adding phosphate buffer. It was prepared by using 0.5 M potassium dihydrogen orthophosphate (KH_2PO_4) that was brought to pH 7.0 using 1 M NaOH.

Stock aqueous solutions of Cu^{2+} ions were prepared by dilution of a standard solution of 1000 mg L^{-1} (Merck, Darmstadt, Germany) in 0.06 M HNO_3 .

Ferric (III) nitrate, potassium chloride, sodium chloride, zinc acetate, calcium chloride, lead (II) nitrate, cadmium chloride, magnesium chloride, aluminum potassium sulfate, ethylenediamine tetraacetic acid, and ascorbic acid were purchased from Sigma-Aldrich, Fluka, and AnalR.

All chemicals were of analytical reagent grade and used as purchased without further purification. All solutions were prepared with distilled deionized water or absolute ethanol.

General Procedure. Procedure for Colorimetric Measurements. The influence of the pH value in the binding interaction of 2-HBBH with Cu^{2+} was studied using the following solutions: 3.2 mL of Hydrion buffer (pH 3–11) were added to an aqueous/ethanolic (68% v/v) solution containing 3.2×10^{-5} M of 2-HBBH and 3.2×10^{-5} M of Cu^{2+} ions and were brought to a volume of 5 mL.

The stoichiometry of the complex using two Job's plots was obtained by employing solutions with different concentrations of 2-HBBH and Cu^{2+} : 2 mL of Hydrion buffer at pH 6.5 was added to an aqueous/ethanolic (75% v/v) solution containing concentrations of 2-HBBH and Cu^{2+} ranging from 0 to 3×10^{-5} M for the first Job's plot and from 0 to 9.7×10^{-5} M for the second Job's plot, the total volume of solution being 4 mL. For the mole-ratio plot, 2 mL of Hydrion buffer at pH 6.5 was added to an aqueous/ethanolic (80% v/v) solution containing 2×10^{-5} M 2-HBBH and different concentrations of Cu^{2+} ranging from 5×10^{-6} to 4×10^{-5} M, the total volume in this case being 5 mL.

For each study, the solutions contained the same fixed

volume of ethanol (by addition of 2-HBBH ethanolic solution or absolute ethanol) to keep the dielectric constant the same in all solutions. The spectrophotometric measurements were recorded at the absorption maximum of 380 nm.

Procedure for Fluorescence Measurements. Fluorescence measurements were performed by addition of the proper volume of copper ions to a 5 mL solution containing 9.4×10^{-5} M 2-HBBH and 0.05 M KH_2PO_4 buffer solution (pH 7.0) in a mixture of water/ethanol (53% v/v). The fluorescence intensity of the solution was recorded at 490 nm using an excitation wavelength of 424 nm.

The effects of different metal ions on the 2-HBBH fluorescence were studied using metal ions at concentrations of 78.7 μM . For the interference study on the sensing method, copper (Cu^{2+}) and interference ion solutions were mixed at a 1:1 ratio and at two different concentrations levels of 7.9 and 31.5 μM .

RESULTS AND DISCUSSION

2-HBBH is one of the important Schiff bases, with three suitable groups for forming coordination bonds with transition metal cations: the phenolic hydroxyl group, the azomethine nitrogen group, and the carbonyl group of the amide. The reactivity of the phenolic hydroxyl group strongly depends on the medium, and this group would not be involved in the coordination with metals in slightly acid media ($\text{pK}_{\text{a}1(\text{aq})} = 6.77$). Therefore, the carbonyl of amide and the nitrogen of azomethine play greater roles in the coordination than the phenol oxygen when the hydroxyl group is not ionized and the complexation reaction is highly influenced by the pH.²²

2-HBBH solution shows good absorption and emission spectral properties, which are modified when ligand- Cu^{2+} complex is formed. The high thermodynamic affinity of Cu^{2+} ions for ligands with N or O as chelating elements and the adequate kinetics of the binding process (the rule of Irving-Williams) that can be brought about on this reaction makes the 2-HBBH ligand appropriate to be used as a chemosensor for this metal.

The selectivity for Cu^{2+} might be interpreted using the geometrical difference between the copper complex and other metal complexes. In aqueous solutions, these ions generally form octahedral complexes. As far as the copper ion is concerned, coordinating interaction of the four equatorial sites is stronger than that of the remaining axial positions due to the Jahn-Teller effect. Consequently, four coordinated Cu^{2+} complexes are generally characterized by a square planar geometry if there is no special geometrical constraint in the ligands.¹¹

Spectral Characteristics of 2-HBBH and Cu-2-HBBH. 2-HBBH was optically characterized by ultraviolet-visible (UV-Vis) absorption spectroscopy and fluorometry. The absorption and fluorescence spectra of 2-HBBH in ethanol are shown in Figs. 1 and 2, respectively. In the absorption spectrum, the reagent presents four important transitions, which are at 204 nm, 235 nm, a peak with two shoulders at 288 nm and 298 nm, and finally another at 326 nm. When copper solution was added, the peaks of the absorption spectra of 2-HBBH are modified (increased, decreased, appeared, and/or underwent a shift). A new high peak appeared at approximately 380 nm, which increased with the increase of Cu^{2+} ion concentration. The evolution of the spectra indicated that Cu^{2+} -2-HBBH complex was formed and the intensity of this

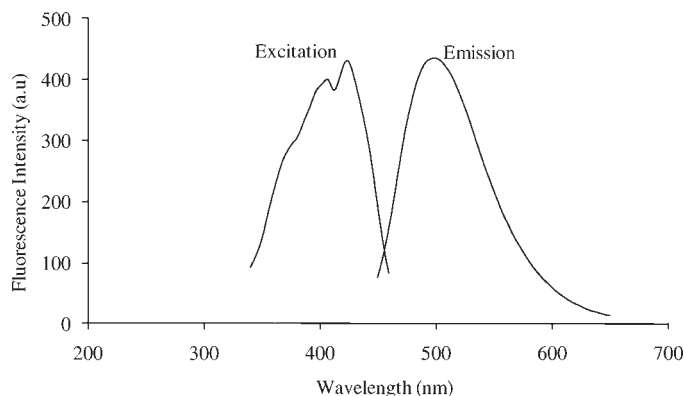


FIG. 2. Excitation and emission spectra of 2-HBBH at pH 7.0 in aqueous/ethanolic solution ($C_{2\text{-HBBH}} = 94 \mu\text{M}$).

new peak reached a maximum when the concentrations of the ligand and metal ion are approximately the same.

The fluorescence spectrum of 2-HBBH in aqueous ethanolic solution showed a band at 490 nm upon excitation at 424 nm. When copper ion solution was added, a significant fluorescence quenching of the sensor molecule was observed (Fig. 3). The effect occurred quantitatively with increase in concentration of the metal and without significant change in the position of the emission maximum. The complex formation produced the quenching of 2-HBBH fluorescence, probably due to an electronic energy or electron transfer involving the copper and the excited organic ligand.²⁵ Hence, the development of this sensor forms a simple procedure for the detection of copper ion.

Effect of pH on Complex Formation. The influence of pH on complex formation was investigated through absorbance measurements using Hydrion buffer in the range from 3 to 11. It can be seen in Fig. 4 that absorbance of the complex was highly pH dependent, which is apparently related to the subsequent deprotonation of the two acidic functions, $-\text{OH}$ and $-\text{NH}$. The reactivity of the phenolic hydroxyl group strongly depends on the medium and can be involved in the

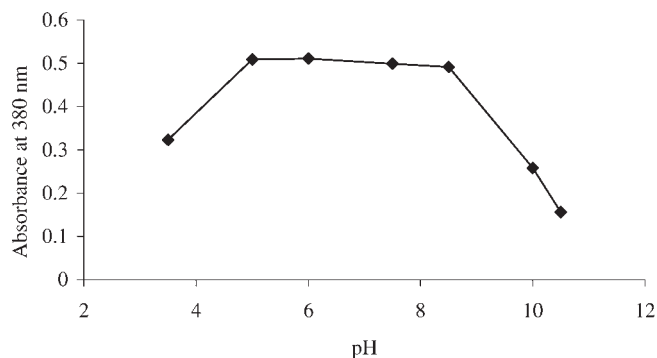


FIG. 4. Effect of pH on the absorbance of Cu-2-HBBH complex at 380 nm in aqueous/ethanolic solution ($C_{2\text{-HBBH}} = C_{\text{Cu}^{2+}} = 32 \mu\text{M}$).

coordination of metal in basic or slightly neutral mediums by deprotonation ($\text{pK}_{\text{a}1,(\text{aq})} = 6.77$); the coordination through phenolic oxygen and enolization of the carbonyl group followed by deprotonation of $-\text{NH}$ carried out in basic medium provides the tridentate ligand behavior.²² Therefore, the higher absorbance values were obtained from pH 5.0 to 8.5, decreasing for pH 10.0. Further experiments were carried out at pH 7.0. It is noteworthy that the best response of the chemosensor to copper ion is found at neutral pH value, which is within an appropriate range for biological and environmental applications.

Characteristics of the Cu^{2+} -2HBBH Complex. Job's plot and mole-ratio methods for determining the absorbance^{26,27} were applied to evaluate the stoichiometry of the Cu^{2+} -2-HBBH complex. Figure 5a shows the result of the investigation by the Job's method,²⁸ indicating a 1:1 complex stoichiometry between copper and the reagent. On the other hand, Fig. 5b also shows evidence of a 1:1 complex using Yoe and Jones' mole-ratio studies.²⁹

According to this stoichiometry, the stability constant of the complex was evaluated using the two Job's plots at different concentrations and the curved portion of the mole-ratio plot.^{26,27} For both methods, the conditional stability constant

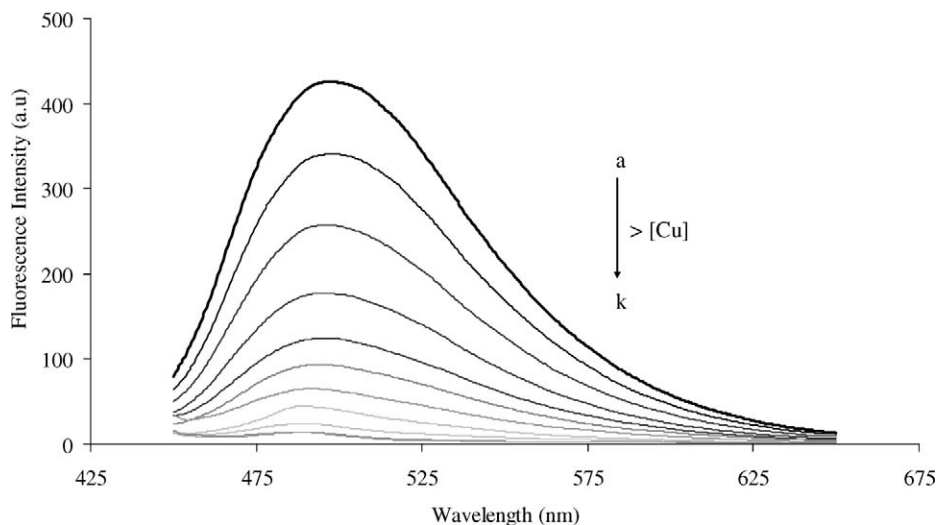


FIG. 3. Fluorescence emission spectra of 2-HBBH in the presence of different concentrations of Cu^{2+} in aqueous/ethanolic solution. Conditions: $C_{2\text{-HBBH}} = 180 \mu\text{M}$; $C_{\text{Cu}^{2+}}$ (μM): (a) 0; (b) 15.7; (c) 31.4; (d) 47.1; (e) 62.8; (f) 78.5; (g) 94.2; (h) 109.9; (i) 125.6; (j) 141.3; and (k) 157. Excitation and emission wavelengths were 424 and 490 nm, respectively.

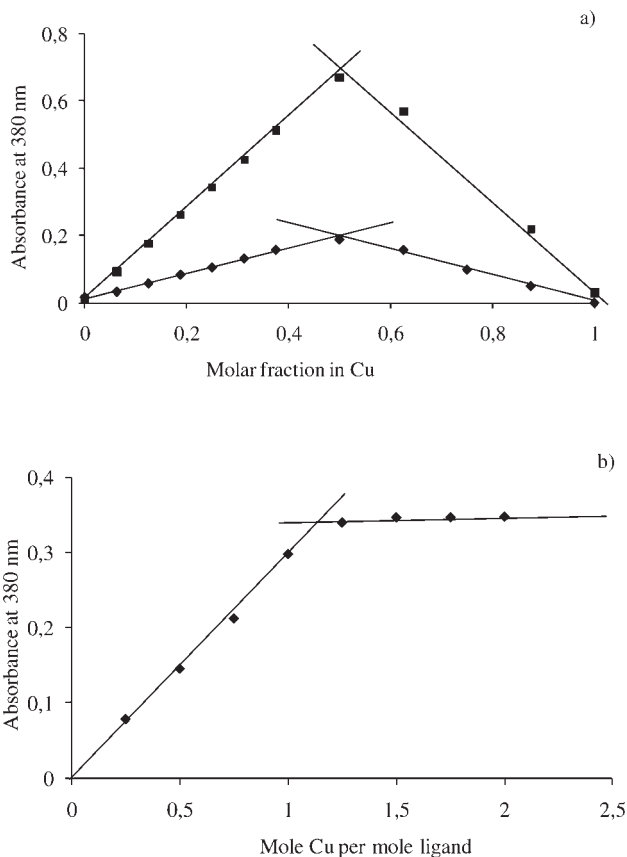


FIG. 5. Stoichiometry studies for Cu^{2+} -2-HBBH complex at 380 nm and pH 6.5: (a) Job's Plot using the following total concentrations: (\blacklozenge) $C_{2\text{-HBBH}} = C_{\text{Cu}^{2+}} = 1.2 \times 10^{-4}$ M and (\blacksquare) $C_{2\text{-HBBH}} = C_{\text{Cu}^{2+}} = 3.9 \times 10^{-4}$ M; (b) mole-ratio plot using the following total concentrations: $C_{2\text{-HBBH}} = C_{\text{Cu}^{2+}} = 10^{-4}$ M.

was found to be $6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, showing the formation of a very stable complex.

Taking into account the stoichiometry of the Cu^{2+} -2-HBBH complex, the Jahn-Teller effect, and the three suitable groups for forming coordination bonds of this ligand, a square planar geometry can be proposed for this complex.

This structure can be confirmed with several published papers about solid studies of this complex. The salicylaldehyde

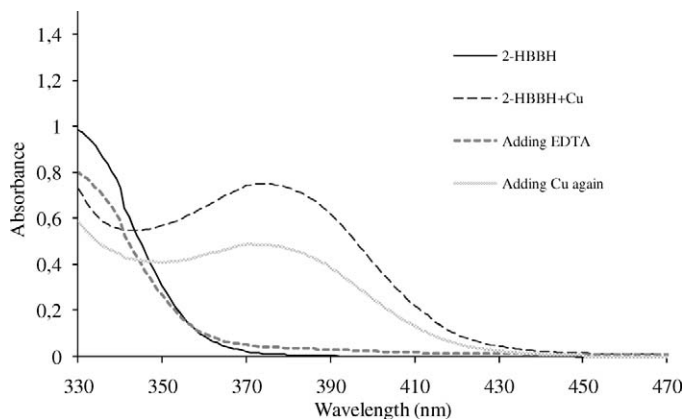


FIG. 6. Effect of the recovery of the sensor at 380 nm in aqueous/ethanolic solution ($C_{2\text{-HBBH}} = 54.3 \text{ }\mu\text{M}$; $C_{\text{Cu}^{2+}} = 26.7 \text{ }\mu\text{M}$) upon the addition of $C_{\text{EDTA}} = 64.3 \text{ }\mu\text{M}$ and $C_{\text{Cu}^{2+}} = 51.8 \text{ }\mu\text{M}$.

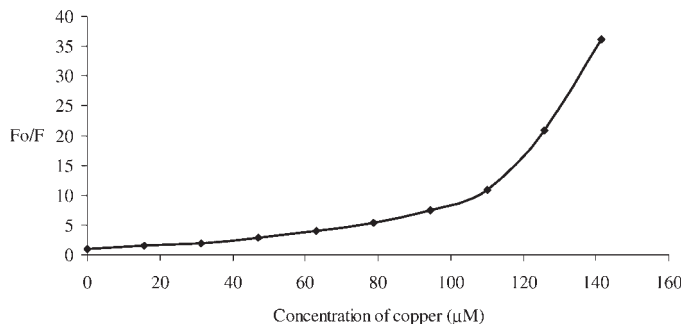


FIG. 7. Stern-Volmer plot of 2-HBBH with increasing concentrations of Cu^{2+} ions.

benzoylhydrazone coordinates to the copper atom as a planar, monoanionic, tridentate ligand through the phenolic oxygen, the imine nitrogen, and the amide oxygen in the equatorial plane.³⁰⁻³²

Reversibility of the Sensor. To examine the reversibility of the sensor, aqueous solution of a strong chelate ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) was added to the complexed solution of 2-HBBH and Cu^{2+} . As expected, due to the great difference in the formation constant between EDTA and 2-HBBH with copper ions ($\log K_{\text{EDTA-Cu}} = 18.7$;³³ $\log K_{2\text{-HBBH-Cu}} = 6.8$) the absorption band peak at 380 nm was completely removed from the spectra in the presence of EDTA, demonstrating that the binding is really chemically reversible. Further addition of Cu^{2+} could recover the absorption band (Fig. 6).

Calibration and Sensitivity. The fluorescence quenching data were analyzed using the Stern-Volmer relationship, which is given by the following equation:

$$F_0/F = 1 + K_{\text{SV}}[Q] \quad (1)$$

where F and F_0 are the fluorescence intensities of the reagent in the presence and absence of Cu^{2+} ion, respectively. $[Q]$ is the copper ion concentration (quencher) and K_{SV} is the Stern-Volmer quenching constant. If the system follows the Stern-Volmer relationship, the plot of F_0/F versus $[Q]$ should be linear and the quenching mechanism would be mainly due to the dynamic process, where diffusion is the dominant process. However, a nonlinear plot with positive deviation was obtained, as can be seen in Fig. 7. In this case, the quenching

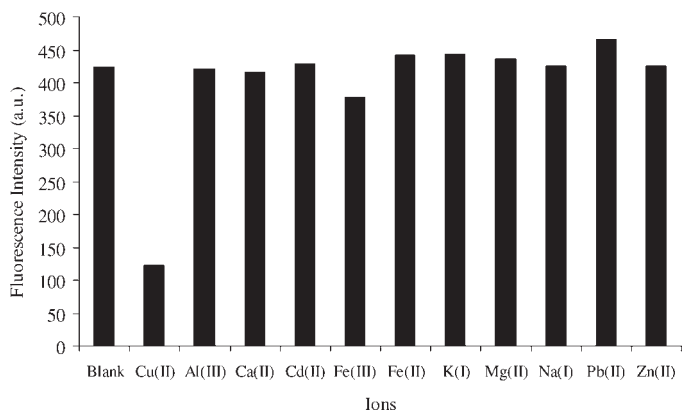


FIG. 8. Effect of metal ions on fluorescence of 2-HBBH at pH 7.0 in aqueous/ethanolic solution ($C_{2\text{-HBBH}} = 94 \text{ }\mu\text{M}$; $C_{\text{metal}} = 78.7 \text{ }\mu\text{M}$).

TABLE I. Interfering effect of other cations on the fluorescence signal of the copper sensor ($C_{2\text{-HBBH}} = 94 \mu\text{M}$ and 1:1 copper/interferent ratio): (a) low concentration $C_{\text{Cu}^{2+}} = C_{\text{interferent}} = 7.9 \mu\text{M}$; (b) high concentration $C_{\text{Cu}^{2+}} = C_{\text{interferent}} = 31.5 \mu\text{M}$.

Interfering ion	Relative error (%)	
	$C_{\text{Cu}^{2+}} =$	$C_{\text{Cu}^{2+}} =$
	$C_{\text{interferent}} = 7.9 \mu\text{M}$	$C_{\text{interferent}} = 31.5 \mu\text{M}$
Al ³⁺	-3.45	+1.16
Ca ²⁺	-4.66	-0.36
Cd ²⁺	-3.62	-3.03
K ⁺	+0.33	+3.57
Mg ²⁺	-1.51	-3.03
Na ⁺	-4.18	+2.50
Pb ²⁺	+0.79	-4.28
Zn ²⁺	-3.32	-3.03
Fe ³⁺	-6.49	-18.98
Fe ²⁺	+1.45	+3.74
Fe ³⁺ + ascorbic acid (4 mM)	+1.95	+4.99

was not purely collisional and this finding may be due to the formation of the ground-state complex or static quenching process.³⁴ For this system, no additional band was observed at a longer wavelength and the possibility of ground-state complex was discarded.³⁴ Then, the analysis of the data was carried out by employing the “sphere of action static quenching model”.³⁵

In order to linearize the nonlinearity of the response, a modified Stern–Volmer relationship was employed. In this, the static quenching is explained by introducing an additional factor C in the linear Stern–Volmer equation (Eq. 2) and using the logarithmic form of the equation (Eq. 3):

$$F_0/F = (1 + K_{SV}[Q])/C \quad (2)$$

$$\log(F_0/F) = K_{SV}[Q] + C \quad (3)$$

The modified Stern–Volmer plot of $\log(F_0/F)$ versus $[Q]$ showed a good linear relationship ($R^2 = 0.998$) in the studied range from 0.0 to 157.4 μM of copper ion solutions. K_{SV} and C were evaluated from the slope and intercept of the calibration plot, obtaining $9.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ and -0.006 , respectively.

The detection limit was calculated according to $DL = 3\sigma/S$,³⁶ where σ is the standard deviation of the blank signal ($n = 5$) and S is the slope of the calibration curve, and was found to be 5.6 μM of Cu^{2+} .

The repeatability of the method was evaluated using the relative standard deviation (RSD) of five replicate measure-

ments of a solution containing 78.7 μM of Cu^{2+} ion, giving a value of 5.2%.

Effect of Different Metal Ions on Fluorescence Intensity. Figure 8 shows a comparison of the quenching of fluorescence between copper ion and several other metal cations. The results showed that 2-HBBH was significantly quenched by the presence of Cu^{2+} ion. Many of the other cations did not produce such effects under identical conditions, producing only minor changes in fluorescence intensity. According to the rule of Irving–Williams, among the relevant paramagnetic metal ions, copper(II) has a particularly high thermodynamic affinity for typical N,O-chelate ligands and fast metal-to-ligand binding kinetics.^{9,37} Although the other metal ions also have the ability to form complexes, it is not as strong as that of copper ions, leading to the decreasing of fluorescence to only a certain degree.¹⁴

The above results imply that the selectivity of the reagent for Cu^{2+} is remarkable and suitable.

Interference Study. Finally, the selectivity of the sensor was tested, which is the ability to sense the Cu^{2+} ion in the presence of other metal ions. Table I shows the results obtained using two different concentrations at a ratio of 1:1 (Cu^{2+} ion:interference ion). Comparing the RSD value and the results obtained at both concentrations, many ions did not interfere with the metal determination and yielded errors lower than 5.2%. It can be noted that only Fe^{3+} ion showed higher relative errors.

To overcome such interference, Fe^{3+} was reduced to Fe^{2+} by 4 mM ascorbic acid, causing an error of not more than 5.2%, within the range of RSD.

Comparison Study. A comparison of the current published chemosensors has been done in terms of sensitivity, selectivity, and applicability (Table II). As can be seen, the method presented in this paper shows a high dynamic working range and good selectivity.

CONCLUSION

A fluorescent Cu^{2+} chemosensor based on the use of a common reagent was developed operating in neutral solutions and useful for applications in water solutions. The complexation of Cu^{2+} ion induced a strong fluorescence quenching of 2-HBBH. It showed the higher selectivity to Cu^{2+} over other metal cations that may co-exist.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to gratefully thank “Junta de Andalucía” and the University of Cádiz for the support of this work and the fellowship of E. Espada, and the University of Manchester for providing the facility for the

TABLE II. Analytical features of different current fluorescence chemosensors for determination of copper.

Ligand	LD (μM)	RSD (%)	Linear range (μM)	Selectivity	Reference
Tiron ^a	0.38	–	0.5–10	$\text{Co}^{2+,c}$	Kim et al., 2001 ³⁸
Zinc porphyrin-dipyridylamino	1.5	–	–	Good	Weng et al., 2007 ¹⁰
Salicylaldehyde hydrazone and rhodamine6G	0.01	3	0.05–5	Good	Xiang et al., 2008 ³⁹
L-cysteine-capped ZnS QDs	7.1	3.7	0–260	Fe^{3+} , $\text{Ag}^{+,d}$	Koneswaran et al., 2009 ⁴⁰
Rhodamine ^b	0.041	5.2	0.2–4	Hg^{2+}	Zhao et al., 2009 ⁷
2-HBBH	5.6	5.2	0–157.4	$\text{Fe}^{3+,e}$	This paper

^a Tiron: 4,5-dihydroxy-1,3-benzenedisulfonic acid.

^b Rhodamine: 1-(rhodamine B)lactam-thiosemicarbazide.

^c The interference effect of Co^{2+} is eliminated by adding sodium oxalate.

^d The luminescence intensity is minimally affected by Fe^{3+} and Ag^{+} at high concentrations.

^e The interference of Fe^{3+} is eliminated by adding ascorbic acid.

research. This work has been supported by Ministerio de Ciencia y Tecnología, Project CTM-2007-64678.

1. C. Bargossi, M. C. Fiorini, M. Montalti, L. Prodi, and N. Zaccheroni, *Coord. Chem. Rev.* **208**, 17 (2000).
2. L. Prodi, F. Bolletta, M. Montalti, and N. Zaccheroni, *Coord. Chem. Rev.* **205**, 59 (2000).
3. R. Martínez-Máñez and F. Sancenón, *Chem. Rev.* **103**, 4419 (2003).
4. M. B. Gholivand, P. Niroomandi, A. Yari, and M. Joshagani, *Anal. Chim. Acta* **538**, 225 (2005).
5. D. Fu and D. Yuan, *Spectrochim. Acta, Part A* **66**, 434 (2007).
6. J. H. Duffus, *Toxicologia Ambiental* (Omega, Barcelona, 1983), p. 40.
7. M. Zhao, X. F. Yang, S. He, and L. Wang, *Sens. Actuators, B* **135**, 625 (2009).
8. M. Beltramello, M. Gatos, F. Mancin, P. Tecillab, and U. Tonellato, *Tetrahedron Lett.* **42**, 9143 (2001).
9. H. G. Li, Z. Y. Yang, and D. D. Qin, *Inorg. Chem. Commun.* **12**, 494 (2009).
10. Y. Weng, Y. Teng, F. Yue, Y. Zhong, and B. Ye, *Inorg. Chem. Commun.* **10**, 443 (2007).
11. J. Wu, P. Wang, X. Zhang, and S. Wu, *Spectrochim. Acta, Part A* **65**, 749 (2006).
12. R. Martínez, F. Zapata, A. Caballero, A. Espinosa, A. Tarraga, and P. Molina, *Org. Lett.* **8**, 3235 (2006).
13. H. J. Kim, J. Hong, A. Hong, S. Ham, J. H. Lee, and J. S. Kim, *Org. Lett.* **10**, 1963 (2008).
14. Z. Liang, Z. Liu, L. Jiang, and Y. Gao, *Tetrahedron Lett.* **48**, 1629 (2007).
15. Y. Mei, P. A. Bentley, and W. Wang, *Tetrahedron Lett.* **47**, 2447 (2006).
16. M. X. Wang, X. M. Meng, M. Z. Zhu, and Q. X. Guo, *Chin. Chem. Lett.* **18**, 1403 (2007).
17. F. Grases, F. Garcia-Sanchez, and M. Valcarcel, *Anal. Chim. Acta* **119**, 359 (1980).
18. F. Grases, F. Garcia-Sanchez, and M. Valcarcel, *Anal. Chim. Acta* **125**, 21 (1981).
19. S. C. Chan, L. L. Koh, P. H. Leung, J. D. Ranford, and K. Y. Sim, *Inorg. Chim. Acta* **236**, 101 (1995).
20. D. K. Johnson, T. B. Murphy, N. J. Rose, W. H. Goodwin, and L. Pickart, *Inorg. Chim. Acta* **67**, 159 (1982).
21. E. W. Ainscough, A. M. Brodie, W. A. Denny, G. J. Finlay, S. A. Gothe, and J. D. Ranford, *J. Inorg. Biochem.* **77**, 125 (1999).
22. Y. H. Lu, Y. W. Lu, C. L. Wu, Q. Shao, X. L. Chen, and R. N. G. Bimbong, *Spectrochim. Acta, Part A* **65**, 695 (2006).
23. P. B. Sreeja and M. R. Prathapachandra Kurup, *Spectrochim. Acta, Part A* **61**, 331 (2005).
24. E. Espada, M. D. Galindo, A. Aouarram, and M. Garcia, *Anal. Sci.* **25**, 903 (2009).
25. M. Boiocchi, L. Fabbrizzi, M. Licchelli, D. Sacchi, M. Vázquez, and C. Zampa, *Chem. Commun.* **15**, 1812 (2003).
26. G. F. Kirkbright, T. S. West, and C. Woodward, *Anal. Chem.* **37**, 137 (1965).
27. D. A. Skoog, D. M. West, and F. J. Holler, *Fundamentals of Analytical Chemistry* (Saunders College Publishing, Philadelphia, 1996), 7th ed., p. 870.
28. P. Job, *Ann. Chim.* **9**, 113 (1928).
29. J. H. Yoe and A. L. Jones, *Ing. Eng. Chem. Anal.* **16**, 111 (1944).
30. E. W. Ainscough, A. M. Brodie, J. D. Ranford, and J. M. Waters, *Inorg. Chim. Acta* **236**, 83 (1995).
31. A. A. Aruffo, T. B. Murphy, D. K. Johnson, N. J. Rose, and V. Schomaker, *Inorg. Chim. Acta* **67**, L25 (1982).
32. M. Mohan, N. K. Gupta, M. Kumar, N. K. Jha, and W. E. Antholine, *Inorg. Chim. Acta* **197**, 39 (1992).
33. J. J. R. F. da Silva and R. J. P. Williams, *The Biological Chemistry of the Elements* (Clarendon Press, Oxford, 1991), p. 418.
34. J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (Springer, New York, 2006), 3rd ed., p. 277.
35. H. M. Suresh Kumar, R. S. Kunabenchi, J. S. Biradar, N. N. Math, J. S. Kadadevarmath, and S. R. Inamdar, *J. Lumin.* **116**, 35 (2006).
36. M. Valcárcel, *Principios de Química Analítica* (Springer, Barcelona, 1999), p. 80.
37. L. L. Zhou, H. Sun, X. H. Zhang, and S. K. Wu, *Spectrochim. Acta, Part A* **61**, 61 (2004).
38. H. S. Kim and H. S. Choi, *Talanta* **55**, 163 (2001).
39. Y. Xiang, Z. Li, X. Chen, and A. Tong, *Talanta* **74**, 1148 (2008).
40. M. Koneswaran and R. Narayanaswamy, *Sens. Actuators, B* **139**, 104 (2009).