



DESARROLLO DE PROCESOS QUÍMICOS DE
SEPARACIÓN POR MEMBRANAS PARA LA
CARACTERIZACIÓN DE SISTEMAS MARINOS
AFECTADOS POR CONTAMINACIÓN
METÁLICA

Tesis Doctoral
Universidad de Cádiz

Cristina Vergel Rodríguez
Cádiz, 2011

**DESARROLLO DE PROCESOS QUÍMICOS
DE SEPARACIÓN POR MEMBRANAS
PARA LA CARACTERIZACIÓN DE
SISTEMAS MARINOS AFECTADOS POR
CONTAMINACIÓN METÁLICA**

Tesis Doctoral

Cristina Vergel Rodríguez

Cádiz, 2011





“Desarrollo de procesos químicos de separación por membranas para la caracterización de sistemas marinos afectados por contaminación metálica”

Memoria presentada por la Licenciada en Química

Dña. Cristina Vergel Rodríguez

Para optar al grado de Doctor en Química por la Universidad de Cádiz

Fdo. Cristina Vergel Rodríguez

La presente Tesis Doctoral ha sido dirigida por los doctores D. Carlos Moreno Aguilar, Profesor Titular del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz y Dña. Carolina Mendiguchía Martínez, Profesora Contratada Doctor del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz, y cumple los requisitos exigidos por la legislación vigente.

Puerto Real a 7 de Noviembre de 2011

Fdo.: Carlos Moreno Aguilar

Fdo.: Carolina Mendiguchía Martínez

D. Manuel García Vargas, Catedrático de Universidad y Director del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz

CERTIFICA,

Que el presente trabajo, ha sido realizado íntegramente en los laboratorios del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz bajo la dirección conjunta de los profesores D. Carlos Moreno Aguilar y Dña. Carolina Mendiguchía Martínez, y reúne las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor en Química.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado, en Puerto Real a siete de noviembre de 2011.

Fdo.: Manuel García Vargas

La Presente Tesis Doctoral forma parte de los estudios realizados bajo el soporte económico del proyecto “Desarrollo de nueva metodología para la cuantificación de fracciones lábiles de metales pesados en agua de mar mediante la combinación de sistemas limpios de membrana y técnicas espectrométricas avanzadas” (CTM2007-64678/TECNO) del Plan Nacional de Investigación 2008-2010 del Ministerio de Educación y Ciencia.

Los trabajos descritos en la presente memoria de tesis se encuentran recogidos en las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos:

Publicaciones:

Vergel C., Mendiguchía C., García-Vargas M., Moreno C., *Quantification of free and bound fractions of nickel in natural waters by solvent extraction with 1,2-cyclohexanedione bis-bezoyl-hidrazone*, Solvent Extraction and Ion Exchange, 28, 625-635, 2010.

Vergel C., Mendiguchía C., Pinto J.J., García-Vargas M., Moreno C., *A new methodology for the chemical fractionation of nickel in natural waters by liquid membranes. Influence of organic and inorganic ligands*, Analytical Methods, Enviado.

Montoya R., Vergel C., Mendiguchía C., García-Vargas M., Moreno C., *HF-LPME as a green analytical technique to preconcentrate and determine nickel from natural waters*, Analytical and Bionalytical Chemistry (Special issue-Green analytical methods), En preparación.

Vergel C., Mendiguchía C., García-Vargas M., Moreno C., *Determination of labile and non-labile nickel fractions in natural waters*, Analytica Chimica Acta, En preparación.

Congresos:

Ponencias:

Using liquid membranes for the quantification and speciation of trace metals in natural waters, Cristina Vergel, José Antonio López López, Mostapha Benomar, Manolo García-Vargas, Carolina Mendiguchía, Juan José Pinto y Carlos Moreno, XII Reunión del Grupo Regional Andaluz de la Sociedad Española de Química Analítica (GRASEQA 2010), Córdoba (España), 10 y 11 de junio de 2010.

Comunicaciones póster:

Desarrollo de nuevos sistemas químicos para la separación selectiva de fracciones biodisponibles de níquel en agua de mar, Cristina Vergel, Carolina Mendiguchía, Manuel García-Vargas, Carlos Moreno, XI Reunión del Grupo Regional Andaluz de la Sociedad Española de Química Analítica (GRASEQA 2008), Huelva (España), 12-13 de junio de 2008.

Chemical separation of the labile fraction of nickel for its speciation in natural waters, Cristina Vergel, Carolina Mendiguchía, Manuel García-Vargas, Carlos Moreno, 12^{as} Jornadas de Análisis Instrumental, Barcelona (España), 21-23 de octubre de 2008.

Estudios sobre la mejora de los factores de preconcentración en sistemas de membrana líquida para la separación de níquel libre en aguas naturales, Cristina Vergel, Carolina Mendiguchía, Manuel García-Vargas, Carlos Moreno, XII Reunión del Grupo Regional Andaluz de la Sociedad Española de Química Analítica (GRASEQA 2010), Córdoba (España), 10 y 11 de junio de 2010.

Determination of different nickel fractions in natural waters using a liquid membrane system, Cristina Vergel, Carolina Mendiguchía, Manuel García-Vargas, Carlos Moreno, 13^{as} Jornadas de Análisis Instrumental, Barcelona (España), 14-16 de noviembre de 2011.

A green analytical alternative to analyse nickel in natural waters using a solvent-less methodology, Rocío Montoya, Cristina Vergel, Carolina Mendiguchía, Manuel García-Vargas, Carlos Moreno, 13^{as} Jornadas de Análisis Instrumental, Barcelona (España), 14-16 de noviembre de 2011.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincera gratitud a todas las personas que me han apoyado durante este largo y difícil camino para la realización de esta tesis. Cada una a su manera, me han ayudado para poder llegar a ser mejor como profesional y persona.

A D. Carlos Moreno Aguilar, por su inmejorable labor como director con su siempre sabio consejo e inagotable paciencia, gracias a él he podido desarrollar los conocimientos adquiridos durante mi proceso de aprendizaje como investigadora.

A Dña. Carolina Mendiguchía Martínez, directora de esta tesis por su incondicional ayuda, sin la cual, no hubiera sido posible realizar este trabajo, pero principalmente por ser una de las mejores personas que he conocido en mi vida y una gran profesional. Nunca podré dejar de agradecerle los conocimientos tanto científicos como personales que me ha brindado.

A D. Manuel García Vargas, por su apoyo como director del Grupo de Investigación de "Geoquímica Marina" en el que me encuentro y ayudarme en todo lo que he necesitado durante estos años.

A D. Juan José Pinto Ganfornina, por ser uno de los mejores compañeros que he podido tener a mi lado, estando siempre dispuesto a echarme una mano cuando lo he necesitado.

Gracias a D. Manuel Pedro Manuel Vez, por tener siempre una respuesta para todas mis consultas durante la tesis. Tus valiosos conocimientos y buenos consejos me han ayudado en mi trabajo diario en el laboratorio.

A mis compañeros Gemma, José, Juanjo, Juan Verdugo, Mirella, Mostapha, Rocío, Victoria y demás investigadores que han compartido conmigo en alguna ocasión el trabajo en el laboratorio del "CASEM", por darme apoyo moral en esos días en los que todo parece salir mal, aguantar mis interminables quejas y hacerme sentir como en casa, al haber encontrado en ellos buenos amigos para toda la vida.

No menos importante es la gratitud que quiero expresar hacia mis compañeros de "Ciencias", Abdellah, Bahija, Clara, Estrella, Hafida, Loli y Mariló. Siendo una gran ayuda en muchos momentos de la tesis, al haber compartido alegrías y penas en estos años.

Muy especialmente quería agradecer a mis compañeras de batalla Marga, M^o José y Marta con las que he compartido muchos años de mi vida, como estudiantes universitarias durante la carrera y realizando nuestras tesis doctorales, que me influyeron para adentrarme en el mundo de la investigación y a las que les debo mucho de lo que he conseguido en mi vida profesional.

A Antonio Benítez, por saber sacarme siempre una sonrisa y ser de una enorme ayuda a la hora de enfrentarme a los equipos de análisis instrumental, brindándome su inagotable conocimiento y tiempo sin condiciones.

A mis innumerables amigos que me han ayudado a soportar mejor los amargos momentos pasados durante la realización de esta tesis y con los que siempre puedo contar para compartir mis alegrías y penas.

Es mi deseo, dedicarle el trabajo realizado en la presente tesis, a mis padres y hermanas quienes me han apoyado permanentemente, contribuyendo incondicionalmente a lograr todas las metas y objetivos que me he propuesto en la vida. Entre ellos especialmente a mi pareja José Antonio aka "Hieru", que con su apoyo incondicional, increíble personalidad y mejor corazón le da sentido a mi vida.

A mi familia,

ÍNDICE

OBJETIVOS	1
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	5
I.I. CONTAMINACIÓN METÁLICA EN EL MEDIO AMBIENTE.....	9
Níquel en el medio ambiente	11
Ciclos biogeoquímicos de los metales en el medio acuático	12
I.II. ESPECIACIÓN Y TOXICIDAD DE LOS METALES EN EL MEDIO ACUÁTICO.....	16
Reacciones de formación de complejos	19
Formación de complejos orgánicos en aguas naturales	23
Toxicidad y biodisponibilidad de los metales para los organismos acuáticos	30
I.III. MODELOS TEÓRICOS PARA LA INTERACCIÓN METAL-SUSTANCIAS HÚMICAS.....	34
Modelo V (Humic Ion-Binding Model V)	35
<i>Formación de complejos entre el catión metálico y las sustancias húmicas</i>	36
<i>Enlace no específico de los cationes por acumulación de contraión</i>	38
Modelos VI y VII	38
Modelo NICA-Donnan	40
Aplicación de los modelos a la especiación de aguas naturales	42
I.IV. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA ESPECIACIÓN DE METALES EN AGUAS NATURALES.....	45
Técnicas electroquímicas	46
<i>Técnicas directas</i>	47
<i>Técnicas indirectas</i>	49
Técnicas no electroquímicas	51
I.V. METODOLOGÍAS DE MEMBRANAS LÍQUIDAS.....	57
Mecanismos de transporte	57

Configuraciones de membranas líquidas	61
<i>Membranas líquidas de volumen</i>	61
<i>Membranas líquidas soportadas</i>	62
<i>Membranas líquidas de emulsión</i>	65
Aplicaciones a la especiación de metales traza en aguas naturales	66
I.VI. EXTRACTANTES DE METALES EN MUESTRAS ACUOSAS.....	72
Extractantes que intercambian cationes	73
<i>Extractantes ácidos</i>	73
<i>Extractantes quelatantes</i>	76
Extractantes que intercambian aniones	77
Extractantes neutros o solvatantes	78
I.VII. BIBLIOGRAFÍA.....	83
CAPÍTULO II. SELECCIÓN DE UN SISTEMA DE TRANSPORTE PARA LA SEPARACIÓN DE DISTINTAS FRACCIONES DE NÍQUEL EN AGUAS NATURALES	113
II.I. INTRODUCCIÓN.....	115
II.II. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	121
Selección del agente extractante	121
<i>DEHPA como agente extractante</i>	121
<i>TBP como agente extractante</i>	122
<i>1,2-CHBBH como agente extractante</i>	123
Extracción y reextracción líquido-líquido	124
Efecto de los ligandos mayoritarios presentes en aguas naturales	127
II.III. RESULTADOS.....	128
Selección del agente extractante	128
<i>DEHPA como agente extractante</i>	128
<i>TBP como agente extractante</i>	133
<i>1,2-CHBBH como agente extractante</i>	135
Pruebas de solubilidad	136

<i>Pruebas de extracción</i>	137
Estudio de los sistemas de extracción Ni-DEHPA y Ni-CHBBH	139
<i>Efecto de los parámetros químicos en la extracción</i>	139
Sistema de extracción Ni-DEHPA	139
Sistema de extracción Ni-CHBBH	142
<i>Efecto de los ligandos inorgánicos en el sistema Ni-CHBBH</i>	144
<i>Efecto de los ligandos orgánicos en el sistema Ni-CHBBH</i>	146
II.IV. BIBLIOGRAFÍA.....	153
CAPÍTULO III. OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA DE TRANSPORTE Ni-CHBBH EN MEMBRANAS LÍQUIDAS DE VOLUMEN	157
III.I. INTRODUCCIÓN.....	159
III.II. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	160
Descripción de la celda	161
Optimización del sistema	162
Efecto de los ligandos	164
Eficiencia de extracción	164
III.III. RESULTADOS.....	165
Optimización del sistema	165
Efecto de los ligandos	169
<i>Efecto de los ligandos inorgánicos</i>	169
<i>Efecto de los ligandos orgánicos</i>	171
Eficiencia de extracción	172
<i>Efecto de los ligandos orgánicos</i>	175
III.IV. BIBLIOGRAFÍA.....	178
CAPÍTULO IV. SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE FRACCIONES DE NÍQUEL EN AGUAS NATURALES CON MEMBRANAS LÍQUIDAS DE VOLUMEN	179

IV.I. INTRODUCCIÓN.....	181
IV.II. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	183
Descripción de la celda	183
Optimización multivariante del sistema	185
Blancos del sistema	185
Eficiencia de extracción	186
Separación y determinación de distintas fracciones de níquel	187
IV.III. RESULTADOS.....	188
Optimización multivariante del sistema	188
Blancos del sistema	192
Eficiencia de extracción	193
Aplicación del sistema a la determinación de distintas fracciones de níquel	197
<i>Determinación de distintas fracciones de níquel en muestras reales</i>	200
<i>Comparación con modelos de especiación teóricos</i>	202
IV.IV. BIBLIOGRAFÍA.....	207
CAPÍTULO V. DETERMINACIÓN DE NÍQUEL EN AGUAS NATURALES MEDIANTE UN SISTEMA DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE LÍQUIDA CON CAPILARES DE FIBRA HUECA	209
V.I INTRODUCCIÓN.....	211
V.II. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	215
Descripción del sistema de microextracción	216
Optimización del sistema	218
Aplicabilidad del sistema al análisis de concentraciones traza	219
Análisis de la concentración muestras reales	221
<i>Cálculo del factor de enriquecimiento</i>	221
<i>Aplicación del sistema al análisis de níquel en muestras reales</i> ...	222
V.III. RESULTADOS.....	222

Optimización del sistema	222
Aplicabilidad del sistema al análisis concentraciones traza	227
Análisis de muestras reales	229
V.IV. BIBLIOGRAFÍA.....	232
CAPÍTULO VI. DETERMINACIÓN DE DISTINTAS FRACCIONES DE NÍQUEL EN AGUAS NATURALES MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN EN FASE LÍQUIDA CON CAPILARES DE FIBRA HUECA	237
VI.I INTRODUCCIÓN.....	239
VI.II. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	241
Descripción del sistema de microextracción	241
<i>Fibra Accurel PP Q 3/2</i>	242
<i>Fibra Accurel PP S 6/2</i>	245
Estudios preliminares	248
<i>Fibra Accurel PP Q 3/2</i>	248
<i>Fibra Accurel PP S 6/2</i>	249
Optimización del sistema	249
Aplicabilidad del sistema al análisis de concentraciones traza	250
Efecto de los ligandos	251
<i>Ligandos inorgánicos</i>	251
<i>Ligandos orgánicos</i>	251
Análisis de distintas fracciones de níquel en aguas naturales	252
VI.III. RESULTADOS.....	252
Estudios preliminares	252
<i>Pruebas de extracción con la fibra Accurel PP Q 3/2</i>	252
<i>Viabilidad de la mezcla keroseno/TBP como disolvente en la fase orgánica</i>	255
<i>Pruebas de extracción con la fibra Accurel PP S 6/2</i>	257
Optimización del sistema	258

Aplicabilidad del sistema al análisis de concentraciones traza.....	263
Efecto de los ligandos.....	264
<i>Ligandos inorgánicos.....</i>	<i>264</i>
<i>Ligandos orgánicos.....</i>	<i>265</i>
Análisis de distintas fracciones de níquel en aguas naturales.....	268
VI.IV. BIBLIOGRAFÍA.....	277
CONCLUSIONES.....	281
ANEXOS.....	287

OBJETIVOS

El **objetivo principal** del presente trabajo es desarrollar nuevos sistemas químicos de separación y preconcentración para la cuantificación de los contenidos totales y realizar la especiación de metales pesados en aguas naturales.

Para ello se han planteado varios **objetivos parciales**, todos ellos encaminados a la consecución del objetivo principal:

1. Estudio de los diferentes sistemas químicos (agentes extractantes, disolventes y agentes reextractantes) a través de sistemas de extracción líquido-líquido que posteriormente permitan realizar el transporte de metales pesados en agua de mar a través de membranas líquidas. Este objetivo se plantea bajo dos enfoques diferentes:

- Búsqueda y caracterización de sistemas de transporte que aporten información sobre el contenido total del metal.
- Búsqueda y caracterización de sistemas de transporte que aporten información sobre la fracción lábil del metal.

2. Optimización de las condiciones, tanto químicas como hidrodinámicas, de los sistemas de transporte para realizar la diferenciación entre las distintas fracciones

del metal en muestras sintéticas, utilizando para ello sistemas de membrana líquida de volumen.

3. Maximización de los factores de preconcentración para la aplicación de los nuevos sistemas a niveles de ultratrazas de metales pesados en muestras reales, utilizando para ello distintos sistemas de membranas líquidas.

4. Verificación de los nuevos sistemas desarrollados mediante el análisis y especiación de metales pesados en muestras de agua de mar reales con los sistemas desarrollados y la comparación de los resultados obtenidos con aquellos que se obtengan del análisis de las mismas muestras mediante técnicas de referencia.

5. Comparación de los resultados obtenidos con la metodología desarrollada con los datos teóricos de especiación a partir de modelos matemáticos que tienen en cuenta las constantes de formación de complejos usando software específico.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La gran importancia de los océanos en el mantenimiento de la vida en nuestro planeta se debe a que cubren el 71% de la superficie de la Tierra, siendo el compartimento ambiental que más vida sostiene y suponiendo el 97% de las aguas superficiales en el ciclo global hidrológico. Ya desde antiguo los humanos han utilizado los océanos como una de las fuentes más importantes para conseguir alimento y otros recursos. Sin embargo actualmente el aumento de la población mundial y el incremento de la necesidad de alimentos y materias primas están haciendo que los océanos sean explotados y utilizados como un enorme vertedero debido a la idea errónea de su inagotable autorregeneración. Estos vertidos procedentes de la mano del hombre han contribuido a aumentar las concentraciones naturales de ciertos contaminantes como hidrocarburos, compuestos organohalogenados o metales pesados, provocando su acumulación en los organismos acuáticos, y por tanto su introducción en la cadena trófica, así como su dispersión a través de los movimientos de masas de agua. En este sentido son numerosos los estudios existentes sobre los efectos causados por los metales pesados en diversos organismos marinos, los cuales pueden alterar diversos procesos fisiológicos y bioquímicos [1-4].

Para comprender adecuadamente el comportamiento de los metales en el medio marino, así como sus posibles efectos, es importante determinar las posibles fuentes de dichos elementos y las formas químicas en las que se encuentran. Es por ello, que están incrementando el número de estudios científicos, tanto básicos como aplicados, que se centran en el estudio de metales pesados en aguas, siendo de interés no sólo la cuantificación de contenidos totales sino muy especialmente de la fracción más lábil, debido a su mayor biodisponibilidad, y con ello a los posibles efectos que pudiera ocasionar. Aunque hoy en día existen diversas alternativas para abordar dichos estudios, aún restan algunos tipos de muestras que siguen presentando notable dificultad para su análisis, siendo una de ellas sin duda las muestras de aguas naturales.

En la actualidad, las posibilidades que proporcionan una mayor garantía en los resultados se dirigen hacia la utilización de técnicas analíticas de altas prestaciones, tales como la voltamperometría o la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) precedida de la aplicación de una etapa de separación (fundamentalmente extracción-reextracción con disolvente o cambio iónico) que requiere en muchas ocasiones de la utilización de metodologías de ultralimpieza y de Salas Blancas para evitar la contaminación de la muestra durante su manipulación. Estas alternativas resultan en general complejas y costosas, por lo que el objetivo principal de esta tesis consiste en el desarrollo de nuevos métodos analíticos para por un lado la cuantificación de la fracción biodisponible de metales pesados en agua de mar a niveles subtrazas y ultratrazas, utilizando metodologías asequibles, y por otro, la aplicación a niveles de concentración más elevados cuando pudieran producirse aportes antropogénicos en las aguas. Para ello, utilizando el níquel como ejemplo de elemento metálico que aparece en el medio acuático en bajas concentraciones, se han realizado una serie de estudios recogidos en el capítulo II para evaluar la viabilidad de varios sistemas químicos para determinar, por un lado la concentración total de níquel, y por otro diferenciar las distintas fracciones de níquel en aguas naturales, principalmente en aguas marinas donde las dificultades de análisis se acentúan. Una vez demostrada la

viabilidad de estos sistemas, en el capítulo III se expone cómo se traslada el sistema químico elegido para la especiación a uno basado en el uso de una membrana líquida de volumen, que por su propia configuración, con fácil acceso a las disoluciones acuosas, muestra mayor facilidad para optimizar las variables físico-químicas que influyen en el sistema así como para ver el efecto de diferentes agentes complejantes en la extracción. Además, en el capítulo IV se presenta el estudio de separación de las distintas fracciones de níquel presentes en muestras reales con el sistema de membranas líquidas de volumen optimizado. Por último en los capítulos V y VI, con el objetivo de mejorar los factores de preconcentración obtenidos con la membrana líquida de volumen y reducir el impacto en el medio ambiente debido a los altos volúmenes de disolventes usados en este tipo de membranas, se presentan dos sistemas de microextracción en fase líquida (LPME, Liquid Phase Microextraction), uno para contenidos totales de níquel y otro para su especiación. De este modo conseguimos desarrollar un método englobado dentro de la llamada “Química Analítica Verde” (GAC, Green Analytical Chemistry), siendo una alternativa para reemplazar las metodologías contaminantes por otras denominadas “limpias”, con menores efectos negativos sobre el medio.

I.I. CONTAMINACIÓN METÁLICA EN EL MEDIO AMBIENTE

Hace algunos años, Nriagu y Pacyna, en uno de sus trabajos publicados en *Nature* indicaban que “el considerable aumento en la circulación de metales tóxicos a través del suelo, agua y aire, se ha convertido en un asunto medioambiental que entraña riesgos desconocidos para las generaciones venideras” [5]. Posiblemente ésta sea una de las causas principales por la que hoy en día son muchos los trabajos desarrollados en muy diversas áreas (química, geología, biología, ecología, física, medio ambiente, regulación, sectores productivos, etc.) que se basan en el estudio de los contenidos de

metales pesados en los distintos compartimentos ambientales en general, y en el medio acuático en particular.

Actualmente como consecuencia de la actividad humana y el cambio climático los ciclos biogeoquímicos más importantes de la Tierra, como el del agua, carbono, nitrógeno, azufre, etc están siendo modificados, lo que va a producir cambios en los ciclos globales de los contaminantes metálicos ya que se encuentran interrelacionados entre sí [6]. De hecho, el trabajo de Rauch y Pacyna muestra la gran influencia que tiene el ser humano en la contaminación por metales pesados, siendo el responsable de la movilización de prácticamente la mitad de la masa en los ciclos globales de estos elementos en la tierra [7]. No obstante, los metales pesados en las aguas naturales pueden tener dos orígenes diferenciados, uno natural y otro antrópico.

Entre los aportes naturales de estos elementos, podemos nombrar los procedentes de los fondos a través de procesos de lixiviación por las corrientes marinas o por los ríos durante su camino hacia su desembocadura en los océanos. Por otro lado, pueden tener una procedencia atmosférica a través de deposición de polvos terrestres. Incluso, en ciertos casos, estos elementos pueden aparecer en los distintos compartimentos ambientales a través de la biota.

El origen antrópico de los metales pesados en los ecosistemas acuáticos puede producirse a través de varias fuentes. Estos elementos pueden llegar a la atmósfera como partículas o como vapores, por combustión de combustibles fósiles, producción de cemento y la industria metalúrgica extractiva [8]. Por ejemplo, es conocido que ciertos metales, como Hg, As, Se, Sn y Pb pueden ser metilados y/o llegar a la atmósfera en estado vapor, alcanzando los océanos como vapores inorgánicos procedentes de la quema de carbón. Desde un punto de vista global, esta fuente de contaminación antropogénica por vía atmosférica supone un flujo anual a los ecosistemas marinos por deposición seca o húmeda de más del 70% de plomo y vanadio, sobre el 30% de mercurio y el 20% de cadmio. A modo de ejemplo, Nriagu

señala que más del 50% de los flujos de los metales traza en los Grandes Lagos se producen a través de la atmósfera [9].

Por otro lado, las descargas humanas procedentes de aguas tratadas en depuradoras, procedentes de la industria y de la agricultura, contienen cantidades relativamente grandes de metales pesados en comparación con sus valores naturales en los ecosistemas acuáticos. Es por ello, que existen varios trabajos enfocados a la evaluación de las distintas aportaciones antropogénicas de metales a las aguas naturales [10-13].

Níquel en el medio ambiente

Entre los distintos metales traza usados por el hombre el níquel es un elemento de notable importancia para la industria moderna, como actividades mineras o industriales en la metalurgia, electrónica y construcción, siendo su uso más importante el proceso de fabricación de aceros y otras aleaciones. Este metal tiene un papel importante en el medio ambiente, ya que a pesar de ser un elemento esencial para diversos organismos, puede actuar como tóxico cuando se encuentra en concentraciones superiores a las naturales [14-15]. Las concentraciones normales a las que se encuentra este metal en los medios acuáticos suelen ser relativamente bajas, en torno a $0,2-0,7 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ en océanos y menor a $2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ en ríos [16]. Sin embargo, en la última década, varios investigadores han detectado un incremento bastante significativo en la concentración de níquel en las aguas naturales [17-19]. Estas altas concentraciones de níquel encontradas en los diversos compartimentos acuáticos son de origen principalmente antropogénico, siendo alguna de las fuentes más contaminantes de níquel el proceso de combustión de aceites y combustibles residuales, la extracción de níquel y la refinería, y la incineración de residuos municipales, la cual representa el 90% del total de las emisiones de níquel globales al medio ambiente [16].

Debido al gran impacto ambiental producido por el aumento en la concentración natural de níquel y otros metales en los ecosistemas acuáticos, ha surgido el interés de desarrollar nuevos métodos para su detección y remediación. Por ello, con el objeto de reducir costes y evitar la contaminación de los ecosistemas acuáticos se han desarrollado varios sistemas de extracción y/o preconcentración para la recuperación de níquel total en diversos tipos de muestras como baños procedentes de los tratamientos superficiales de piezas metálicas, así como en muestras de aguas naturales que pueden proceder de vertidos [20-23]. Sin embargo, una vez que el metal ha llegado al medio, es importante establecer los niveles del mismo para valorar su toxicidad para los organismos acuáticos. En este sentido, mucho más importante que conocer el contenido total de metales es diferenciar las distintas especies químicas que se forman, pues tan sólo aquellas que sean asimilables por los organismos vivos causarán efectos nocivos en los mismos, mientras que aquellas que no se asimilen presentarán evidentemente un menor interés. En este sentido, la geoquímica, biodisponibilidad y toxicidad de los metales en el medio acuático dependen fuertemente de las características fisicoquímicas de las diferentes formas en las que éstos se encuentran presentes, es decir, de su especiación. A su vez dicha especiación depende no sólo de la concentración total del metal sino de las características fisicoquímicas del medio y de la interacción entre los distintos compartimentos ambientales (agua, sedimento, biota), por lo que el conocimiento de los ciclos biogeoquímicos en los que pueden participar los metales es de especial interés.

Ciclos biogeoquímicos de los metales en el medio acuático

Los metales son contaminantes de tipo persistente, por lo que una vez que se encuentran en el medio acuático se van a distribuir entre los distintos compartimentos naturales aire-agua-sedimento-biota, que a su vez se encuentran interrelacionados entre sí. Esta distribución va a depender de su reactividad y de las condiciones

fisicoquímicas del medio acuático en el que se encuentren. Es por ello que el impacto ambiental producido va a estar relacionado con su especiación y distribución entre los compartimentos que constituyen el ecosistema en el que se encuentren, por ejemplo por cambios en su estado de oxidación o por su incorporación a los seres vivos [24].

Un aspecto importante de los ecosistemas acuáticos es que son sistemas dinámicos, existiendo un equilibrio químico entre las diferentes especies formadas, que además incluye la interconversión entre especies debido a cambios por procesos de transporte o consumo de las mismas por reacciones químicas o asimilación por los organismos [25]. Es por ello, que para determinar el destino de los metales en estos ecosistemas se deben definir los procesos biogeoquímicos que gobiernan su distribución, como son los de adsorción, reacciones redox, volatilización y los procesos de meteorización. A su vez estos procesos se van a encontrar afectados por muchos factores propios del medio en el que se encuentren, como el pH, la fuerza iónica, las condiciones redox y la concentración de ligandos orgánicos e inorgánicos del medio, junto con la salinidad que es un factor destacado a tener en cuenta en los sistemas estuáricos [26-28].

El proceso de meteorización de los suelos y rocas proporciona una de las principales fuentes naturales de metales al medio acuático. Este proceso consiste en el desgaste físico, químico o biológico que sufren las rocas bajo la acción de diferentes agentes naturales, como el agua o el viento. Durante este proceso de fragmentación de las rocas y suelos se pueden obtener desde los metales en disolución, a la lixiviación o lavado de determinados componentes, que deja un residuo insoluble enriquecido en determinados elementos o compuestos metálicos, los cuales van a ser transportados por el agua o el viento siendo distribuidos entre los compartimentos de los ecosistemas acuáticos [29].

Otro proceso importante en la distribución de los metales entre los compartimentos del medio acuático es la volatilización de los metales traza, determinando si se van a encontrar en el agua o en el aire. A pesar de que la mayoría de

los metales poseen valores de presión de vapor y fugacidad bajos, el mercurio y los compuestos organometálicos como el metilmercurio (CH_3Hg^+) tienen tendencia a ser transportados desde el agua al aire por su baja presión parcial [30].

En la figura I.1 se puede apreciar de forma esquemática los principales procesos que van a controlar la movilidad y distribución de las distintas especies que pueden formar los metales en los ecosistemas acuáticos [31].

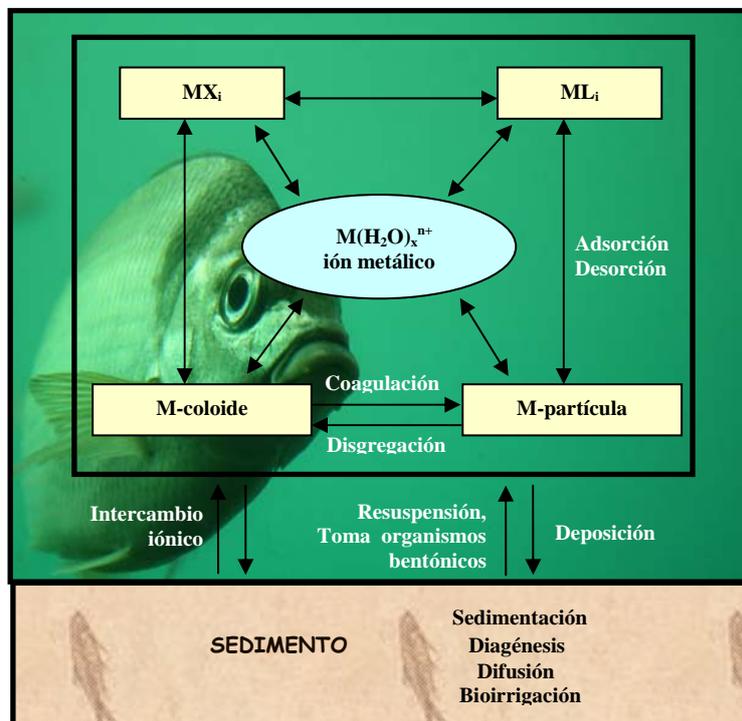


Figura I.1. Principales procesos que controlan la distribución de metales entre los compartimentos sedimento-agua-biota y su especiación en los ecosistemas acuáticos. ML_i : complejos con ligandos orgánicos e inorgánicos, MX_i : otros complejos formando especies ternarias. Tomado de Bianchi [31].

Los metales pueden llegar a depositarse en los sedimentos a través de la adsorción y/o formación de complejos en el medio acuático con partículas en suspensión que rápidamente van a ser depositados en los fondos del ecosistema, sitio

donde se pueden encontrar los mayores niveles de concentración de estos contaminantes [32]. Estos procesos de adsorción/desorción cobran especial importancia en los sistemas estuáricos, tanto en el sedimento como en la columna de agua debido a la interacción entre ambos compartimentos. Por ejemplo, la movilización de elementos como el Mn procedente del agua intersticial de los poros del sedimento y su posterior adsorción en las partículas presentes en la columna de agua es uno de los mecanismos que controlan los cambios estacionales de las concentraciones de Mn disuelto en aguas estuáricas [33]. El control de las concentraciones de cobalto disuelto en sistemas estuáricos también se debe principalmente a los procesos de adsorción y desorción [34]. Entre otras partículas en suspensión, los coloides tanto inorgánicos como orgánicos intervienen en los procesos de adsorción de metales, mostrando una gran importancia en el comportamiento de estos elementos en los ecosistemas acuáticos [35,36]. En este sentido varios autores han observado que la transferencia de níquel y hierro disuelto hacia la fase particulada es facilitada a través de las partículas coloidales [37,38].

Estos procesos de adsorción/desorción junto con otros procesos que tienen lugar una vez que el metal se encuentra en el sedimento, como la floculación, coagulación, resuspensión, bioturbación y bioirrigación van a determinar la distribución de los metales entre los compartimentos agua-sedimento [39,40].

Los procesos de diagénesis pueden producirse por reacciones redox mediadas por microorganismos o por reacciones predominantemente abióticas como difusión, disolución y precipitación que tienen lugar en la fase líquida del sedimento. En cuanto a los procesos de bioturbación se van a producir en la fase sólida del sedimento a través de transferencia continua de partículas entre distintos estratos por organismos que habitan en el mismo [41]. La bioirrigación tiene lugar en la fase líquida del sedimento, transportándose de forma activa el agua del fondo por los organismos. Como se puede apreciar en estos procesos los microorganismos bentónicos van a jugar un papel importante en los ciclos de los metales [42,43].

Una vez en el medio acuático, la forma termodinámica más estable de estos metales va a ser determinada por el potencial de oxidación. Un ejemplo claro es el del hierro que en un ambiente anóxico se encuentra como ión ferroso Fe(II) disuelto, pero en presencia de oxígeno el hierro se oxida al ión férrico Fe(III) que rápidamente precipita, disminuyendo la concentración de hierro en la columna de agua [44]. De hecho, el reparto de la concentración de cobre entre las fases disuelta y sólida en el sedimento parece estar controlada por el enlace con óxidos durante la reducción microbiana de los óxidos de Fe y Mn [45]. Por otro lado, el potencial de oxidación del medio puede jugar un papel importante en la toxicidad de los metales, siendo un claro ejemplo la diferente toxicidad que presentan las especies de arsénico, siendo As(III) mucho más tóxica que As(V) [39,40].

La presencia de distintos ligandos en el medio también juega un papel fundamental en la forma en la que el metal se presenta y por tanto en su toxicidad, dependiendo de la disponibilidad de los complejos ML_i o MX_i que se formen.

En general puede decirse que el metal de la columna de agua va a encontrarse más disponible para la biota que aquel que se encuentra en el sedimento. Sin embargo, cualquiera de los procesos antes mencionados puede ocasionar que el metal del sedimento pase a la columna de agua siendo así más disponible para los organismos. A continuación se explica en más detalle la influencia de las distintas formas químicas del metal sobre la biota.

I.II. ESPECIACIÓN Y TOXICIDAD DE LOS METALES EN EL MEDIO ACUÁTICO

El término especiación conlleva cierta confusión al ser utilizado por los investigadores indistintamente con diferentes connotaciones. Como Bernhard y col. explican en su estudio sobre la importancia de la especiación química en los procesos medioambientales, este concepto ha sido utilizado con diferentes acepciones [46]:

- Descripción de las distintas transformaciones que tienen lugar durante los ciclos geoquímicos de los elementos. Por ejemplo, las fracciones de metal separadas mediante los procedimientos de extracción secuencial en un sedimento: fracción soluble en agua/ácido, intercambiable, reducible, oxidable y residual [47,48].

- Actividad analítica de identificar y medir las especies presentes en las muestras. Por ejemplo con voltametría de redisolución anódica (ASV) se puede realizar con éxito la especiación de cobre en sus fracciones lábil y no lábil en aguas naturales [49].

- Distribución entre las distintas especies de un elemento. Por ejemplo la diferenciación entre las especies As(III) y As(V), analizando la especie electroactiva As(III) y posterior análisis de As total después de reducir el As(V) a As(III) con reactivos del tipo de la L-cisteína [50].

Siguiendo las recomendaciones de la IUPAC, el término “especiación” debe ser utilizado únicamente para referirse a la última acepción, es decir, al proceso de distribución entre las distintas especies de un elemento, siendo los dos anteriores denominadas como transformación de especies y distribución de especies, respectivamente [25]. Como “especie” se entiende una forma química de un elemento definida por su composición isotópica, electrónica o estado de oxidación y/o estructura molecular. En el caso de muestras de aguas naturales, las diferentes especies metálicas que podremos encontrar dependen de numerosos factores, tales como el pH, potencial redox, concentración de ligandos, concentración del metal de interés, concentración de otros metales susceptibles de formar complejos con los ligandos presentes, etc. Todos estos factores serán pues decisivos en el comportamiento y por tanto en la biodisponibilidad de un determinado metal.

Por otro lado existe la posibilidad de diferenciar entre las distintas fracciones de uno o varios elementos presentes en la muestra estudiada según sus propiedades físicas (tamaño, solubilidad, etc) o químicas (reactividad, enlace, etc), denominándose a este proceso “fraccionamiento” [25]. Este término conlleva la dificultad de definir

dichas fracciones, teniendo dos connotaciones diferentes cuando se realiza la separación entre las fracciones lábiles y no lábiles de un metal, una de ellas funcional y otra operacional. Es decir, desde un punto de vista funcional podemos identificar una especie que, por ejemplo, sea más tóxica o se encuentre más disponible para los organismos que otra. Por el contrario podemos identificar y distinguir una especie por discriminación electroquímica y/o cinética, es decir, de una forma operacional. La mayoría de los investigadores tienden a realizar una definición de las especies de tipo operacional, por lo que la “labilidad” de las especies definidas de este modo va a depender de la técnica utilizada para su análisis y de las condiciones bajo las que se realice el análisis. Esto significa que las distintas fracciones presentes en la muestra pueden variar de una metodología a otra, por lo que es indispensable definir las bien en cada caso, así como las condiciones en las que el análisis ha sido realizado.

No obstante, es habitual realizar esta separación entre la denominada fracción lábil y no lábil de un metal. La proporción existente entre la fracción lábil y no lábil será lo que determine en muchos casos que dicho metal actúe como tóxico o como nutriente. De un modo sencillo se puede definir la fracción lábil de un metal como aquella que aparece en forma de iones libres hidratados o como complejos fácilmente intercambiables. Este tipo de complejos se relacionan principalmente con aquellos que el metal forma con los principales ligandos inorgánicos presentes en las aguas naturales como cloruros, carbonatos, sulfatos, hidróxidos y fluoruros y cuyas constantes de formación son débiles [51,52]. Por otro lado, como fracción no lábil se entiende aquella en la que el metal se encuentra formando complejos más estables, cuyas constantes de formación son mucho más altas y que habitualmente incluyen la mayoría de los complejos orgánicos [53].

Esta fracción no lábil es una de las más difíciles de caracterizar debido a que los ligandos orgánicos pueden ser de muy diversa naturaleza, lo cual puede condicionar el comportamiento de los iones metálicos en las aguas naturales. En general, la mayor parte de la materia orgánica disuelta en las aguas naturales se compone de sustancias

húmicas, con un contenido en carbono de más del 50% en muestras marinas y fluviales, y otros compuestos orgánicos bien definidos, como ácidos carboxílicos, fenoles, aminoácidos, carbohidratos e hidrocarburos [54,55].

El origen de las sustancias húmicas en el medio acuático puede ser autóctono, formándose a partir de la unión química de moléculas de bajo peso molecular procedentes de la degradación de biopolímeros (proteínas, carbohidratos, etc.) que a su vez proceden de la degradación de organismos muertos, o bien alóctono, siendo extraídas de los suelos por lixiviación de los continentes. La gran heterogeneidad de las sustancias húmicas dificulta en gran medida su definición, la cual suele realizarse desde un punto de vista operacional. De este modo, Thurman y col. las definen como ácidos orgánicos polielectrolíticos coloreados que pueden ser separados del agua haciéndolos pasar por una resina XAD, una resina básica de intercambio iónico u otro proceso similar [55]. No obstante, en general pueden dividirse en 3 fracciones: los ácidos húmicos, que precipitan a pH 2 o menor y son solubles a pH básicos, los ácidos fúlvicos, que son solubles a pH ácidos y básicos, y la humina, que consiste en la asociación fuerte de los ácidos húmicos con la materia mineral, siendo por lo tanto insoluble a cualquier pH. En general los ácidos húmicos y humina se encuentran asociados a los suelos y sedimentos como parte de la fase sólida, mientras que los ácidos fúlvicos constituyen una fracción de las sustancias húmicas más móvil y se corresponde principalmente con el carbono orgánico disuelto (COD) presente en la fase acuosa [54]. Del total de las sustancias húmicas en aguas superficiales, los ácidos fúlvicos comprenden el 80% de los mismos, siendo el resto ácidos húmicos (20%) [56].

Reacciones de formación de complejos

Los metales una vez que llegan al medio acuático van a encontrarse en un estado de oxidación determinado, pudiendo enlazar con otros elementos en disolución

con pares de electrones libres (bases de Lewis) como O, N y S gracias a su carácter electrofilico y conseguir una capa electrónica externa completa [31]. A este fenómeno se le denomina coordinación del metal. De este modo, se van a formar enlaces covalentes más fuertes que los electrostáticos formados con las moléculas de agua.

En general, los metales se encuentran en disolución formando enlaces fuertes con los átomos de oxígeno de las moléculas de agua, dando lugar a la especie $M(H_2O)_x^{n+}$, donde las moléculas de agua van a actuar como ligandos inorgánicos. Estas especies se denominan acuocomplejos y se corresponden con la especie conocida como ión libre del metal.

Existe la posibilidad de que otras especies diferentes a las moléculas de agua presentes en disolución, tanto orgánicas como inorgánicas, puedan reemplazar a una o varias moléculas de agua como ligandos en la esfera externa de hidratación formando complejos o complejos multidentados, respectivamente. Por tanto, es posible diferenciar dos tipos de complejos [54]:

- Complejo de esfera externa o par iónico (figura I.2.a), en el cual la coordinación con el ligando se realiza a través de la esfera de coordinación externa formada por moléculas de agua, unido al metal por fuerzas de tipo electrostáticas y puentes de hidrógeno.

- Complejo de esfera interna o “complejo” (figura I.2.b), si existe un enlace de tipo covalente entre el metal y un ligando diferente de la molécula de agua que contenga átomos con pares de electrones que pueda donar al metal, como O, N y S. En este caso es posible la formación de complejos en los que se han reemplazado dos o más moléculas de la esfera externa del metal, donde a los ligandos que lo forman se les denomina agentes quelantes, los cuales pueden enlazar con el metal por más de una posición de enlace. Este tipo de complejos se denominan multidentados o quelatos.

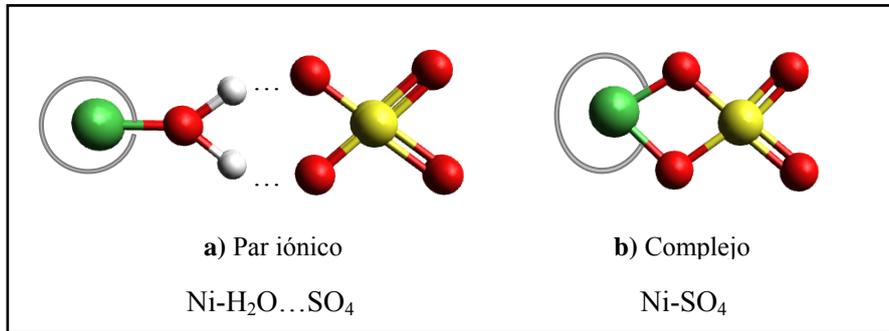
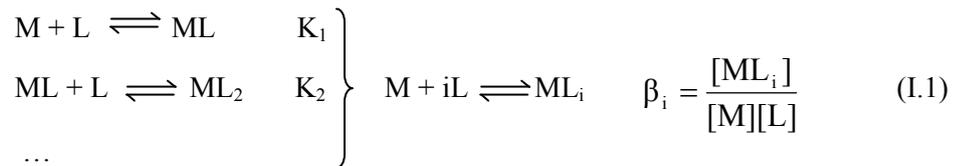


Figura I.2. Tipos de coordinación de metales en disolución acuosa, **a)** coordinación de esfera externa o par iónico, **b)** complejos de coordinación interna o “complejo”. La parte circular indica la esfera interna de coordinación del agua [54].

En general, podemos escribir la reacción que describe la interacción entre un catión metálico M^{n+} con un ligando L con las siguientes reacciones, donde las cargas se han omitido por simplicidad [54]:



donde K_1 , K_2 son las correspondientes constantes sucesivas de formación de los complejos formados en el equilibrio metal-ligando y β es la constante global de formación del complejo. A mayor constante de formación del complejo, mayor estabilidad y fuerza de enlace.

Como se ha comentado, los complejos pueden ser de tipo monodentado, bidentado, tridentado, etc. Por ejemplo, como ligandos que forman complejos monodentados están el amoníaco (NH_3) o los hidróxidos (OH), como los que forman complejos bidentados el oxalato, ftalato y etilendiamina (EN), y como ejemplos de ligandos que formen complejos multidentados el ácido etilendiaminotetraacético (AEDT) y el ácido trimetilenodiaminotetraacético (TMDTA). En la figura I.3 se

muestran las constantes de formación de complejos entre distintos metales y estos ligandos.

	NH ₃	OH ⁻	Oxalato	Ftalato	EN	EDTA	TMDTA
Cu ²⁺	4,00	6,30	6,20	4,00	10,50	18,70	18,82
Cd ²⁺	2,60	3,90	3,90	3,30	5,40	16,36	13,83
Pb ²⁺	1,60	6,30	4,90	3,60	5,00	17,88	13,70

Tabla I.1. Constantes logarítmicas de formación de complejos metálicos con distintos ligandos. Datos tomados de Tipping, 2002 [54].

Como se observa en la tabla I.1, para un mismo metal los complejos bidentados muestran mayor estabilidad que los monodentados, y los hexadentados más que los bidentados. En general, cuantos más enlaces se formen entre el ligando y el metal más estable será el complejo.

En este caso de ligandos que formen complejos multidentados se encontrarían las sustancias húmicas, las cuales son ligandos orgánicos polifuncionales y polielectrolíticos, que contienen en su estructura varias posiciones de enlace con las que puede enlazar con el catión metálico. Entre los muchos trabajos realizados para intentar caracterizar a las sustancias húmicas, Oliver y col. observaron que estas sustancias contenían varios grupos funcionales diferentes en su estructura molecular, como carboxilo, fenólico e hidroxilo, encontrándose en mayor proporción los carboxílicos [56]. A pesar de los esfuerzos realizados por muchos investigadores, aún existe poca información sobre estas posiciones de enlace y como les afectan los distintos factores químicos a la interacción metal-húmicos. Como consecuencia las sustancias húmicas presentan una gran heterogeneidad en las fuerzas de enlace y selectividad por los cationes entre los sitios de enlace [57]. Es por ello que varios autores han planteado distintas aproximaciones teóricas que intentan explicar las interacciones entre la materia orgánica y los cationes en los ecosistemas acuáticos y dar cuenta de las constantes de formación observadas experimentalmente. En algunos

casos se utiliza un modelo discreto con uno o dos tipos de grupos funcionales y en otros se usa una función de distribución continua para definir estas constantes de formación [58-61]. Sin embargo, es aún difícil predecir la especiación de los metales traza en las aguas naturales debido a la gran variabilidad de la composición de la materia orgánica y de sus constantes asociadas en este tipo de muestras medioambientales.

Formación de complejos orgánicos en aguas naturales

Debido a la complejidad y heterogeneidad de los ligandos orgánicos presentes en aguas naturales son numerosos los estudios realizados en los últimos 30 años para entender mejor el rol de la materia orgánica en la especiación de los metales en las aguas naturales, cuyos resultados han llevado al planteamiento de diferentes teorías que intentan ajustar los comportamientos de los metales observados experimentalmente en este tipo de muestras. Estas teorías se basan en la diferenciación de los distintos tipos de ligandos orgánicos presentes en las aguas naturales para explicar sus interacciones con los metales a través de las distintas fuerzas de enlace mostradas por los complejos orgánicos formados. Entre ellas, la más extendida es la teoría de la existencia de dos tipos de ligandos denominados L1 y L2, determinados con técnicas voltamétricas muy sensibles, que poseen constantes de formación logarítmicas en un rango de 12-14 para L1 y concentraciones de ligando $1-40 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ y entre 8-10 para L2 y concentraciones de ligando entre $6-150 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ [62].

En este sentido, Hirose presentó un estudio de los trabajos realizados desde 1980 encontrando la existencia de 3 tipos de ligandos orgánicos en la especiación de cobre en agua de mar, denominando L1 a los que formaban complejos de mayor fuerza, con $\log K > 13$, L2 a los que formaban complejos fuertes, con $\log K \sim 12$ y L3 a los que formaban complejos débiles, con $\log K < 10$ [63]. Sin embargo, explica que en las condiciones del agua de mar no se forman complejos de cobre con el tercer tipo de

ligando, siendo L1 y L2 los únicos que formarían este tipo de complejos. Además al determinar las constantes de estabilidad de estos ligandos asocia el ligando L1 con el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) y el ligando L2 con el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

Del mismo modo, Donat y col. en un estudio de especiación de níquel y cobre realizado a través de la aplicación de varias metodologías de análisis en una muestra de agua de mar, encuentran la existencia de un 27% de complejos orgánicos de cobre formados con los ligandos L1 ($\log K > 13,5$) y el 52-65% con L2 ($\log K = 9-9,6$), sin embargo para el níquel encontraron la formación de un sólo complejo extremadamente fuerte con $\log K > 17$ que suponía un tercio de la mitad de la concentración total de níquel presente en la muestra, encontrándose el resto del níquel formando complejos inorgánicos lábiles [64].

Moffet y col. además de utilizar la teoría de los dos tipos de ligandos para explicar la especiación de cobre en agua de mar, demostraron que el ligando orgánico fuerte L1 tiene un origen biológico pudiendo ser exudado por la cianobacteria *Synechococcus* cuando entra en contacto con el catión metálico [65]. Los intentos de identificar este ligando de naturaleza biológica suelen llevar a la idea de que se correspondería con algún componente intracelular, tal como metalotioneinas, fitoquelatinas, porfirinas y gránulos de fosfato excretados por el organismo después de su muerte [66-69].

Además de los estudios anteriores que demuestran la naturaleza biológica del ligando L1, se han desarrollado trabajos en este mismo sentido, que además introducen un mecanismo de desintoxicación de los microorganismos expuestos a los metales. Entre ellos, podemos citar el trabajo realizado por Bruland y col. en el que desarrollan además un modelo en el cual explican la creación por los microorganismos marinos de los ligandos fuertes de clase L1 [70]. Este modelo explica cómo el microorganismo es capaz de responder a diferentes condiciones de biodisponibilidad de cobre, es decir, si se encuentra con mayor concentración de cobre libre que es biodisponible y por tanto

puede entrar en la célula, induciría la síntesis de dicho ligando para controlar la concentración de cobre biodisponible en el medio acuático.

Aunque el modelo basado en la existencia de dos ligandos se encuentra ampliamente aceptado, existen autores que han intentado desarrollar otras alternativas. En este caso, Zirino y col. han desarrollado un modelo de cebolla que considera que los metales se encuentran en forma coloidal asociados a la materia orgánica [71]. El modelo consiste en asimilar las partículas coloidales a una estructura de capas o de esferas concéntricas, estando las capas formadas por moléculas orgánicas unidas por puentes de hidrogeno. Las interacciones con los metales se explican a través de enlaces de coordinación entre el metal y el átomo donador del ligando orgánico presente en cada capa. La reactividad de las capas va disminuyendo conforme el metal se acerca al centro de la cebolla debido a impedimentos estéricos producidos por las capas más externas.

Por otro lado el modelo L1 y L2 ha sido críticamente valorado por Town y Filella, mostrando que no existe la necesidad del uso de esta teoría para explicar la especiación de metales en aguas naturales y que no se tiene la suficiente información para definir la naturaleza de los ligandos [62]. De hecho, apuntan que a pesar de los esfuerzos realizados por varios autores no se ha conseguido identificar o aislar estos ligandos, los cuales han llegado incluso a ser descritos como “misteriosos” [72-74]. Para apoyar sus conclusiones Town y Filella realizaron un análisis exhaustivo de los datos publicados en los últimos 34 años sobre la complejación de los metales traza Cu(II), Zn(II), Pb(II) y Cd(II) en aguas naturales, observando que con los resultados obtenidos no existen evidencias sobre la naturaleza específica de los ligandos que entran en juego en la complejación, ni se puede asegurar que sea el mismo ligando el que forme complejo para cada ión metálico.

Una alternativa a los modelos discretos descritos anteriormente, como el de los ligandos L1 y L2 o el de las capas de la cebolla, sería los modelos que ajustan los datos obtenidos experimentalmente de las interacciones metal-materia orgánica a través de

isotermas empíricas. Estos modelos parten de isotermas como las de Freundlich y Langmuir, para describir la adsorción de los iones a superficies sólidas (entendiendo a la materia orgánica como dicha superficie) [75]. Estas isotermas se pueden desarrollar de una manera unimodal, es decir que pueden tener en cuenta la adsorción localizada con grupos de sitios idénticos que se encuentran distribuidos en la superficie de la materia orgánica [76-78], o bimodal en la que la adsorción se encuentra localizada en dos grupos de sitios diferentes presentes en la superficie heterogénea [79,80]. Esta última puede ser creada por combinación de dos isotermas mono-componentes, como las de Freundlich y Tóth [79]. Sin embargo, hay pocas aplicaciones de estos modelos para la explicación de las interacciones entre los iones metálicos y las sustancias húmicas, aunque han contribuido al desarrollo del modelo conocido como NICA desarrollado por Koopal y col. [79]. Estos autores estudiaron la aplicabilidad de esta isoterma al estudio de las interacciones metal-sustancias húmicas, ya que puede ser utilizada para describir el enlace competitivo multicomponente en el que la adsorción de cada componente por separado sigue una isoterma de tipo Langmuir. Para ello, utilizan los resultados obtenidos por Saar y Weber, los cuales analizaron la complejación de Cd con los ácidos fúlvicos a cuatro pH diferentes [81], comparando los resultados con los obtenidos con la ecuación NICA encontrando que los datos experimentales se ajustan bastante bien a los resultados predichos por el modelo propuesto. En cambio, dejan claro que necesitan realizar un trabajo más extenso en la aplicación de esta isoterma a las interacciones metal-ácidos húmicos, lo cual consiguieron posteriormente a través del modelo de especiación química NICA-Donnan que se detallará en un apartado posterior [82].

Finalmente, Buffle y col. utilizan otro modelo, basado en una distribución continua incluyendo la diferenciación entre sitios de enlace mayoritarios y minoritarios, en los ligandos orgánicos heterogéneos presentes en las aguas naturales [83]. Estos autores observaron que los sitios minoritarios, que suponían del 1 al 9% del total de sitios presentes, poseían valores de constantes de formación mayores y por

tanto formaban complejos más fuertes, influyendo en mayor medida en el control de la especiación de los metales traza en medios acuáticos. Estos sitios se encuentran formados por los grupos con átomos de N y S de las sustancias húmicas, los grupos –SH de las proteínas y los grupos -Mn-OH de hidróxidos de hierro con impurezas de manganeso. En cuanto a los sitios mayoritarios los describen como los grupos funcionales carboxilatos y fenolatos de las sustancias húmicas, los grupos carboxilatos de polisacáridos y proteínas o los grupos Fe-OH de los hidróxidos de hierro. Estos grupos representan el 90-99% del total de sitios presentes en los ligandos orgánicos y poseen constantes de formación de complejos con los metales menores.

Esta distribución de los sitios de enlace ha sido también encontrada por Guthrie y col. al realizar un estudio cinético con dos técnicas diferentes para determinar las distintas especies de níquel formadas en las aguas naturales y sus constantes de estabilidad [84]. Los resultados obtenidos corroboran la existencia en las sustancias húmicas de no más de un 1% de sitios fuertes, con el resto formado por sitios débiles. Además observaron con estos estudios que los sitios fuertes eran ocupados inicialmente por los iones Ni^{2+} y que el exceso pasaba a ser enlazado con los sitios más débiles formando complejos débiles. La cantidad de complejos orgánicos menos lábiles dependía de la relación $[\text{Ni(II)}]/[\text{AH}]$, ya que al disminuir esta relación molar disminuyen las posiciones lábiles ocupadas y con ellas la concentración de la fracción lábil (entendida como la suma de las especies Ni^{2+} más los complejos orgánicos lábiles) aumentando la proporción de los menos lábiles. También compararon las capacidades enlazantes de ácidos húmicos con fúlvicos para el níquel, encontrando que la disociación de los complejos Ni-AH es significativamente más lenta, siendo más estables y por ello fuertes que los formados con los fúlvicos. Este hecho lo explican por la diferencia existente en los grupos funcionales de ambos compuestos, teniendo los húmicos más cantidad de C, N, H y S en su estructura, aunque menos O que los fúlvicos, por lo que se pueden formar complejos más fuertes.

Varios estudios realizados en aguas naturales incluyendo sistemas marinos han mostrado que estos complejos orgánicos fuertes de níquel juegan un papel importante en la especiación de este metal. Donat y col. observaron que prácticamente del 30 al 50% de la concentración de níquel total disuelto en el sur de la Bahía de San Francisco se encontraba formando este tipo de complejos orgánicos con $\log K > 17$ [64]. Por otro lado, Sedlack y col. encontraron el mismo fenómeno en efluentes de vertidos de plantas de tratamiento con un 75% de la concentración de níquel disuelto formando complejos orgánicos fuertes y un 25% formando complejos moderadamente fuertes en los residuos de la superficie, con $\log K > 12$ [85]. Posteriormente, Bedsworth y Sedlak observaron que estos complejos fuertes formados en aguas estuáricas afectadas por efluentes de residuos industriales pueden estar formados por la especie NiEDTA^{2-} [86].

Martino y col. encontraron que el 70% del níquel disuelto en la muestra se encontraba formando complejos fuertes con constantes de estabilidad logarítmicas del orden de 18 [53]. Además observaron que la relación entre la fracción de níquel lábil y la fracción no lábil era uniforme en todo el gradiente de salinidad del estuario durante los análisis realizados, aunque la magnitud de esa relación mostró diferencias estacionales.

Worms y col. realizaron la determinación de la especie Ni^{2+} en presencia de distintos ligandos orgánicos, como citrato, diglicolato, sulfoxina, oxina, dietilditiocarbamato, ácido húmico acuático estándar (SRHA) y ácido fúlvico (SRFA), encontrando que los complejos hidrofóbicos formados, como $\text{Ni}(\text{DDC})_2^0$, resultaban ser lábiles dando una sobreestimación de la especie libre del metal medida con la técnica utilizada [87]. En cambio los valores de concentración medidos en presencia de complejos anfifílicos formados con las sustancias húmicas utilizadas se correspondían con los valores predichos por un programa de especiación química en equilibrio utilizando el modelo NICA-DONNAN, siendo complejos no lábiles.

De estos trabajos se desprende la existencia en las aguas naturales de dos tipos de complejos orgánicos principalmente con distinta biodisponibilidad, que van a influir en gran medida en la especiación de los metales traza en aguas naturales.

En general, como muestra la figura I.3., el níquel en las aguas naturales se encuentra mayoritariamente como el ión libre o formando complejos inorgánicos, de los cuales la mayor parte la constituyen los complejos formados con los cloruros y carbonatos. Dentro de los complejos orgánicos, como muestran los distintos trabajos expuestos anteriormente, es posible diferenciar dos grupos según la estabilidad de los mismos, siendo en general más abundantes aquellos más estables.

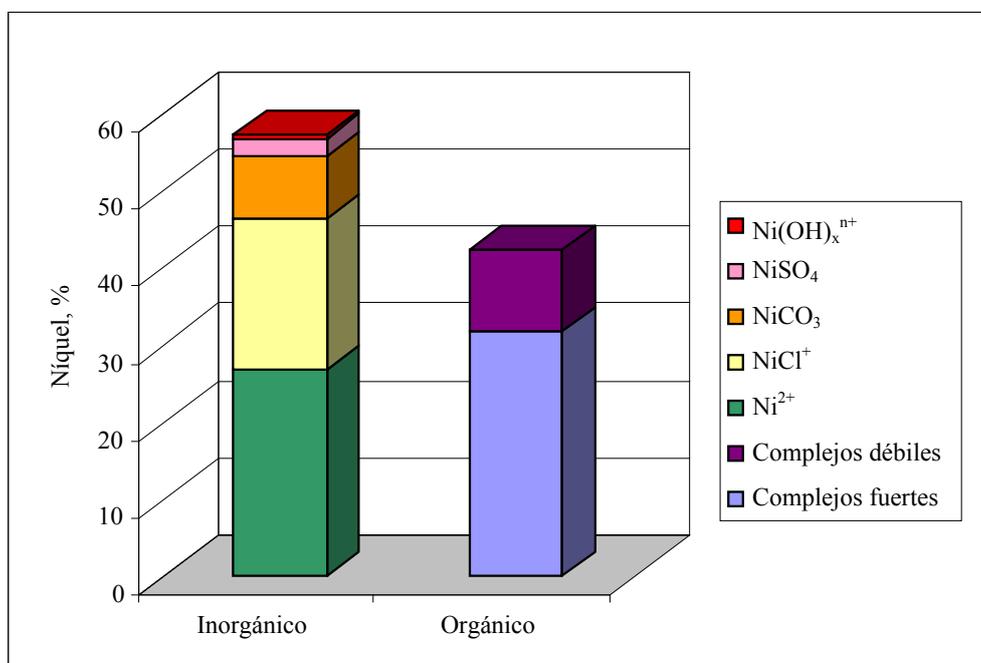


Figura I.3. Especiación de níquel en aguas naturales. Datos tomados de Martino y col. [53], Donat y col. [64], Turner y col. [88], Achterberg y col. [89].

El efecto generalizado de la presencia de estos compuestos estables es de reducción de la toxicidad por la disminución de la concentración de metal libre disuelto

por formación de complejos fuertes y por tanto no disponibles para los organismos acuáticos. Sin embargo, este efecto puede ser contrarrestado debido a que si la concentración del metal disuelto aumenta demasiado aumentará la presencia de complejos lábiles, debido a que el metal se enlazaré a los sitios más fuertes saturándolos, con lo que a partir de este momento se empezarán a formar complejos con los sitios débiles y por tanto serán más biodisponibles para los organismos aumentando la toxicidad del metal.

Toxicidad y biodisponibilidad de los metales para los organismos acuáticos

Como se ha comentado anteriormente, a mediados del siglo XX las sustancias húmicas comenzaron a adquirir un gran interés debido a que se observó que su presencia en las aguas naturales afectaba a la diferente biodisponibilidad de los metales traza para los organismos acuáticos. En este sentido, se han desarrollado dos modelos matemáticos para determinar la toxicidad y biodisponibilidad de los metales para los organismos acuáticos, el modelo de actividad del ión libre (FIAM, free ion activity model) y el modelo del ligando biótico (BLM, biotic ligand model). Ambos modelos afirman que la toxicidad aguda producida por un metal sobre la biota no se debe a la concentración total del metal, sino a la concentración del metal en su forma libre que es capaz de interactuar con el ligando biótico que se encuentra presente en la superficie de la pared celular de los organismos.

Según el modelo BLM esta concentración de metal libre se encontraría limitada por efectos de competencia entre el metal y otros metales en disolución por unirse con el sitio activo del ligando, como el calcio y magnesio, y entre ligandos por enlazar con el metal en cuestión. Dicha competencia afectará a la concentración de níquel libre y por tanto a su toxicidad al considerar que esta especie es la responsable de la misma. De este modo, los cationes causantes de la dureza del agua como calcio y magnesio junto con la materia orgánica natural (MON) van a afectar a la toxicidad del

metal sobre los organismos acuáticos, ya que si el metal se encuentra unido a la materia orgánica se encuentra menos biodisponible y por lo tanto se reduce la toxicidad del metal, como ha sido observado para el organismo *Daphnia pulex* [90].

Este modelo presenta la ventaja de poder ser utilizado para determinar las cargas contaminantes máximas de un vertido debido a que es capaz de predecir los efectos tóxicos que puede ocasionar sobre el organismo. Además, minimiza el número de organismos utilizados para realizar los test tradicionales y resulta económico y rápido [91]. En cambio presenta el inconveniente de no poder ser aplicado de forma genérica a todos los sistemas acuáticos, ya que responde a condiciones sitio específicas, es decir, en este modelo el ligando biótico se encuentra localizado en sitios diferentes dentro de la fisonomía del organismo de estudio, afectándole de forma diferente las condiciones químicas del medio. Por ejemplo, en peces el ligando biótico se encuentra localizado en las branquias [92-94]. Es por ello, que la información necesaria para aplicar este modelo debe ser generada para cada cuerpo de agua particular. De hecho, Niyogi y col. al desarrollar un modelo de ligando biótico (BLM) para determinar la toxicidad de cadmio en la trucha arcoiris, han encontrado que este modelo está limitado y no puede tener en cuenta los efectos de altos valores de pH y alcalinidad [95].

El modelo FIAM se basa en la misma idea que el anterior incorporando ciertas matizaciones, por ejemplo para que un metal se acumule y/o provoque una respuesta biológica sobre un organismo debe interactuar o atravesar la pared celular del mismo. En este modelo se incorpora la especie metal-ligando (ML) como posible fuente de concentración de metal libre tóxico a través de su previa disociación en el seno de la disolución. Los complejos tienen lugar con el ligando biótico, como en el caso del modelo anterior. En este modelo se supone que la respuesta biológica va a ser proporcional a la concentración de complejo formado entre el metal y la superficie celular, y que esta respuesta biológica va a depender únicamente de la concentración de ión libre presente en la muestra que podría incluir el procedente de la disociación de las

especies lábiles en disolución en caso de que se viera favorecida la formación del complejo en la superficie de la pared celular.

Entre las limitaciones observadas en este modelo, se encuentran las relacionadas con algunos ligandos orgánicos e inorgánicos presentes en el medio acuático, ya que pueden causar toxicidad a través de mecanismos no contemplados por el modelo. En cuanto a los ligandos orgánicos, Phinney y col. observaron que aquellos que forman complejos lipofílicos con los metales Cu, Cd y Pb aumentan la toxicidad producida en los organismos, debido a que atraviesan fácilmente la membrana celular, como el caso de la 8-hidroxiquinolina o los xantatos [96]. Otro ejemplo de esta limitación del modelo fue la detectada para Cd y Zn en presencia del ligando de bajo peso molecular citrato, ya que este ligando forma complejos hidrofílicos que el modelo supone que no van a contribuir directamente a la toxicidad del metal debido a su incapacidad de atravesar la membrana biológica. Sin embargo se observó que sí contribuían al flujo de metal a través de la membrana celular del *Selenastrum capricornutum* ocasionando un aumento de la biodisponibilidad de los metales [97,98]. Este hecho podría ser explicado por el transporte inespecífico del complejo a través de sistemas de transporte que utilizan otros cationes metálicos no tóxicos y fisiológicamente importantes, como el Ca o el Mg a través de la membrana celular. Por último, la materia orgánica disuelta (MOD) forma también complejos hidrofílicos que no pueden atravesar la membrana, en cambio si entre la MOD se encuentran ácidos fúlvicos, éstos han mostrado su capacidad de interactuar con la membrana celular y se tienen evidencias de su participación como proveedores de fósforo para las algas [99]. Debido a este hecho la aplicación de este modelo en sistemas acuáticos con presencia de MOD es complicada, debido a la heterogeneidad de la misma y a la dificultad de determinar analíticamente la concentración de la especie libre del metal en su presencia. Por otro lado, también se observó una menor toxicidad al usar el modelo para los complejos inorgánicos de aluminio con fluoruro, siendo la mayor

toxicidad observada experimentalmente debida a la capacidad del complejo formado para ocupar sitios activos en la membrana celular [100].

Finalmente, Van Leuween también observó que la biodisponibilidad de metales procedente de los complejos del medio en el modelo FIAM se encuentra limitada, por lo que desarrolló un modelo que incorpora varios aspectos cinéticos para ajustar más adecuadamente las observaciones experimentales con los organismos [101]. De este modo, se tienen en cuenta los efectos simultáneos de cinética de bioconversión entre especies y el transporte del metal a través de la pared celular acoplado a la cinética de disociación del metal.

Esta dependencia de la toxicidad de los metales con las distintas especies metálicas que proponen los modelos anteriormente descritos intenta explicar hechos experimentales que han sido observados en numerosas ocasiones. Poniendo como ejemplo el níquel, es posible citar el trabajo de Mandal y col., los cuales han observado en muestras contaminadas por níquel en Sudbury (Canadá) que la toxicidad producida en el alga *Pseudokirchneriella subcapitata* se encontraba relacionada con la relación Ni/COD, la suma de las concentraciones de las especies libres y lábiles y el coeficiente de velocidad de disociación de los complejos orgánicos formados [102]. El aumento de la toxicidad de níquel con la relación Ni/COD se explica de modo que al aumentar la concentración de níquel aumentará la cantidad de complejos orgánicos lábiles o biodisponibles por los organismos y con ellos aumentará la toxicidad del metal.

Por otro lado, Doig encontró que los ligandos orgánicos no influyen en gran medida en la especiación de níquel a concentraciones del metal tóxicas ($5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) para el organismo *Hyalella azteca* y concentraciones de COD representativas de las aguas naturales ($\sim 10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Sin embargo, a concentraciones inferiores de níquel ($0,2$ a $0,5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), que son conocidas como no tóxicas para los organismos, la materia orgánica disuelta afecta a la especiación de níquel, decreciendo la concentración de la especie Ni^{2+} con el aumento de la concentración de COD [103].

De lo expuesto anteriormente se entiende la necesidad de determinar las diferentes especies de un metal presentes en las aguas naturales para evaluar la posible toxicidad del mismo. Sin embargo, actualmente existen sólo algunas técnicas que permiten evaluar la fracción lábil y no lábil de un metal en el medio acuático y el desarrollo de nuevas metodologías en este sentido es un campo de creciente interés.

I.III. MODELOS TEÓRICOS PARA LA INTERACCIÓN METAL-SUSTANCIAS HÚMICAS

Debido a la gran dificultad de determinar las distintas especies metálicas en el medio acuático es habitual recurrir a bases de datos de constantes de formación de complejos que nos permitan calcular, bajo unas condiciones fisico-químicas determinadas, la distribución de especies. No obstante, hay que tener en cuenta que estas constantes nos informan sobre la distribución de las especies químicas en el equilibrio, y los sistemas medioambientales son dinámicos, por lo que sólo proporcionan una idea aproximada de la situación real. Esta aproximación resulta además muy compleja cuando hablamos de la interacción entre el metal y los ligandos orgánicos en las aguas naturales, debido a la dificultad de conocer la naturaleza y caracterización de la materia orgánica en dichos sistemas. Por ello, es necesario recurrir al uso de modelos matemáticos que explican este tipo de interacciones partiendo de distintas teorías, como las comentadas anteriormente del modelo discreto con uno o dos tipos de grupos funcionales y una constante específica para cada uno (por ejemplo carboxílico y fenólico) o un modelo multidentado o continuo con un rango de valores de constantes para cada sitio [58-61]. Sin embargo, recientemente se han realizado la aplicación de modelos de especiación en equilibrio que ajustan mejor los datos en los ecosistemas acuáticos, utilizando un modelo discreto. En general, entre estos modelos los más utilizados son el Humic Ion-Binding Model V, VI y VII desarrollados por Tipping y col. [104-106] y el NICA-Donnan descrito por Kinniburgh y col. [82], los cuales se describen en detalle a continuación.

Modelo V (Humic Ion-Binding Model V)

En este modelo las sustancias húmicas, incluyendo ácidos húmicos y fúlvicos, se aproximan a esferas rígidas de tamaño uniforme que pueden enlazar con los iones metálicos con una coordinación tanto monodentada como bidentada. Las interacciones producidas entre los iones se describen en términos de constantes de equilibrio intrínsecas y términos electrostáticos [104].

Los ácidos húmicos poseen en su conformación grupos funcionales de tipo ácido carboxílico o fenólico, con protones que serían intercambiados por los iones metálicos para formar el complejo. Es posible definir la disociación de un protón con la siguiente reacción:



donde Hum representa al compuesto húmico y Z a la carga.

El modelo asume la existencia de 8 puntos de disociación del protón diferentes entre sí, y por lo tanto con constantes de acidez diferentes. Las posiciones de la 1 a la 4 serán posiciones fuertes denominadas de clase A y por otro lado del 5 al 8 serán posiciones débiles de clase B. Las posiciones fuertes se asimilan a los grupos funcionales carboxílicos, mientras que las débiles a los fenólicos. Otra asunción que se realiza en el modelo es que existen la mitad de sitios tipo B (n_B) que de tipo A (n_A), aunque dentro de cada clase todos los puntos se presentan en igual número.

Las fuerzas de enlace de cada posición se determinan con los valores de pK de los cuatro grupos tipo A o B, que se describen como valores medios, pK_A o pK_B , y un factor, ΔpK_A o ΔpK_B , que describe la dispersión de los valores de pK_i respecto de los valores medios (pK_A o pK_B) [104].

$$\text{Para } i = \text{posiciones } 1 - 4 \quad pK_i = pK_A + \frac{(2i - 5)}{6} \cdot \Delta pK_A \quad (\text{I.6})$$

$$\text{Para } i = \text{posiciones } 5 - 8 \quad pK_i = pK_B + \frac{(2i-13)}{6} \cdot \Delta pK_B \quad (\text{I.7})$$

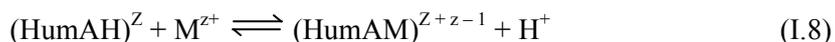
Observando las ecuaciones I.6 y I.7, podemos deducir que al aumentar el valor de i va a disminuir los valores de las constantes de acidez de los sitios dentro de cada grupo siendo además, como se ha comentado antes, los sitios tipo A posiciones de enlace más fuertes que las de tipo B.

Como se ha comentado anteriormente las reacciones de un metal con las sustancias orgánicas pueden tener lugar por la formación de un complejo de coordinación interna o bien mediante atracción electrostática formando un par iónico, por lo que el modelo recoge ambas interacciones.

Formación de complejos entre el catión metálico y las sustancias húmicas

El metal en este modelo y su primer producto de hidrólisis van a competir por los sitios de enlace presentes en la molécula de ácido húmico. Van a existir dos tipos de complejos entre el metal o su primer producto de hidrólisis y las posiciones antes descritas, uno monodentado en el que el enlace con el metal se va a producir por disociación de un protón en un sitio concreto y otro bidentado si el enlace se produce por disociación de un par de protones en dos sitios concretos.

Para los complejos monodentados la reacción se explica como un intercambio entre el metal y el protón del sitio A (ó B) a través de la siguiente reacción:



Por lo que la constante de equilibrio de formación del complejo vendrá descrita por la siguiente ecuación:

$$K_{M_{\Lambda,i}} = \frac{K_{MHA}}{K_i} \quad (\text{I.9})$$

Siendo $K_{MA,i}$ la constante de reacción entre el metal y la molécula de ácido húmico en la posición i , K_{MHA} constante del intercambio metal-protón y K_i la constante de acidez del sitio i . Por lo que para los complejos monodentados la fuerza de enlace del metal con la sustancia húmica va a depender principalmente de la fuerza de disociación del protón en la posición i .

$$\log K_{MA} = pK_i - pK_{MHA} \quad (I.10)$$

Los complejos bidentados se forman por unión del metal o de su primer producto de hidrólisis con dos sitios desprotonados, realizando combinaciones de los sitios A y B (tanto A-A como A-B) estando igualmente representadas todas las combinaciones posibles de estos sitios.



En este caso las constantes de equilibrio de formación del complejo bidentado con los sitios A y B, vendrá dada por los productos de los valores de los sitios individuales.

$$K_{\text{MH}_2\text{AB}} = K_{\text{MHA}} \cdot K_{\text{MHB}} \quad (I.12)$$

Hay que tener en cuenta que sólo se van a formar los complejos con los sitios desprotonados más cercanos, definiendo por tanto un factor de proximidad (f_{pr}) como la probabilidad de que existan pares de protones disociables con la proximidad suficiente (menor o igual a 0,45 nm) para poder formar enlaces bidentados con los cationes metálicos. La proximidad se estima estadísticamente asumiendo que los puntos se encuentran aleatoriamente distribuidos en la superficie de la esfera. El

modelo tiene en cuenta sólo 12 sitios bidentados representativos de los 36 posibles y con la misma probabilidad de producirse.

Enlace no específico de los cationes por acumulación de contraión

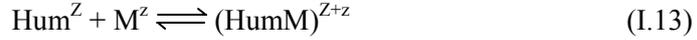
Las sustancias húmicas presentan habitualmente cierta carga negativa debido a la disociación de los protones y su reemplazo incompleto por iones metálicos coordinados. Para contrarrestar esta carga la molécula se rodea de contraiones denominando a la zona donde se sitúan estos, capa de difusión. Estos contraiones se encuentran enlazados con la molécula húmica por interacciones electrostáticas. En disoluciones diluidas todos los contraiones tienen la misma capacidad de formar parte de esa capa, por lo que la selectividad definida por dicha capacidad de encontrarse en la capa de difusión se fija en 1 para todos los iones. El tamaño de esa capa depende de la fuerza iónica del medio y del tamaño de la sustancia húmica y se calcula aplicando distintos modelos como el Donnan [54,82]. No obstante, para otras disoluciones puede darse una sobreestimación de esa capa de modo que prácticamente todo el volumen de muestra formará parte de ella, por lo que habría que asumir condiciones adicionales al modelo.

Modelo VI y VII

El modelo VI surgió en 1998 como mejora del modelo anterior en dos sentidos [105]:

- Ampliar el rango de afinidades de las moléculas húmicas por los iones metálicos introduciendo la posibilidad de formar complejos tridentados.
- Mejorar la explicación de las interacciones con los metales, introduciendo constantes metal-molécula húmica (K_{MA} o K_{MB}) en vez de utilizar las constantes de intercambio metal-protón (K_{MHA} o K_{MHB}) del modelo V. Para ello en este nuevo

modelo la reacción de interacción del metal con la sustancia húmica es descrita por la ecuación I.13.



De forma análoga al modelo anterior las constantes de equilibrio metal-sustancia húmica para la formación de complejos monodentados se definen como [105]:

$$\text{Para } i = \text{posiciones } 1 - 4 \quad \log K(i) = \log K_{\text{MA}} + \frac{(2i-5)}{6} \cdot \Delta LK_{\text{A1}} \quad (\text{I.14})$$

$$\text{Para } i = \text{posiciones } 5 - 8 \quad \log K(i) = \log K_{\text{MB}} + \frac{(2i-13)}{6} \cdot \Delta LK_{\text{B1}} \quad (\text{I.15})$$

Los valores de $\log K(i)$ se encuentran espaciados alrededor de la media de $\log K_{\text{MA}}$, mientras que ΔLK_{A1} y ΔLK_{B1} no se corresponde con el valor de ΔpK_{A} o ΔpK_{B} , siendo constantes estimadas a través de ajustes realizados de datos experimentales.

Los complejos bidentados en este modelo tienen unas constantes de asociación dadas por las constantes de enlace de cada punto enlazado, definidos como j y k , pudiendo ambos sitios tomar valores entre 1-8.

$$\log K(j,k) = \log K(j) + \log K(k) + \chi \Delta LK_2 \quad (\text{I.16})$$

donde ΔLK_2 es un parámetro ajustable para introducir heterogeneidad a estos sitios de enlace en la fórmula de la constante de asociación con el ión metálico. Dependiendo del valor de χ podemos diferenciar tres tipos de sitios: fuertes, moderados y débiles. De este modo, χ tiene el valor de cero para los débiles que suponen un 90,1% de los sitios, 1 para los moderados que son un 9% y 2 para los fuertes suponiendo sólo un 0,9% de sitios.

En este modelo además del factor de proximidad para los sitios bidentados (f_{prB}) aparece el correspondiente para los tridentados (f_{prT}), definido como la fracción de sitios individuales que se encuentran lo bastante cerca para formar un complejo tridentado. Al igual que en el modelo anterior las posiciones de enlace que pueden formar complejos bidentados o tridentados se encuentran distribuidos de forma aleatoria en la superficie de la molécula húmica esférica. Para los ácidos fúlvicos los valores de estos factores son de 0,42 y 0,03, mientras que para los húmicos son de 0,5 y 0,065 respectivamente [105].

Muy recientemente se ha realizado una revisión del modelo generándose el modelo VII mediante una reevaluación de los parámetros utilizados por el modelo VI, debido a que encuentran un error en la codificación de las variables optimizadas. Este modelo se basa por tanto en los mismos conceptos que los anteriores modelos desarrollados por Tipping [106]. La necesidad de realizar esta reevaluación surge debido a que en el modelo VI se ajusta el parámetro ΔLK_1 a un valor de 2,8 cuando en realidad el parámetro optimizado realmente, debido al error de codificación, era el $(pK_A - \Delta LK_1)$. A pesar de ello los valores experimentales se ajustaban correctamente con el modelo. La reevaluación correcta del modelo permite eliminar ΔLK_1 al observar que su valor es próximo a cero.

Modelo NICA-Donnan

Este modelo utiliza ecuaciones matemáticas empíricas para describir los datos obtenidos de enlaces entre los metales y la materia orgánica, como la isoterma de NICA (Adsorción competitiva no ideal). Estas isotermas explican la adsorción competitiva de los iones en una superficie continua heterogénea, en este caso los ácidos húmicos, a través de una ecuación empírica local no ideal específica del componente o grupo enlazante (NICA).

En este modelo la materia orgánica se define como una fase gel, denominada fase Donnan. Además en este modelo se diferencian dos fases: la disolución y “la húmica-gel”, entre las que se distribuyen los iones metálicos según un equilibrio de Donnan [82]. Además, este modelo hace uso de la isoterma de NICA, explicada anteriormente, que se utiliza de un modo bimodal, es decir se consideran dos sitios de enlace: uno carboxílico “débil” y uno fenólico “fuerte”, cada uno con su conjunto de parámetros, pero compartiendo la misma fase Donnan.

Al igual que ocurría en el modelo V se van a producir interacciones electrostáticas con contra-iones para compensar la carga negativa de la sustancia húmica debido a la ocupación parcial de los sitios de enlace, incluida en la denominada fase Donnan. La selectividad de los iones por los sitios de enlace se asume igual para todos los iones en los casos de los ácidos húmicos y fúlvicos.

La mayor diferencia del modelo Donnan con el modelo V, VI y VII es que usa fórmulas matemáticas muy distintas a las reacciones químicas convencionales descritas por la ley de acción de masas que sí usan los otros modelos. Es por ello que los parámetros definidos por el modelo V, VI y VII son más fácilmente interpretables desde un punto de vista químico convencional.

Por otro lado, aunque ambos modelos asumen la formación de los complejos entre los metales y las sustancias húmicas a través de grupos enlazantes (fenólicos, B o carboxílicos, A) con distinta fuerza de enlace en los cuales los protones presentes compiten con los metales para enlazarse, en el modelo NICA-Donnan los metales enlazan con las sustancias húmicas de una manera monodentada, mientras que los otros modelos permiten enlaces bidentados y tridentados. Por ello el modelo NICA-Donnan no llega a ser capaz de explicar correctamente la competición entre el metal y el protón presente en el sitio enlazante, cosa que el modelo V y VI consigue explicar satisfactoriamente con la introducción de sitios multidentados [54].

Además el modelo NICA-Donnan introduce la afinidad y heterogeneidad de los sitios a través de una distribución continua que contiene dos parámetros, uno propio del metal analizado k_i y otro que describe la heterogeneidad de la sustancia húmica K_L .

A pesar de las diferencias existentes entre los modelos, a la hora de ajustar los datos obtenidos con los observados experimentalmente, Tipping encontró que ambos modelos se ajustaban bastante bien con los resultados experimentales y con coeficientes de correlación muy parecidos entre sí, para Ca, Cu y Cd [54].

Aplicación de los modelos a la especiación de aguas naturales

Debido al elevado número de parámetros y ecuaciones que definen cada modelo se han desarrollado numerosos programas informáticos basados en ellos que facilitan enormemente su aplicación a los sistemas reales. Entre los programas que se pueden encontrar para realizar los cálculos de las distintas especies formadas en disoluciones acuosas los más utilizados son los programas WHAM, CHEAQS, WinHumic V y Visual Minteq. Los dos primeros utilizan el modelo VI descrito en el apartado anterior, mientras que el tercero utiliza el modelo V y el último permite utilizar tanto el modelo NICA-Donnan, como el Stockholm Humic Model (SHM) o el Gaussian [60,107].

A la hora de realizar la aplicación de estos programas a muestras medioambientales es necesario conocer la composición de la muestra, incluyendo la concentración de COD y su naturaleza. Además es necesario suponer que las especies se encuentran en la muestra en equilibrio, ya que los cálculos con estos programas se basan en esa premisa. Por ello hay que simplificar la composición de la muestra definiendo los distintos iones presentes en ella como especies sencillas del tipo Ni^{2+} , OH^- , HCO_3^- , etc, y reducir el estudio a las especies más relevantes en el caso a tratar, es decir, a los componentes de la muestra que vayan a influir en los resultados calculados con el programa, principalmente por competición con otros metales o ligandos.

Generalmente lo más correcto para modelizar la especiación de una muestra concreta es utilizar los parámetros establecidos en el modelo por defecto e intentar realizar el mejor ajuste de los datos experimentales cambiando las concentraciones de las sustancias húmicas “activas”, entendida como porción que es capaz de enlazar con los iones. En general, el contenido total de sustancias húmicas es aproximadamente el doble del contenido de COD, ya que el contenido en carbono de las sustancias húmicas es aproximadamente el 50% en peso, por lo que la proporción activa de la materia húmica será igual o menor a dos veces la concentración de COD [54].

A continuación se presenta un breve resumen de los trabajos realizados utilizando estos programas de especiación química en equilibrio para realizar estudios de especiación en aguas naturales, los cuales utilizan el modelo V y VI y el NICA-Donnan, debido a que son los que mejor ajustan los datos experimentales obtenidos. Entre las diversas aplicaciones realizadas para entender el rol de la materia orgánica en la toxicidad y biodisponibilidad de los metales en el medio acuático, la mayoría realizan la comparación de los resultados obtenidos experimentalmente con los datos calculados con los programas químicos de especiación.

En este sentido, Chakraborty y col. utilizaron el modelo VI con el programa WHAM (The Windermere Humic Aqueous Model) para predecir las fracciones lábil y no lábil de los metales Co, Ni, Cu y Zn en efluentes de minas y compararlos con los resultados obtenidos con AdCSV-CLEM, considerando la fracción lábil como la suma de las concentraciones de los metales libres más los complejos inorgánicos [108]. Uno de los parámetros que encontraron más relevantes a la hora de hacer la modelización fue la concentración de COD “activa” seleccionada para ajustar sus resultados. Para ello, realizaron los cálculos dando varios valores a este parámetro: 40, 50, 60, 67 y 80 %, siendo el valor de 67 % el que mejor ajustaba los datos calculados con los resultados experimentales. Sin embargo, el ajuste realizado cuando la muestra del mismo efluente era diluida no se ajustaba correctamente con los datos predichos por WHAM. Este fenómeno es explicado por un cambio en la conformación de la molécula

de COD debido a la baja fuerza iónica dejando más accesibles los sitios de enlace, lo cual no era tenido en cuenta en el modelo.

Por otro lado, Mandal y col. han observado con el mismo programa (WHAM) el efecto de competición de los iones Ca(II) y Mg(II) al estudiar las propiedades enlazantes de los ácidos fúlvicos con Ni(II) [109]. Estos autores afirman que al aumentar la concentración de estos iones en la muestra se forma más cantidad de complejos débiles con níquel aumentando con ello la toxicidad producida por este metal en disolución. Éste hecho lo explican por la capacidad que tienen estos iones Ca y Mg de enlazarse con más sitios, ya que pueden encontrarse en la doble capa de difusión y enlazados a sitios monodentados, mientras que las predicciones con WHAM muestran que para el Ni(II) los enlaces con la materia orgánica ocurren casi exclusivamente con los sitios bidentados.

También mediante el programa WHAM, Doig y col. detectaron al aplicar el modelo VI que a concentraciones en las que el níquel muestra toxicidad aguda para el organismo de estudio ($[\text{Ni}]_{\text{total}} = 5 \text{ ppm}$) las concentraciones de COD típicas de aguas superficiales ($[\text{COD}] = 10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) no afectan a la especiación del níquel, no encontrando diferencias estadísticamente significativas entre los experimentos con COD y en ausencia de COD. Sin embargo, para concentraciones menores de níquel ($[\text{Ni}]_{\text{total}} = 0,2 \text{ a } 0,5 \text{ ppb}$) la especiación sufre un cambio disminuyendo la concentración de la especie níquel libre al aumentar la concentración de COD [103]. Además, la fracción correspondiente a los ácidos húmicos (HA) complejaba más al Ni(II) que la correspondiente fracción de ácidos fúlvicos (FA) para una relación dada de Ni:COD. De hecho, este fenómeno ha sido observado anteriormente en varios estudios para el níquel y el cobre [110-112].

Como ejemplo de la aplicación del modelo NICA-Donnan para realizar la modelización de las especies de níquel en aguas naturales se encuentra el trabajo realizado por Worms y col. [87]. Estos autores compararon los resultados obtenidos con el programa Visual Minteq con las concentraciones de Ni^{2+} determinadas mediante

una resina de intercambio iónico en aguas que contenían distintas concentraciones de varios ligandos orgánicos (citrato, diglicolato, sulfoxina, oxina, dietilditiocarbamato y sustancias húmicas). Ambos resultados presentaban una buena correlación para los complejos formados con las sustancias húmicas, sin embargo para los complejos hidrofóbicos neutros formados, como el $\text{Ni}(\text{DDC})_2^0$, se producía una sobreestimación de la especie Ni^{2+} , ya que eran retenidos por la resina pudiendo considerarse lábiles.

Finalmente, Romero y Jönsson realizaron la modelización de las especies presentes en muestras reales de aguas naturales con el programa Visual Minteq para realizar la especiación en ausencia de ligandos orgánicos y con el WinHumic V y CHEAQS para estudiar el efecto en la especiación de cobre de la presencia de distintos ligandos orgánicos, como EDTA, ácido ftálico y ácidos húmicos [113]. Los datos calculados los compararon con las concentraciones del metal libre obtenidas utilizando un sistema de membranas líquidas, observando una buena correlación entre ambos valores. Por último, realizaron la aplicación del método desarrollado a la determinación del metal libre a varias muestras reales de aguas naturales con buenos resultados.

I.IV. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA ESPECIACIÓN DE METALES EN AGUAS NATURALES

En general, el análisis de metales traza en aguas naturales presenta importantes dificultades debido principalmente a la baja concentración a la que aparecen dichos elementos y a las interferencias producidas por la alta salinidad y complejidad de la matriz, especialmente en agua de mar. Para el análisis de contenidos totales estas dificultades se salvan mediante la realización de una etapa previa de preconcentración/separación que permita por un lado aislar el analito de interés de la matriz de la muestra y por otro aumentar su concentración antes del análisis. Esto implica aumentar la manipulación de las muestras y con ello el riesgo de contaminación de las mismas. Si se tiene en cuenta las bajas concentraciones a las que aparecen estos metales la contaminación producida durante su manipulación podría

ocasionar serios errores en su cuantificación. Por ello el análisis de metales pesados en aguas naturales requiere en general de la aplicación de técnicas de ultralimpieza, tanto en el proceso de muestreo como en el necesario tratamiento de preconcentración. Estos procedimientos exigen el estricto seguimiento de una serie de protocolos sobre los que se trabajó intensamente en las décadas de los 60 y 70, y deben realizarse en instalaciones apropiadas, como Salas Blancas, lo que dificulta y encarece notablemente el proceso [114]. Dichas técnicas, junto a protocolos de preconcentración basados en la extracción con mezcla de ditiocarbamatos y la posterior medida con espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotérmica (GF-AAS), constituyen la alternativa analítica más utilizada para la cuantificación de ultratrazas de metales en aguas marinas [115-118]. Aunque estos principios son válidos para el análisis de las distintas especies metálicas en aguas naturales, en este caso es preciso que el pretratamiento de las muestras no modifique el equilibrio y composición metálica de las mismas. Por ello la técnica ideal para realizar estudios de especiación de muestras reales sería aquella que no modificara la muestra determinando directamente las especies metálicas [25]. Actualmente es posible realizar una primera clasificación general de las metodologías utilizadas en este campo en técnicas electroquímicas y técnicas no electroquímicas [119], las cuales se detallan a continuación.

Técnicas electroquímicas

Entre las técnicas electroquímicas que se han utilizado ampliamente para realizar estudios de especiación destacan las técnicas voltamétricas. En general, estas técnicas se basan en que el analito presente en una disolución diluida se concentra en una película fina de mercurio (Hg) o de otro material electródico (microelectrodo) normalmente por electrodeposición. Posteriormente, la especie electroactiva se disuelve o libera del electrodo, invirtiendo la dirección del barrido de voltaje o potencial [120].

En general, en estudios de especiación metálica realizados con técnicas voltamétricas podemos diferenciar entre dos grupos [121]: las técnicas que no perturban la muestra durante el análisis o técnicas directas y las técnicas que modifican químicamente la muestra durante el análisis o técnicas indirectas.

Técnicas directas

En el primer grupo encontramos técnicas de medida directa del ión metálico en disolución. En este sentido la técnica de voltametría de redisolución anódica ha sido ampliamente utilizada para diferenciar especies lábiles y no lábiles de plomo, cobre, cadmio y zinc en muestras de agua de mar y estuáricas [49,122,123]. Para ello, esta técnica determina la fracción metálica de interés electroactiva presente en la muestra, que será la formada por las especies del metal libre junto con los complejos inorgánicos y orgánicos cuyas cinéticas de disociación sean lo suficientemente rápidas para que sean lábiles y detectados como especies electroactivas. De este modo, Andrade y col. determinan la concentración de cobre enlazada a los compuestos orgánicos fuertes, medida a través de la diferencia entre la concentración total presente en la muestra y la medida como lábil con esta técnica [49].

Por otro lado también podemos encontrar en este grupo una técnica bastante prometedora en este campo, como la Cronopotenciometría de Redisolución (SCP, stripping chronopotentiometry) o Cronopotenciometría de Redisolución de barrido de Potencial de deposición (SSCP) para determinar la especiación de metales en aguas a niveles muy bajos de concentración (nanomolar) [124,125]. En este caso tras el periodo de preconcentración, los metales depositados en la membrana del electrodo son oxidados químicamente, siendo registrada la variación del potencial producido durante este proceso de oxidación del electrodo de trabajo en función del tiempo.

Otra técnica que recientemente ha mostrado buenos resultados en la medida de iones de metales libres es la Redisolución en Ausencia de Gradiente y Equilibrio

Nernstiano (AGNES, Absence of Gradients and Nernstian Equilibrium Stripping). Al igual que las técnicas anteriores esta técnica se basa en los mismos pasos de operación, a excepción de que la redisolución se realiza cuando se llega a una situación en la que no haya un gradiente de concentración en la interfase o capa de difusión del electrodo, y se alcance un equilibrio Nernstiano [126]. La concentración del metal es proporcional a la corriente, facilitando la interpretación de los resultados. Esta técnica ha sido aplicada para determinar el grado de complejación de Zn y Cd con ácidos húmicos, midiendo la concentración del metal libre que es comparado con los resultados obtenidos con el modelo NICA-Donnan [127].

Aunque como se ha comentado, las técnicas voltamétricas son las más utilizadas para los estudios de especiación metálica en aguas naturales, los electrodos selectivos de iones permiten determinar directamente el ión libre, lo que en ocasiones resulta más útil que identificar las fracciones lábiles y no lábiles, las cuales son dependientes de la metodología utilizada. Los electrodos selectivos de iones en estado sólido fueron desarrollados en los 60 por la compañía de instrumentación Orion, para los iones Cd, Cu, Pb y Ag [128]. Esta técnica se basa en un electrodo de membrana que responde selectivamente a ciertos iones en presencia de otros, siendo la medida realizada a través de la relación cuantitativa descrita por la ecuación de Nernst. Sin embargo, estos electrodos comercializados poseen altos límites de detección, del orden de 10^{-6} - 10^{-8} M, limitando su aplicación para realizar la especiación en aguas naturales [129]. Aun así, esta técnica ha sido utilizada para realizar estudios de especiación de metales como Cu(II) o Pb(II) y para la validación de otras técnicas utilizadas para realizar estudios de especiación [130-133] así como en el campo de la ecotoxicología [134].

Técnicas indirectas

En este segundo grupo se encuentran las técnicas de intercambio por competición de ligando (CLEM, Competing Ligand Exchange method) desarrolladas en los últimos 20 años [135]. En este caso la muestra es modificada por la adición de un ligando sintético que va a competir con el ligando naturalmente presente en la muestra para formar complejos bien establecidos con el metal a determinar, pudiendo ser de tres tipos [136]:

- Complejos solubles voltaméricamente lábiles: Como por ejemplo el complejo formado entre el Cd(II) y el ligando etilendiamina (EN) [137]. Al ser este complejo lábil, cuando se añade a la muestra un exceso del ligando EN comparado con los ligandos orgánicos débiles presentes naturalmente en la muestra, se llega al equilibrio de intercambio de ligando, siendo los contribuyentes a la señal medida en la muestra los iones Cd^{2+} , los complejos inorgánicos de cadmio y los complejos orgánicos Cd-EN, siendo la suma de todas estas especies la fracción lábil de la muestra. A partir de los balances de masas y la constante de formación del complejo Cd-EN es posible estimar la proporción de las distintas especies.

- Complejos solubles voltaméricamente inertes. Como ejemplo puede citarse el formado entre el Zn(II) y el ligando EDTA [138]. Los complejos formados entre el Zn y el ligando EDTA son no lábiles, aunque menos fuertes que otros presentes en la muestra (L1), por lo que al ser añadido en la muestra competirá con los ligandos inorgánicos y orgánicos lábiles por enlazar con el Zn, mientras que los complejos no lábiles no intercambiarán los ligandos con el EDTA añadido. Por tanto la concentración del complejo Zn-EDTA se determinará por diferencia entre el pico de corriente en la muestra original y el producido después de equilibrar la muestra con el ligando EDTA añadido. A partir de la concentración de complejos Zn-EDTA se determinan las concentraciones de las especies de Zn^{2+} , complejos orgánicos lábiles y complejos inorgánicos.

▪ Complejos adsorbidos en el electrodo, como el de Ni(II) con dimetilglioxima (DMG) utilizado para medir el níquel mediante la técnica de voltametría de redisolución catódica adsortiva (AdCSV) [139]. Esta técnica se utiliza para determinar la concentración de níquel formando complejos fuertes con ligandos naturales. Para ello, el ligando DMG es añadido a la muestra como ligando competitivo formando el complejo $\text{Ni}(\text{DMG})_2$ que es adsorbido en la superficie del electrodo de mercurio y cuantificado por la medida de la corriente producida cuando el complejo es reducido. Esta medida corresponderá a la fracción lábil de la muestra, como Ni^{2+} , complejos inorgánicos y orgánicos débiles. Como en los casos anteriores a partir de la formación del complejo se estiman las proporciones de las distintas especies.

Entre estas técnicas se encuentra la de redisolución catódica con competición de ligando (CLE-AdCSV) muy utilizada para determinar las distintas fracciones de metales traza en aguas naturales. Esta técnica permite diferenciar entre la cantidad total y la fracción lábil del metal, realizando un tratamiento previo de la muestra por oxidación con radiación UV y posterior acidificación para determinar totales y sin pretratamiento para la fracción lábil [140]. Martino y col. realizaron la especiación de níquel en muestras estuáricas (Mersey, UK) con esta metodología, definiendo la fracción lábil analizada como la concentración de níquel que es capaz de formar complejos con la cantidad de DMG añadida a la muestra para su análisis. Por otro lado la cantidad total de níquel es determinada realizando una digestión UV previa a la muestra acidificada y filtrada para su análisis con CLEM-AdCSV [53]. Con esta misma técnica, Turner y col. desarrollaron un modelo utilizando dimetilglioxima como ligando competitivo para determinar las fracciones lábiles y no lábiles de níquel en muestras estuáricas ricas en materia orgánica [140]. Para ello utilizan la técnica desarrollada por Pihlar y col. en 1981 para determinar capacidades de complejación y constantes de estabilidad condicionales para los complejos orgánicos con níquel en agua de mar, obteniendo que esta fracción suponía del 15% al 60% del total de níquel presente en la muestra analizada [141].

Finalmente, Chakraborty y col. utilizaron esta misma metodología para realizar la especiación de Co, Ni, Cu y Zn en efluentes de minas. Las cantidades totales las analizaron con ICP-MS e ICP-OES y utilizaron la AdCSV para realizar la distinción de las distintas fracciones presentes en las muestras. Para ello, utilizaron distintos ligandos sintéticos, DMG para Ni(II) y Co(II), 8-hydroxiquinolina (8-HQ) para Cu(II) y amonio 1-pirrolidinditiocarbamato (APDC) para Zn(II), siendo capaces de determinar la fracción lábil del metal además de la cinética de disociación de los complejos orgánicos formados [108].

Técnicas no electroquímicas

A pesar de las ventajas que muestran las técnicas electroquímicas presentan igualmente inconvenientes, y sólo han podido aplicarse a la determinación de unos pocos metales, especialmente Cu, Cd, Zn, Pb, Ni y Co, por lo que se han buscado otras alternativas. Entre las técnicas no electroquímicas más empleadas para realizar la determinación de metales en aguas naturales se encuentran, entre otras, las técnicas basadas en el uso de plasma acoplado inductivamente como ICP-OES o ICP-MS. Sin embargo estas técnicas no permiten un análisis directo, debido a las bajas concentraciones que presentan estos elementos en las aguas naturales y a las interferencias producidas por las matrices de estas muestras. Es por ello que es necesaria la aplicación de una etapa previa de separación y/o preconcentración de los metales a analizar en la muestra. Entre las distintas metodologías utilizadas para realizar esta etapa previa y diferenciar entre las distintas fracciones de metales en aguas naturales se encuentran la extracción en fase sólida, como las resinas de intercambio iónico [87,142] y la extracción líquido-líquido, aunque en este último caso se puede recurrir a una configuración de membranas líquidas, las cuales permiten realizar la extracción y reextracción de forma simultánea [143,144].

La extracción líquido-líquido es una de las técnicas de separación más importantes en los laboratorios medioambientales, clínicos e industriales. Como es bien sabido, esta metodología se basa en la extracción de un soluto desde una fase acuosa a otra orgánica, siendo ambas inmiscibles entre sí. Este reparto entre ambas disoluciones va a depender de la constante de equilibrio para el reparto del soluto entre ambas fases. Generalmente cuando se aplica esta metodología a la separación de metales en muestras acuosas se realiza un proceso de reextracción con una disolución acuosa ácida que posteriormente se determina entre otras técnicas por espectrometría de absorción atómica (AAS). Este sistema químico presenta una gran versatilidad debido a la facilidad de modificar tanto agente extractante como disolvente orgánico, mientras que su principal inconveniente se encuentra en la complejidad para trabajar en continuo, con vistas a abordar estrategias de automatización. Otro inconveniente que presenta esta metodología es su alto consumo de disolventes orgánicos, como es recogido en los protocolos de preparación de muestras SW-846, que es un resumen de métodos analíticos y de muestreo evaluados y aprobados por el cumplimiento de las regulaciones de la Ley de Recuperación y Conservación de Recursos (RCRA) de la EPA (US Environmental Protection Agency) [145]. Es por ello que las membranas líquidas presentan una alternativa cada vez más utilizada para sustituir a la clásica extracción líquido-líquido, gracias a que sus múltiples configuraciones permiten desarrollar sistemas que utilicen menor volumen de disolventes orgánicos que se ajusten más a las líneas de la “Química Verde” (Green Chemistry). Aunque estos sistemas se desarrollan en detalle en un apartado posterior, hay que señalar que han sido bastante utilizadas para realizar trabajos de especiación en aguas naturales, aunque la mayoría de ellos se encuentran centrados en la determinación de las fracciones lábiles y no-lábiles de cobre y en menor medida de plomo y cadmio [144,146,147]. Estos sistemas de separación y/o preconcentración ofrecen grandes ventajas frente a la metodología de extracción líquido-líquido, como es la reducción de la contaminación de la muestra al realizarse los procesos de extracción y reextracción en un solo paso,

además de la mejora de los factores de preconcentración, lo que la hace una metodología bastante interesante para su aplicación a muestras acuosas medioambientales.

Otras técnicas de separación ampliamente usadas en especiación en aguas naturales son aquellas que utilizan el intercambio iónico [87,103,142]. Esta técnica se basa en el intercambio de iones presentes en una matriz sólida (resina), contenida habitualmente en una columna, por los iones de interés presentes en la muestra al hacer pasar la misma a través de la resina. Una vez que el ión de interés se encuentra retenido en la resina se hace pasar a través de ella una disolución que permite su elución para su análisis por ICP-OES, ICP-MS u otra técnica instrumental.

La especiación conseguida mediante esta metodología suele ser de tipo operacional, ya que dependiendo de la resina utilizada es posible retener distintas fracciones más o menos lábiles del metal, ya que como Chakrabarti y col. observaron, la fracción de metal complejada afecta a la capacidad extractante/quelatante de la resina [148]. Adicionalmente es posible la determinación de los contenidos totales mediante un tratamiento previo de acidificación y fotólisis UV de la muestra para destruir los complejos del metal. En este sentido, Point y col. desarrollan una metodología para diferenciar los contenidos totales y la fracción lábil de distintos metales mediante una resina de intercambio catiónico acoplada a un ICP-MS [149]. Para la determinación de los contenidos totales desarrollan un sistema in situ automatizado con previa fotólisis UV y preconcentración en la resina. En este caso se considera como fracción cinéticamente lábil aquella que es retenida en la resina al pasar la muestra sin tratar y que la constituyen los iones libres y los complejos de metal débiles.

El uso de esta metodología es también habitual para la determinación del metal libre, como por ejemplo los trabajos realizados por Worms y col. y Doig y col. para la determinación de Ni^{2+} en aguas naturales [87,103]. Estos autores observaron el mismo efecto de reducción de la capacidad de quelación de la resina con el aumento de COD

en la muestra y por tanto de la fracción de metal complejado con la materia orgánica que encontró Chakrabarti para los metales Cd, Cu y Pb en muestras de río y nieve [148]. De este modo, consiguieron diferenciar entre la especie libre Ni^{2+} y la fracción de níquel que se encuentra formando complejos con compuestos orgánicos estables, incluso en presencia de sustancias húmicas.

Sin embargo, Worms detectó que los complejos hidrofóbicos neutros presentes en la muestra pueden ser retenidos por la resina junto con el metal libre, hecho que también fue observado por Sweileh para el cobre [150], lo cual confirma la dependencia de este tipo de fraccionamiento de la resina utilizada y de las condiciones químicas del método.

En general, las técnicas convencionales de extracción en fase sólida mejoran varios inconvenientes encontrados en las técnicas de extracción líquido-líquido. En este sentido consiguen reducir los residuos producidos durante el proceso y como consecuencia generan menor contaminación ambiental, reducen los tiempos de extracción y manipulación reduciendo los posibles riesgos de contaminación de la muestra, evitan la formación de emulsiones que dificultan la separación de las fases y mejoran los factores de preconcentración [151]. Sin embargo las nuevas técnicas desarrolladas en los últimos años de microextracción han mostrado mejores factores de preconcentración, mejor reproducibilidad y disminución de los volúmenes de disolventes utilizados [152,153]. Entre estas técnicas se han desarrollado los métodos de microextracción utilizando adsorbentes sólidos o líquidos como la microextracción en fase sólida (SPME) y la microextracción en fase líquida (LLME), basados en los mismos principios químicos que la extracción en fase sólida (SPE) o extracción líquido-líquido (LLE), respectivamente [154,155]. Estos métodos reducen notablemente los volúmenes de disolventes orgánicos reduciendo por tanto los residuos tóxicos producidos y su impacto medioambiental. Su principal interés en estudios de especiación se debe a que la alta relación de volúmenes entre la muestra y la disolución donde los metales son concentrados permite unos altos factores de preconcentración

sin que exista prácticamente un cambio en la concentración del metal inicial de la muestra, y por tanto en la especiación del mismo, durante la extracción. Aunque su aplicación aún no se encuentra muy extendida para estos estudios de especiación, el interés actual por desarrollar tecnologías más limpias está aumentando los estudios realizados en este sentido [156-158].

Una última técnica de separación que recientemente ha adquirido una gran repercusión en el estudio del fraccionamiento de metales en aguas naturales es la difusión por gradiente en capa delgada o DGT (Diffusive gradient in thin film). Desarrollada a mitad de los años 90 por Davison y Zhang [159,160], este sistema se basa en el transporte mediante difusión molecular de la fracción lábil a través de una capa de gel que se encuentra entre la muestra y una capa de resina de intercambio iónico. Como fracción lábil se entienden las especies libre, inorgánicas y algunas orgánicas del metal. Dicha difusión de las especies depende del tamaño de poro y del tipo de gel y resina seleccionados para el análisis. Posteriormente el metal retenido es eluido con ácido nítrico de la resina y medido con técnicas de análisis convencionales como el ICP-MS. El sistema permite diferenciar entre las especies lábiles, tanto inorgánicas como orgánicas, optimizando el tamaño de poro utilizado en la capa de gel, ya que las especies orgánicas formadas por las sustancias húmicas difundían más lentamente y podían por tanto cuantificarlas por separado [161].

Es preciso señalar que una ventaja adicional que ofrecen la mayoría de las técnicas mencionadas, tanto electroquímicas como no electroquímicas acompañadas de una previa separación, es que permiten realizar estudios cinéticos, aportando información sobre las constantes de formación de los complejos presentes en aguas naturales. En este sentido, las constantes de formación de más interés son las de los complejos formados con la materia orgánica, debido a que representan una herramienta muy útil para el mejor entendimiento del papel que juegan estas sustancias en la movilidad y biodisponibilidad de los metales en los ecosistemas acuáticos. El

inconveniente es la gran heterogeneidad de la naturaleza de dichas sustancias en las aguas naturales, traduciéndose en la aparición de una gran amplitud de valores para dichas constantes. A esta dificultad se une la necesidad de definir la “ventana analítica” del método en cada caso, la cual se corresponde con el rango de valores de una determinada propiedad del compuesto o elemento a determinar (como por ejemplo reactividad para la complejación, absorción ultravioleta, etc.) al que la técnica analítica en cuestión es sensible y que va a condicionar en gran medida los resultados obtenidos [62]. Por ello, es preciso definir claramente la técnica utilizada para el cálculo así como las condiciones bajo las que se ha llevado a cabo el análisis. No obstante una gran parte de los estudios realizados señalan unas constantes de formación para los complejos de níquel con fúlvicos (Ni-AF) y húmicos (Ni-AH) de $10^{4,3}$ - $10^{6,9}$ M^{-1} y $10^{6,0}$ - $10^{6,5}$ M^{-1} respectivamente, utilizando un amplio rango de condiciones de trabajo y técnicas diferentes como las metodologías de IET o CLEM-AdCSV [87,89]. Para otros metales como el cobre, se han obtenidos constantes de formación para los complejos formados con húmicos y fúlvicos de $9,2 \cdot 10^5$ M^{-1} y $4,7 \cdot 10^5$ M^{-1} a pH 7 utilizando la técnica de voltametría de redisolución anódica (ASV) [110]. Otro trabajo realizado con esta técnica ha determinado que las constantes de formación de los complejos para el plomo son de $0,78 \cdot 10^6$ M^{-1} y $0,15 \cdot 10^6$ M^{-1} , para los húmicos y fúlvicos respectivamente, para un valor de pH de 4,5 [162]. Por último, Van Ginneken y col. encontraron valores de las constantes de formación de cadmio con dos tipos de ácidos húmicos comerciales de $10^{6,59}$ M^{-1} y de $10^{6,52}$ M^{-1} con un modelo de enlace unidentado y de $10^{6,94}$ para L1 y $10^{5,85}$ para L2 con un modelo bidentado, utilizando la metodología de competición de ligando seguida de una extracción líquido-líquido [143]. De estos resultados obtenidos por varios autores con tecnologías diferentes se desprende que en general los ácidos húmicos forman complejos más estables con los iones metálicos tenidos en cuenta que los ácidos fúlvicos. Este hecho ha sido además observado por Guthrie y col. en su trabajo realizado con dos técnicas diferentes: IET y AdCSV [84]. Como se comentó anteriormente este hecho lo explican por los grupos funcionales presentes en la

molécula de los ácidos húmicos que pueden formar complejos mucho más fuertes con el metal.

I.V. METODOLOGÍAS DE MEMBRANAS LÍQUIDAS

Como se ha comentado anteriormente, las membranas líquidas ofrecen una alternativa como sistema de separación y preconcentración a los sistemas clásicos de extracción líquido-líquido para el análisis de metales traza en aguas naturales, tanto de contenidos totales como para su especiación. Por un lado, permiten realizar la extracción y reextracción de especies de forma simultánea reduciendo la contaminación de la muestra. Por otro, permiten realizar trabajos en continuo con vistas a automatizar el sistema.

Una membrana líquida (ML) es, esencialmente, una barrera líquida que separa dos disoluciones inmiscibles con ella y a través de la cual se realiza un transporte de especies químicas. La disolución donde se encuentra inicialmente la especie que se quiere transportar se denomina disolución cargada, y la disolución de destino se denomina disolución receptora. El transporte tiene lugar, como se ha mencionado anteriormente, mediante la simultaneidad de los procesos de extracción y reextracción. Es decir, nos encontramos ante un proceso cinético, en el cual, a diferencia de los procesos de extracción líquido-líquido, no llega a alcanzarse el equilibrio entre las distintas especies que intervienen en el proceso [163,164].

Mecanismos de transporte

Los mecanismos de transporte utilizados en esta metodología se pueden diferenciar básicamente en aquellos mecanismos basados en la solubilidad del soluto en la membrana (permeación) y los que utilizan un agente extractante para realizar el transporte (transporte asistido). El primero (figura I.4.a), denominado transporte simple, tiene lugar cuando el soluto es soluble en la membrana líquida siendo

transportado a través de ella sin producirse ninguna reacción química. De este modo, el soluto se encontrará en la misma forma química en las tres fases.

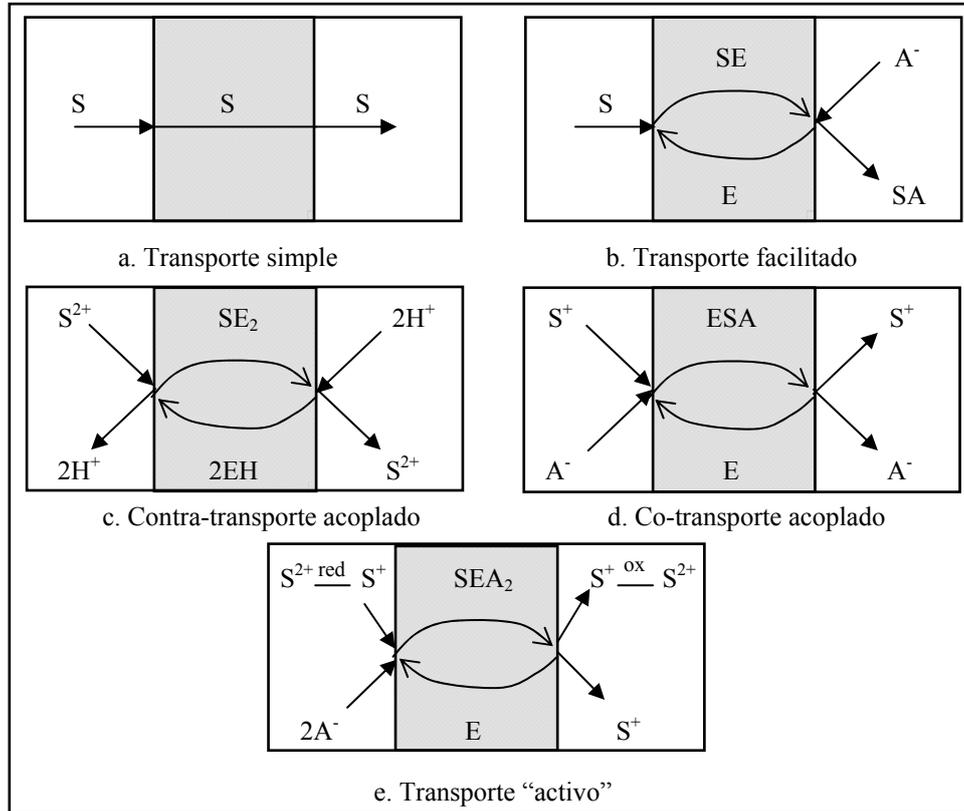


Figura I.4. Mecanismos de transporte de un soluto en sistemas de membranas líquidas □ disoluciones acuosas ■ membrana [165].

En el caso del transporte asistido, que aparece en la figura I.4.b, el soluto interacciona con el reactivo extractante, presente en la fase orgánica, al entrar en contacto con la interfase cargada-orgánica, formando un complejo que difunde a través de la membrana hasta llegar a la interfase membrana-receptora, donde el complejo se disocia permitiendo que el soluto pase a la disolución receptora. Sin embargo existen dos variaciones del transporte asistido o facilitado, la primera es el que aparece en la

figura I.4.c, en la que el transporte del metal se favorece por un contratransporte de iones en sentido opuesto a éste, es decir, pasando de la disolución receptora a la cargada. En este caso, al producirse la disociación del complejo en la interfase membrana-receptora el extractante es regenerado con estos contra-iones difundiendo en sentido contrario hasta la interfase cargada-membrana, donde vuelve a reaccionar con el ión metálico.

La segunda forma de transporte facilitado sería el realizado con cotransporte acoplado, que aparece en la figura I.4.d, en el que un anión presente en la disolución cargada es co-transportado junto al soluto hacia la disolución receptora.

Por último se encuentra el mecanismo de transporte denominado “activo” que aparece en la figura I.4.e, cuya fuerza impulsora es una reacción de oxidación-reducción, reacción catalítica o conversiones bioquímicas en la interfase de la membrana. Este tipo de transporte es altamente selectivo, debido a que la única especie extraída va a ser la que sufra la reacción química en la interfase de la membrana. Como ejemplos, es posible citar el transporte de cobre por tioéteres [166].

Generalmente, el mecanismo de transporte facilitado con el uso de agentes transportadores en las membranas líquidas presenta varias ventajas sobre el de permeación, entre las que destacan [163]:

- Es posible alcanzar mayores flujos de materia.
- Es posible realizar separaciones muy selectivas. La naturaleza selectiva del transportador permite obtener mejores separaciones que aquellas basadas sólo en la solubilidad y difusión de la especie química de interés.
- Los iones pueden ser concentrados, ya que el transporte acoplado permite el paso de iones en contra de su gradiente de concentración. Este es el caso del transporte de metales de transición producido por extractantes como el DEHPA [165].

De hecho, Schlosser y col. desarrollaron un sistema de membrana líquida en el que el fenol era extraído por permeación simple en una membrana de n-alcanos. Sin

embargo, observaron que al añadir el agente extractante sulfuro de tributilfosfina (TIPS) en la disolución de n-alcanos obtenían un coeficiente de distribución para los fenoles 13,5 veces mayor que cuando usaban sólo n-alcanos [167]. Así, mediante la correcta selección del agente extractante, las MLs pueden ser utilizadas para la separación y/o preconcentración de numerosos metales presentes en diferentes tipos de muestras. En este caso, el transporte tiene lugar en tres etapas:

1. Reacción metal-extractante en la interfase de las disoluciones cargada-orgánica.
2. Difusión del complejo metal-extractante en la disolución orgánica
3. Reacción de disociación del complejo metal-extractante en la interfase orgánica-receptora.

Por todo ello, la elección del agente extractante será de suma importancia en este tipo de transporte. De este modo, las principales características a tener en cuenta a la hora de realizar la selección del extractante a utilizar en la membrana líquida son [165]:

1. Alta selectividad por las especies a extraer.
2. Alta capacidad de complejar y extraer el soluto en la interfase cargada-membrana líquida, es decir, alto coeficiente de distribución o constante de partición.
3. Rápida cinética de formación del complejo con el soluto en la interfase cargada-membrana y de disociación del mismo en la interfase membrana-receptora.
4. Rápida cinética de difusión del complejo soluto-agente extractante a través de la membrana líquida.
5. Buena estabilidad en la membrana líquida y baja solubilidad en las fases acuosas.
6. Que no existen reacciones paralelas del extractante con otras especies presentes en el sistema ni reacciones de degradación del mismo

7. Ser fácilmente regenerable durante el proceso.
8. Buenas características físicas, tales como viscosidad, densidad y tensión superficial.
9. Baja toxicidad y corrosividad.
10. Bajo coste.

Además, estos mecanismos de transporte pueden ser mejorados utilizando reactivos en la disolución receptora que reaccionen con el soluto mejorando su solubilidad en dicha disolución [168]. En este sentido, Pathasarathy y Buffle estudiaron el efecto de varios ligandos en la disolución receptora en la extracción de cobre con el extractante 22DD, obteniendo los mejores resultados cuando utilizaban el ligando pirofosfato de sodio, debido a que analizando la disolución cargada observaron que el ión pirofosfato no era transportado a través de la membrana desde la disolución receptora, y si lo eran el resto de los ligandos estudiados [169].

Configuraciones de membranas líquidas

Por lo que respecta a su configuración, existen principalmente tres alternativas para la aplicación de las membranas líquidas: Membranas líquidas de volumen (MLV), membranas líquidas soportadas (MLS) y membranas líquidas de emulsión (MLE) [163,164,170]. Mientras que la última de ellas encuentra su principal aplicación en el tratamiento de grandes volúmenes de muestra (por ejemplo en hidrometalurgia), las dos primeras son aplicadas para estudios a escala de laboratorio y para pequeños volúmenes de muestra.

Membranas líquidas de volumen

Las membranas líquidas de volumen utilizan, en comparación con otras configuraciones, un volumen relativamente alto de fase orgánica (del orden de los mililitros), y por su facilidad de manejo y accesibilidad a las tres disoluciones

empleadas, son ideales para los estudios de optimización de las variables que controlan los sistemas de transporte, como tipo de extractante y mecanismo de transporte que utiliza [163]. En este sentido, León y Guzmán han realizado el estudio cinético de dos sistemas de contra-transporte facilitado para Cu y Co utilizando celdas de agitación con transferencia de tipo Lewis [171,172]. El inconveniente que presentan, es que debido al volumen de la membrana la velocidad de transporte de la especie de interés es relativamente baja. Se han utilizado distintos tipos de celdas para construir este tipo de membranas, alguna de las cuales se muestran en la figura I.5, existiendo alternativas para disolventes orgánicos de mayor densidad que el agua (I y II) o de menor (III).

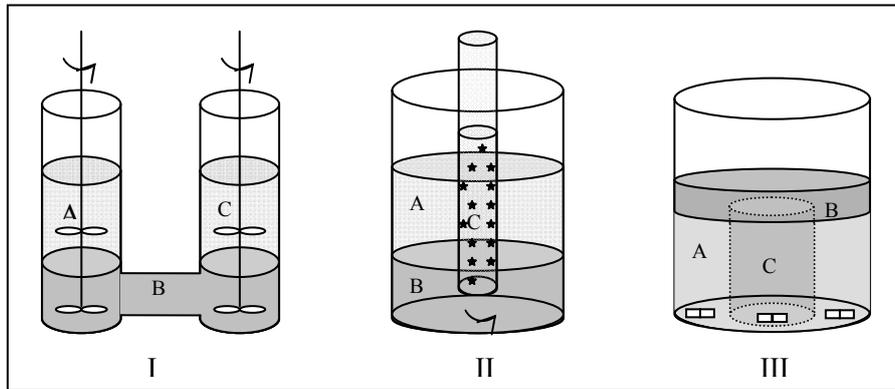


Figura I.5. Distintos tipos de celdas utilizadas para membranas líquidas de volumen. A: disolución cargada, B: membrana líquida, C: disolución receptora.

Membranas líquidas soportadas

Al contrario de las membranas líquidas de volumen, las membranas líquidas soportadas utilizan un volumen más pequeño de fase orgánica, en este caso impregnando el interior de los poros de un soporte polimérico hidrofóbico poroso (de polipropileno (PP) o fluoruro de polivinilideno (PVDF)) generalmente de forma plana o tubular (capilares de fibra hueca). Las principales configuraciones de este tipo de membranas se encuentra representadas en la figura I.6 donde se observa que la

membrana se encuentra en los poros del soporte polimérico actuando de barrera semipermeable entre las disoluciones acuosas. Como puede observarse, es posible diferenciar dos configuraciones principales: una laminar o plana, en la que el soporte donde se encuentra la membrana tiene forma laminar y se coloca entre las disoluciones acuosas contenidas en distintos recipientes, y una configuración de capilares de fibra hueca, en la que el soporte es un capilar que contiene una de las disoluciones acuosas en su interior, generalmente la receptora y que es sumergido en la otra disolución acuosa, generalmente la cargada [165]. Ambas configuraciones se pueden utilizar con flujo continuo de una o de las dos disoluciones acuosas, que serían recirculadas continuamente durante la extracción.

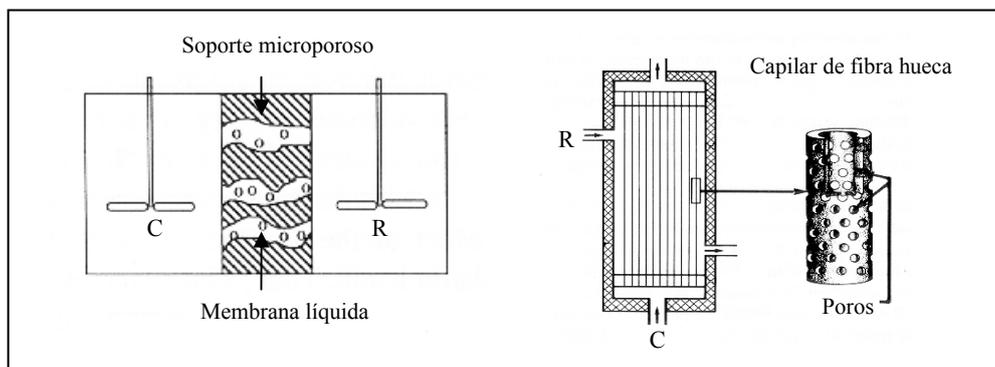


Figura I.6. Esquema de una membrana líquida soportada con geometría laminar y capilar de fibra hueca. (C) Disolución cargada; (R) Disolución receptora.

Este tipo de configuración presenta como ventajas principales su mayor velocidad de transporte, debido al uso de una membrana líquida muy fina, y la posibilidad de recirculación de las disoluciones acuosas, lo que permite la utilización de volúmenes de muestras mucho mayores que los volúmenes de disolución receptora, consiguiéndose así altos factores de preconcentración en el tratamiento de muestras reales. Sin embargo, el contacto con las fases acuosas puede causar pérdidas de la fase orgánica del interior de los poros, pudiendo llegar a perderse por completo entrando así

en contacto las dos disoluciones acuosas. Debido a ello resulta conveniente que tanto disolvente como transportador presenten alta hidrofobicidad. Otro inconveniente que presenta esta configuración radica en las bajas tasas de transporte global que se obtienen debido a su inestabilidad como consecuencia de la pérdida de la fase orgánica de los poros. No obstante, gracias a sus ventajas, las membranas líquidas soportadas son indudablemente las más utilizadas, pudiendo realizar separaciones de muy diversa naturaleza, como por ejemplo compuestos gaseosos [173], recuperaciones de metales tóxicos [174] y de compuestos orgánicos [175] o desalinización de aguas [176].

Como ejemplo, Marchese y col. han utilizado el tipo de configuración laminar para estudiar el transporte de cobre, níquel y cobalto a través de una membrana líquida formada por DEHPA disuelto en keroseno, así como para determinar la influencia que el pH de las disoluciones acuosas ejercía sobre dicho transporte, consiguiendo una recuperación mayor del 90% para estos metales [177].

En los últimos años está aumentando el interés en el impacto medioambiental producido por las metodologías analíticas. Es por ello, que se están desarrollando nuevas metodologías de análisis que se ajusten más a los principios que establece la “Química Verde”. En este sentido, los sistemas de microextracción en fase líquida (LLME) que se basan en la utilización de membranas soportadas con capilares de fibra hueca son una alternativa adecuada que reduce en gran medida la cantidad de disolvente utilizado y como consecuencia el volumen de residuos tóxicos generados durante el análisis [178,179]. De hecho, forman parte de las denominadas técnicas “solventless” debido al reducido volumen de disolvente utilizado.

Gracias a su conformación estas membranas líquidas presentan además varias ventajas frente a las membranas de volumen, como:

- Posibilidad de automatizar el sistema.
- Posibilidad de usar disolventes y agentes extractantes caros debido al pequeño volumen necesario de fase orgánica.

- Menores cantidades de residuos producidos durante el proceso, por lo que se reduce la contaminación ambiental.
- Disminución de la contaminación de la muestra durante el montaje.
- Disminución del tiempo de funcionamiento del sistema.
- Posibilidad de conseguir mayores factores de separación.
- Posibilidad de realizar el análisis con flujo continuo o discreto, entendiéndose por continuo cuando la disolución receptora es bombeada durante el proceso de extracción.
- Menor cantidad de muestra necesaria para realizar el análisis, lo que es bastante útil cuando se analizan muestras caras o se dispone de poco volumen de muestra.
- Menor coste y fácil manejo.

Membranas líquidas de emulsión

Este tipo de membranas se prepara dispersando una fase líquida receptora en un líquido inmisible, que constituye la membrana, para formar una emulsión (figura I.7).

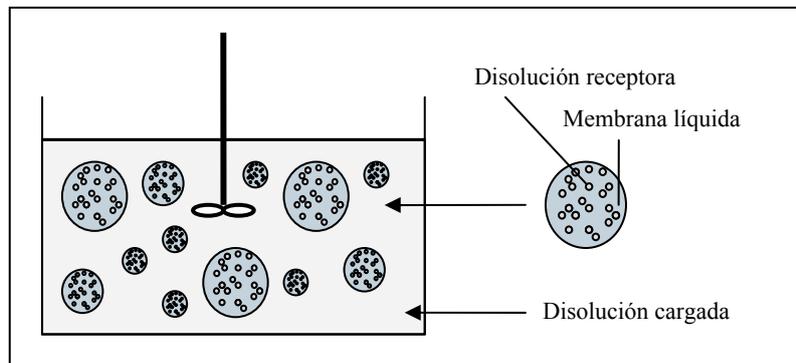


Figura I.7. Esquema de membrana líquida de emulsión.

La ventaja de esta configuración consiste en la gran superficie que presentan y su escaso grosor, lo que implica tasas de transporte más altas [180]. Al mismo tiempo la elevada relación de volúmenes entre las fases acuosas permite obtener un alto grado de preconcentración. Su principal inconveniente es la necesidad de romper la emulsión para recuperar la fase receptora, una vez que se ha completado el transporte, debido a su estabilidad [163]. A pesar de ello, esta configuración ha sido utilizada ampliamente para realizar la separación de metales en multitud de muestras acuosas [181-183].

Aplicaciones a la especiación de metales traza en aguas naturales

En el campo de la química analítica se han desarrollado multitud de aplicaciones de las membranas líquidas, especialmente para la determinación de varios compuestos en los distintos compartimentos ambientales [184]. Su interés en este campo procede de la posibilidad de eliminar las complejas matrices ambientales donde se encuentra el analito de interés y de la posibilidad de realizar simultáneamente un paso de preconcentración. Es por ello, que las membranas también se han aplicado como paso previo de preconcentración y/o separación de metales traza en muestras reales donde se encuentran presentes en bajas concentraciones o la matriz de la muestra interfiere en su determinación como en agua de mar [185-189].

En cuanto al estudio de especiación de metales a través de membranas líquidas cabe destacar los trabajos realizados por Parthasarathy y col. para la especiación de cobre. En este sentido, Parthasarathy y Buffle desarrollaron un sistema de membrana soportada con geometría laminar utilizando como agente extractante un éter corona, el 22DD [190]. Estos autores determinaron la fracción libre de cobre y la influencia de la presencia de ligandos orgánicos como el Tyron (Ty) y el oxalato (OX) en el transporte de dicha especie a través de la membrana, encontrando que los complejos formados con estos ligandos neutros, como el CuOX, eran capaces de pasar parcialmente a través de la membrana debido a su carácter liposoluble mientras que los cargados

negativamente como el $\text{Cu}(\text{OX})_2^{2-}$ no podían hacerlo. Por tanto estos autores explican que este hecho conlleva un error en la estimación, mediante esta metodología, del grado de complejación del metal en las aguas naturales que contienen complejos orgánicos neutros, siendo mayor cuanto mayor sea el grado de complejación del metal. Es por ello que este efecto podría limitar la aplicación de esta metodología a estudios de especiación. En la misma línea Parthasarathy y col. realizaron un estudio similar con el mismo metal y extractante, estudiando la influencia de distintos ligandos orgánicos entre los que se encontraba los ácidos fúlvicos (AF) en un sistema de membrana soportada con geometría laminar y capilares de fibra hueca [191]. Utilizaron estos ligandos debido a que poseen grupos funcionales parecidos a los de las sustancias húmicas, además de formar complejos cargados negativamente y neutros. Al igual que el trabajo expuesto anteriormente, las especies cargadas no eran transportadas, siendo en este caso la única especie transportada el cobre libre. De este modo la técnica permitía diferenciar entre el metal libre y los complejos orgánicos estables presentes en las aguas naturales.

Otro trabajo realizado por Parthasarathy y col. sobre la especiación de cobre a través de sistemas de membrana líquida de permeación (MLPs) en presencia de distintos ligandos orgánicos que forman complejos neutros o lipofílicos mostraron que no todos los complejos lipofílicos pasan a través de la membrana [146]. En este caso su transporte dependerá de su coeficiente de partición en la membrana lipofílica, ya que el cobre extraído en presencia de estos ligandos aumentaba con el aumento del coeficiente de partición del complejo orgánico. Por último aplicaron esta metodología a diferentes muestras de aguas naturales encontrando que la fracción medida con esta técnica, que correspondía a la fracción de iones libres más los complejos lábiles o liposolubles del metal, era siempre menor que la correspondiente a la concentración total presente en las muestras, siendo esta técnica adecuada para realizar estudios de especiación en este tipo de muestras.

También para el cobre, Romero y Jönsson utilizaron un sistema de membrana líquida soportada de configuración laminar con otro éter corona, el 1,10-dibencil-1,10-diaza-18-corona-6 para estudiar el efecto en el transporte de este metal de la presencia de ligandos orgánicos como AEDT, ácido ftálico y ácidos húmicos [113]. La concentración de la especie Cu^{2+} determinada con esta técnica en presencia de estos ligandos orgánicos la compararon con datos teóricos calculados con programas de especiación química como CHEAQS V L20.1 para los ligandos AEDT y ácido ftálico, y el WinHumic V para los ácidos húmicos, encontrando que existía una correlación lineal entre ambas concentraciones. Por último, realizaron la aplicación del método estudiado a la especiación de cobre en muestras de arroyos y lixiviados obteniendo que entre el 30 y el 50% del cobre total disuelto era extraído, siendo el resto asociado a la fracción de cobre formando complejos orgánicos que no son extraídos bajo las condiciones estudiadas.

Por último, Gunkel-Grillon y Buffle, han utilizado un sistema de membrana líquida soportada similar a los anteriores con el éter corona Kryptofix 22DD para determinar selectivamente los complejos de cobre lábiles y no lábiles, en un sistema de flujo a través de una celda de membrana líquida de permeación desarrollado para este estudio [147]. Para ello, prepararon disoluciones sintéticas con ligandos orgánicos hidrofílicos que forman complejos con Cu(II) tanto inertes, como el ácido nitriloacético, como lábiles como los ácidos tartárico o malónico. Encontraron que este sistema mostraba una selectividad suficiente para separar las fracciones mencionadas, sin embargo mostraba menor sensibilidad que los sistemas desarrollados en capilares de fibra hueca aunque eran suficientes para realizar su aplicación a aguas naturales [157]. Detectaron que una de las limitaciones para la correcta determinación de dichos complejos es el efecto de la presencia de complejos denominados semi-lábiles (lipofílicos) en el flujo a través de la celda, que se encontraba ligado a sus velocidades de disociación en la disolución.

También se han usado otros extractantes como el Lasalocid A para el estudio de la especiación de cobre en aguas marinas con un sistema de membrana soportada en presencia de ligandos orgánicos como el AEDT y los ácidos húmicos [192]. En este caso se realiza la especiación de cobre, diferenciando entre las fracciones lábiles, como aquellas capaces de formar complejos estables con el extractante para ser transportadas a través de la membrana, incluyendo las especies libre del metal, complejos inorgánicos y orgánicos cuyas velocidades de disociación sean lo suficientemente rápidas para permitir su extracción, y la fracción no lábil de cobre incluyendo los complejos orgánicos estables cuyas cinéticas de disociación son lentas para ser transportados y entre las que se encontraban los complejos formados con los ligandos AEDT y ácidos húmicos.

Los éteres corona también han sido utilizados en membranas líquidas para la especiación de otros metales como el cadmio. En este sentido, Bayen y col. estudiaron un sistema de membrana líquida con el reactivo extractante 22DD para evaluar la especiación de este metal en aguas naturales utilizando una configuración de membrana líquida soportada laminar [193]. Este método lo validaron utilizando un electrodo selectivo de iones cadmio comprobando la validez de la metodología para la determinación del cadmio libre en el rango de concentraciones de 10^{-8} a 10^{-4} M. El estudio de especiación lo realizaron a través de medidas de los flujos de Cd(II) en ausencia y presencia de distintos agentes complejantes como citrato, malonato, nitrilotriacetato y los ácidos húmicos estándar del río Suwannee. Realizando una comparación con cálculos teóricos de especiación obtenidos con el programa MinteqQA2 demostraron que en las condiciones químicas estudiadas sólo la especie Cd^{2+} era transportada a través de la membrana y las especies lábiles con los ligandos citrato o malonato no lo eran, pudiendo por tanto diferenciar entre las especies presentes en la muestra.

En el caso del Pb, Bautista-Flores y col. estudiaron el efecto producido en el transporte de este metal en un sistema de membrana líquida con capilares de fibra

hueca en presencia de los principales ligandos inorgánicos y orgánicos usando Kellex 100© como agente extractante en aguas naturales [158]. Los complejos formados con los ligandos inorgánicos fueron en su mayoría lábiles siendo transportados junto al ión libre. Por otro lado, el ligando CN^- mostró una capacidad catalizadora de la velocidad de permeación de plomo, debido a que acelera el intercambio de las moléculas de agua de la capa externa de coordinación del catión metálico por los aniones presentes en la muestra aumentando su transporte a través de la membrana incluso cuando la concentración de plomo disminuía en la disolución cargada. Por el contrario, al igual que otros autores observó que los complejos fuertes formados por el plomo con los ácidos húmicos, así como los complejos orgánicos inertes no eran transportados por la membrana.

Existen muy pocos trabajos que estudien la especiación de níquel en aguas naturales con esta metodología, siendo el trabajo de Bayen y col. prácticamente el único realizado en este campo de investigación [194]. Al igual que en los estudios comentados para Cu(II) y Cd(II) utilizaron el éter corona 22DD, con la salvedad de que añadieron a la membrana líquida el extractante DEHPA, para realizar la determinación del transporte de níquel libre a través de la membrana en presencia de distintos ligandos orgánicos, como tartrato, oxalato, glicina y ácido nitrilotriacético. En todos los casos detectaron que la única especie transportada era la del ión libre, siendo las demás (los complejos orgánicos de níquel) retenidas en la disolución cargada.

Finalmente, Bayen y col. realizaron la aplicación de las membranas líquidas a estudios de especiación de los metales Cu(II) , Cd(II) y Pb(II) en presencia de los ligandos inorgánicos mayoritarios en las aguas naturales como sulfato, carbonato y cloruros bajo las condiciones químicas en las que se pueden formar complejos neutros (más del 73% de los complejos presentes en la disolución) [195]. De los resultados obtenidos por estos investigadores en presencia y ausencia del agente extractante en la disolución orgánica se deduce que no se produce un transporte ni activo ni pasivo de las especies neutras formadas por el sulfato a través de la membrana para los tres

metales estudiados. Por el contrario, los complejos de carbonato para los tres metales y los de cloruro sólo para el Pb y Cd, sí se transportan de forma activa aunque no pasiva, ya que no se observaba el transporte en ausencia del agente extractante en la membrana líquida. En este sentido, el transporte activo de los complejos clorurados de Pb y Cd no se explica por el transporte del complejo inorgánico del metal, sino que proponen que el anión cruza la membrana junto con el extractante y el catión sodio o con el extractante protonado. Sin embargo, en el caso del transporte activo de los complejos carbonatados no consiguieron realizar ninguna hipótesis para su explicación, debido a que detectaron un transporte pasivo de CO₂ mucho mayor que el flujo del metal.

En ocasiones los estudios con membranas líquidas simulan las condiciones encontrada en las membranas biológicas y estudian cómo los diferentes complejos pueden atravesar las membranas celulares evaluando así su mayor o menor toxicidad. Este es el caso del trabajo de Slaveykova y col. enfocado a la predicción de la biodisponibilidad del Pb por el alga *Chlorella kesslerii*, midiendo los flujos de este metal a través de la membrana líquida en presencia y ausencia de diversos ligandos orgánicos como tyron y los ácidos nitrilotriacético, iminodiacético, malónico, cítrico, poliacrílico y ácidos fúlvicos [196]. Los autores señalan que los flujos calculados con la membrana eran proporcionales a la cantidad de especie de plomo libre, más que a su concentración total por lo que sólo esta fracción sería biodisponible. Sin embargo, los flujos biológicos calculados con la membrana biológica en presencia de ácidos fúlvicos era mayor que los observados con la membrana líquida de permeación estudiada pudiendo haberse producido una interacción directa entre este ligando y el microorganismo [197]. También se ha estudiado la biodisponibilidad de Cd para este mismo organismo mediante comparación de los resultados obtenidos con una membrana líquida y los flujos del metal a través de la membrana biológica [193].

En cuanto a la aplicación de las metodologías de membranas a la especiación de metales en sus diferentes estados de oxidación podemos encontrar numerosos trabajos realizados para diferenciar entre las especies de selenio, cromo y arsénico,

diferenciando entre las especies más tóxicas de estos metales, como Cr(VI) y As(III) y las especies de Cr(III) y As(V) [198-200]. A modo de ejemplo es posible comentar el trabajo realizado por Djane y col. con un sistema de membrana líquida soportada con configuración laminar en un sistema con dos celdas acopladas para realizar la separación entre las especies de Cr(III) y Cr(VI) [201]. En este sistema, en la primera celda se separaba selectivamente las especies de Cr(III), siendo principalmente $\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{OH}_2^+$, utilizando DEHPA disuelto en keroseno. Posteriormente la muestra pasaba a la segunda celda donde las diferentes especies de Cr(VI), HCrO_4^{2-} , CrO_4^{2-} y $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, eran separadas utilizando el reactivo Aliquat© en dihexileter manteniendo el pH a valores del pH fisiológico para evitar que estas especies se redujeran durante el proceso de extracción. Otro trabajo que realiza la aplicación de membranas líquidas soportadas de configuración plana para realizar la especiación de cromo en muestras de aguas naturales es el llevado a cabo por Alguacil y col. [202]. Estos autores encontraron que con este sistema el flujo de Cr(VI) a través de la membrana con el agente extractante Cyanex 923© era 29 veces mayor que el de Cr(III), permitiendo la separación entre ambas especies.

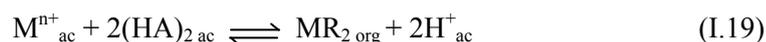
I.VI. EXTRACTANTES DE METALES EN MUESTRAS ACUOSAS

A la hora de realizar estudios con membranas líquidas uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta es la adecuada selección del agente extractante disuelto en la disolución orgánica, debido a que realizando una buena elección se puede conseguir una alta selectividad de los metales a separar y mejorar la estabilidad de la membrana líquida en el sistema.

Una clasificación general desde un punto de vista químico de los extractantes utilizados para realizar la separación y/o preconcentración de metales en muestras acuosas los divide en tres grupos, según si durante el proceso de extracción actúan como ligandos que intercambian cationes, aniones o forman especies neutras [165]

Extractantes que intercambian cationes

Este tipo de extractantes recoge algunos de los reactivos más utilizados en los estudios de metales en aguas naturales, así como en procesos de recuperación de metales de aguas residuales industriales. Puede además dividirse en dos grandes grupos, aquellos que contienen grupos funcionales tipo ácido carboxílico (-COOH) o sulfónicos (-SO₃H) llamados extractantes ácidos, como DEHPA, Cyanex 273, etc. y los extractantes de quelación que contienen grupos donadores capaces de formar complejos con iones metálicos, como hidroximas, derivados de oxinas, Kelex 100, serie LIX y Acorga. El proceso de extracción para este tipo de extractante se basa en la siguiente reacción general [203]:



donde R representa al extractante orgánico y Mⁿ⁺ al ión metálico.

Extractantes ácidos

Aunque los extractantes ácidos han sido ampliamente usados para la determinación de contenidos totales de metales en aguas naturales su uso para estudios de especiación se encuentra bastante restringido debido a que las reacciones de extracción suponen el intercambio de protones por los iones metálicos que se acumulan en la muestra modificando su pH y por tanto la especiación del metal.

Dentro de este grupo es posible encontrar una gran cantidad de reactivos disponibles comercialmente, lo que explica su popularidad para la extracción de metales en diversos tipos de muestras acuosas.

En este sentido el DEHPA ha sido utilizado en varios sistemas de extracción basados en el uso de membranas líquidas (MLs) para el análisis de Cu y Cd en agua de mar [185,186]. Sin embargo esta misma ausencia de selectividad implica la extracción

no deseada de otros cationes, como Ca y Mg, que disminuyen la eficacia de la extracción de los analitos de interés pudiendo en algunos casos minimizar este efecto usando enmascarantes químicos como el ácido cítrico [186].

Como se ha comentado de forma general, el carácter ácido de este extractante no permite su aplicación en estudios de especiación de metales debido al cambio de pH en la muestra que causa cambios en los equilibrios naturales de la misma, y las distintas especies presentes del metal son modificadas [113]. Sin embargo, Trtic-Petrovic y Jönsson han utilizado este extractante para investigar los complejos formados de cobre con los ácidos húmicos, ya que observaron que la eficiencia de la extracción disminuía con el aumento de la concentración de ácidos húmicos presente en la muestra acuosa, mostrando claramente la formación de complejos suficientemente fuertes para no ser extraídos por el DEHPA [204]. El inconveniente de este trabajo es que el pH de la disolución acuosa se ajusta en 4 muy lejos del pH habitual de las aguas naturales (6-8), por lo que no podría utilizarse para realizar la especiación completa de este metal en este tipo de muestras.

Por otro lado, se han desarrollado una serie de reactivos organofosforados cuyo grupo funcional cambia el oxígeno por azufre, por lo que se hace posible la extracción de metales a pH menores. De este modo, estos extractantes son normalmente utilizados para la extracción de contenidos totales en muestras acidificadas. Entre ellos encontramos los ácidos fosfónicos, fosfínicos y sus derivados que han sido utilizados principalmente en el campo de la metalurgia.

Dentro de este grupo de extractantes el Lasalocid A, un antibiótico perteneciente a la familia de los poliéteres policíclicos carboxílicos, ha sido bastante usado para la extracción de metales, como Cd(II), Zn(II), Pb(II), Na(I) y Ag(I) a pH de las aguas naturales (pH = 8) [205-207]. Además Ndungu y col. han realizado estudios de especiación de cobre en aguas marinas con este extractante, pudiendo diferenciar entre las fracciones lábiles [192].

Finalmente, las aroilhidrazonas, con el grupo funcional $R_2C=NNR_2$ también se encuentran en este grupo. Se trata de reactivos no comerciales que han demostrado su capacidad para complejar iones metálicos a valores de pH neutro o ligeramente básico [208]. De hecho, Podyachev y col. observaron que las bis-hidrazonas presentan una excelente selectividad hacia algunos cationes metálicos alcalinos y de transición, mientras que por el contrario las octa-hidrazonas no extraen cationes metálicos alcalinos, mostrando una excelente selectividad por los cationes metálicos de transición [209]. Teniendo en cuenta estos resultados, las hidrazonas podrían ser útiles para su aplicación en las muestras salinas evitando así la co-extracción simultánea de los iones mayoritarios presentes en la muestra. En este sentido, el agente extractante sintetizado piridina-2-acetaldehído benzoilhidrazona (APBH) ha sido usado con éxito para la extracción total de cadmio en agua de mar [187].

Para el caso del níquel es posible encontrar varios trabajos en los que se usan este tipo de extractantes. Por ejemplo, el DEHPA ha mostrado su capacidad para extraer níquel en un sistema de membranas líquidas para el análisis simultáneo de varios metales (Cu, Ni, Zn, Mn, Al, Cd y Pb) en agua de mar [210]. Igualmente otros compuestos organofosforados, como el extractante Cyanex 272© o ácido bis(2,4,4-Trimetilpentil) fosfínico, han sido utilizados para la extracción de níquel en disoluciones acuosas [211]. Por otro lado, Reddy y col. han utilizado el Cyanex 272© junto al TOPS 99©, un equivalente al ácido di-(2-etilhexil) fosfórico, y al PC 88A©, o mono-2-etilhexil éster del ácido 2-etilhexil fosfónico, para la extracción de Cd y Ni en disoluciones acuosas sulfatadas [212]. Estos autores además encontraron al realizar pruebas de sinergismo entre estos reactivos que el TOPS 99© era el que mejor resultado mostraba cuando se utilizaban como coadyudantes a los reactivos PC 88A© y Cyanex 272©. Por otro lado, Pashkov y col. utilizaron el ácido bis(2,4,4-trimetilpentil) ditiofosfínico (Cyanex 301©) para realizar la extracción de níquel en muestras acuosas sulfatadas [213].

Entre los agentes extractantes no comerciales, la APBH ha sido utilizada con éxito para la determinación de níquel en agua de mar [188], al igual que la 2-hidroxibenzoaldehído N-etiltiosemi-carbazona (2-HBET) [189].

Extractantes quelatantes

En cuanto a los agentes quelatantes, los compuestos orgánicos más usados son los formados por hidroxioximas y derivados de la 8-hidroxiquinoleína. Entre ellos, se encuentra la familia de los LIX, que son reactivos derivados de la hidroxima y quetoximas. Principalmente estos reactivos han sido utilizados en hidrometalurgia para recuperar y eliminar metales de las disoluciones de los baños ácidos [214,215]. Además estos reactivos han sido muy utilizados para extraer varios metales de disoluciones amoniacales utilizadas para obtenerlos de las reservas naturales [216]. Estos reactivos son utilizados generalmente para la extracción de concentraciones totales de metales mientras que los reactivos derivados de la 8-hidroxiquinoleína han sido utilizados para realizar estudios de especiación de metales en aguas naturales. Este hecho es debido a que son capaces de formar quelatos sin carga, los cuales pueden ser rápidamente extraídos a la disolución orgánica, además de contener grupos hidrofóbicos que reducen la solubilidad en agua del complejo [217]. Como ejemplo, Bautista-Flores y col. en su trabajo realizado con el extractante conocido como Kelex 100© (7-(4-etil-1-metiloctil)-8-hidroxiquinoleína), demostraron su potencial para realizar estudios de especiación de plomo, diferenciando entre las especies libre, lábiles y complejos inertes [158]. No obstante también se han publicado trabajos en los que se usa este reactivo para la determinación de contenidos totales como el de Farajzadeh y col., en el que utilizaron el extractante 8-hidroxiquinoleína para la extracción de cobre total en diferentes aguas naturales [218].

Finalmente, para la determinación de contenidos totales de metales en agua de mar mediante extracción líquido-líquido se ha extendido el uso de las mezclas de los

reactivos dietil-ditio-carbamato de sodio (NaDDC) y 1-pirrodil ditiocarbamato de amonio (APDC) [219,220]. Sin embargo, este método necesita una amplia manipulación de la muestra requiriendo el uso de salas blancas para disminuir la potencial contaminación de la misma durante el análisis. Además, la necesidad de ajustar el pH de la muestra a 4,5, modifica las condiciones naturales de la muestra y hace inviable su uso para estudios de especiación.

Para el caso del níquel también es posible encontrar en la bibliografía numerosos ejemplos en los que se usan este tipo de extractantes para muestras acuosas. Por ejemplo, la oxima 2-hidroxi-5-nonilacetofenona (LIX84I©) junto con el ácido 2-etilhexilfosfónico mono-2-etilhexil ester (PC88A©) se ha utilizado como acelerante de la reacción para extraer níquel de baños ácidos procedentes de tratamientos superficiales [214,215]. Sridhar y col. estudiaron la extracción de níquel y cobre con el reactivo LIX984N©, que es una mezcla 1:1 de los reactivos LIX84© y LIX 860N© (mezcla de 5-dodecilsalicilaldoxima y oxima 2-hidroxi 5-nonilacetofenona), obteniendo una extracción cuantitativa de cobre y níquel [216]. La mezcla de los reactivos dietil-ditio-carbamato de sodio (NaDDC) y 1-pirrodil ditiocarbamato de amonio (APDC) ha sido ampliamente utilizada para realizar la extracción de níquel junto con otros metales (Cd, Co, Cu, Fe, Pb, Ag y Zn) llegando a alcanzar factores de recuperación del 100% [221].

Extractantes que intercambian aniones

Los extractantes que intercambian aniones o también conocidos como extractantes básicos, son reactivos orgánicos que pueden formar fácilmente una sal en contacto con una fase acuosa ácida. Se trata de aminas primarias (RNH₂), secundarias (R₂NH) y terciarias (R₃N) o sales de amonio cuaternarias (R₄N⁺). La extracción se realiza por asociación iónica al formar un par iónico con el catión metálico [203].

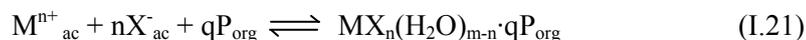


donde M representa al metal a extraer y X el anión metálico intercambiable. Moore realizó un estudio de aminas de cadena larga y encontró que son excelentes extractantes para ácidos minerales, ácidos orgánicos y complejos metálicos ácidos [222]. Este autor explica que con la utilización de este tipo de extracción aniónica es posible separar metales como zinc, cobalto y hierro de otros elementos que no formen complejos clorurados aniónicos. Por ejemplo, la amina primaria N 1923© junto con el Cyanex 923© ha sido utilizada para eliminar Cd(II), Zn(II) y Cu(II) de muestras acuosas, debido a la gran toxicidad de estos metales sobre los sistemas biológicos, gracias al efecto sinérgico producido al utilizar la mezcla de estos reactivos en vez de usarlos por separado [223]. Del mismo modo, la amina tri-iso-octil amina (TIOA) ha sido utilizada para la separación de cadmio en aguas residuales [224]. Este tipo de extractantes han sido valorados además para realizar la especiación y separación de metales como el Rh(III) en soluciones cloruradas [225].

Aunque para el níquel son escasos los trabajos realizados con este grupo de extractantes es posible citar el caso del Alamine 336©, una mezcla de reactivos cuyo principal constituyente son aminas ternarias alifáticas sustituidas con C8-C10, que ha sido utilizada para la extracción de níquel de disoluciones acuosas ácidas cloruradas [226].

Extractantes neutros o solvatantes

Los extractantes conocidos como neutros o solvatantes, son reactivos orgánicos, básicos en naturaleza, que contienen grupos donadores de electrones que utilizan para realizar la extracción del metal en forma de complejos neutros. Estos reactivos pueden ser del tipo éteres (C-O-C), ésteres (-COOR), alcoholes (-C-OH), cetonas (C=O) y compuestos organofosforados neutros. Podemos escribir la reacción general a través de la cual estos reactivos extraen a los metales de la siguiente manera [203]:



donde M representa el metal, X al contraión utilizado durante la extracción y P el extractante solvatante.

En este grupo se encuentran la mayoría de los extractantes denominados “Cyanex” entre los que el óxido de la fosfina Cyanex 923©, ha adquirido mayor interés en la última década debido a que presenta mayor selectividad, estabilidad frente a la hidrólisis y mejor separación de las fases durante la extracción. Gupta y col. determinaron la concentración total de cadmio en muestras cloradas con este extractante, encontrando que la extracción se producía a través del complejo formado $CdCl_2 \cdot 2Cyanex\ 923$ [227]. Utilizando este mismo reactivo Alguacil y col. han realizado la extracción de contenidos totales de cadmio en aguas [228]. Mishra y col. compararon la extracción producida por este reactivo con la obtenida usando Cyanex 921© y TBP para Fe (III), obteniendo que el Cyanex 923© era el que mejor resultado daba para la extracción de la concentración total de este metal [229]. También es posible encontrar aplicaciones de este tipo de extractantes en estudios de especiación, como el trabajo de Alguacil y col. para realizar la especiación de cromo entre las especies CrO_4^{-2} , $Cr_2O_7^{-2}$, Cr^{+3} [202].

Por otro lado el Cyanex-471X © (TIBPS), un reactivo ampliamente utilizado en metalurgia para recuperar plata en medios ácidos [230], ha demostrado su utilidad para realizar el fraccionamiento de Ag asociada a complejos clorurados y orgánicos de forma sencilla a partir de los datos de concentración de COD y salinidad de las muestras [231].

Otro tipo de extractantes como los compuestos solvatantes de la clase *bis-triacinil biperidinas* (BTBPs) han demostrado su capacidad para la extracción de metales en muestras acuosas. Estos reactivos, como el óxido trioctil fosfina (TOPO) y el tributilfosfato (TBP), han sido ampliamente usados para realizar la separación de

tierras raras en muestras acuosas [232,233]. Aunque no ha sido utilizado en estudios de especiación su carácter de solvatante podría permitir su uso en este tipo de estudios, como han sido utilizados otros reactivos dentro de este grupo.

Finalmente, el gran grado de selectividad de los éteres corona hacia ciertos cationes al formar complejos estables con ellos en el interior de la cavidad formada en su estructura han propiciado el gran interés mostrado para su aplicación a la extracción de metales. Estos reactivos se diferencian según los átomos donadores que contienen en su estructura molecular, así pueden ser éteres aza-corona, que contienen nitrógeno, éteres tio-corona, con azufre, y éteres corona, con átomos de oxígeno. Estos átomos donadores son los que le van a dar la estabilidad correspondiente al complejo formado con el metal, aunque el tamaño y forma de la cavidad son parámetros que van a determinar la selectividad del éter corona [234]. Gracias a que en la reacción con los metales no se produce intercambio de protones, entre sus aplicaciones a la determinación de metales traza en aguas naturales destaca su utilización para realizar estudios de especiación en presencia de distintos ligandos tanto orgánicos como inorgánicos, siendo una herramienta bastante útil para estudiar la biodisponibilidad de estos elementos [193-197].

Entre las aplicaciones de este tipo de reactivos a la extracción de níquel en muestras acuosas se encuentra el uso de los BTBPs para la extracción de la concentración total de este elemento junto con el cromo y hierro [235-237]. Además existen aplicaciones de éteres corona para la extracción de níquel, como el trabajo de Cakir y Cicek en el que se estudian dos aza-éteres coronas el 1,10-dioxa-4,7,13,16-tetra-azaciclo-octadecano (TA-18-corona-6) y su tetrabencil derivado (TBTA-18-corona-6). Estos autores observan la distinta selectividad de estos compuestos hacia los metales de transición estudiados (Fe, Cu, Mn, Co, Cd, Ni y Zn) ya que ambos compuestos extraían preferiblemente al Fe^{3+} sobre los demás cationes, seguido de Cu^{2+} y Ni^{2+} [238].

Por otra parte, es interesante el uso de estos reactivos solvatantes como modificadores de fase disueltos en la disolución orgánica utilizada para realizar el proceso de extracción. Un modificador de fase es una sustancia orgánica que mejora las propiedades químicas de la fase orgánica, mejorando la solubilidad del agente extractante o sus propiedades interfaciales o ejerciendo un efecto sinérgico en la extracción. De este modo, como consecuencia se optimiza la separación de las fases, ayuda a la reutilización de la fase orgánica y mejora la extracción de soluto extraído [203]. El inconveniente de este tipo de reactivo modificador es que debe delimitarse su concentración, ya que un exceso puede alterar el proceso extractivo. De hecho, Belkhouche y col. encontraron un efecto sinérgico para la extracción de cobre al añadir TBP a una disolución extractante de DEHPA disuelto en n-heptano, sin embargo observaron que al aumentar la relación TBP:DEHPA por encima de 0,76 disminuía este efecto debido a la polaridad de la molécula de TBP y a las reacciones producidas entre DEHPA y TBP, que disminuían la concentración de moléculas libres de DEHPA en disolución [239].

Al poseer los reactivos solvatantes grupos con capacidad de donar electrones y tener la capacidad de formar enlaces de tipo puentes de hidrógeno, mejoran la solubilidad de las especies formadas durante la extracción del metal. Entre los extractantes solvatantes utilizados como modificadores de fase tenemos al TBP, TOPO, etc [240]. Además de este tipo de reactivos, también son utilizados como modificadores otros compuestos orgánicos como decanol, dodecanol y dimetilformamida (DMF) [230]. Por ejemplo, Rice y Gibson observaron en su trabajo para la extracción de níquel con el extractante Cyanex 301, que la adición de varios alcoholes de cadena larga (octanol, decanol, etc) y reactivos organofosforados como TOPO aumentaban la fracción extraída de este metal [241].

Otros modificadores de fase utilizados para realizar la extracción de metales traza han sido los ácidos grasos de cadena larga, mostrando una actividad sinérgica cuando son utilizados junto con extractantes macrocíclicos [242,243]. En este sentido,

se observó que no existe extracción de Cu (II) con el éter corona 1,10-didecylidaza-18-corona-6 (22DD) a pH naturales en ausencia de ácido láurico, mientras que en su presencia sí, debido a que el ácido laurico mejora la estabilidad del complejo formado en la interfase de las disoluciones cargada-membrana [190,244].

Además del uso de modificadores para mejorar la extracción es posible utilizar mezclas de agentes quelatantes con otro tipo de extractantes, como la mezcla de LIX 860 y ácido bis(2-etilhexil) fosfórico (DEHPA) que producía un efecto sinérgico en la extracción de níquel, resolviendo el problema de la lenta cinética de extracción del LIX 860 [245]. Esta misma mezcla ha demostrado su utilidad en la extracción de Ni y Co [246]. Por otro lado, Saji y Reddy, encontraron que la extracción de Fe(III) era cuantitativa cuando utilizaban una mezcla de reactivos orgánicos 70% TBP y 30% MBIK (metil isobutil cetona), mejorando la extracción en comparación con su uso por separado. Además se eliminaban algunos problemas encontrados cuando se utilizaban estos reactivos por separado, como la baja extracción conseguida con el MBIK, que incluso necesita altas concentraciones de ácido para ser cuantitativa y la formación de una tercera fase cuando se utiliza el TBP, lo que dificulta la separación de fases después de la extracción [237].

I.VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Eisler R., *Nickel hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review*, Patuxent Wildlife Research Center, U.S. Geological Survey, Laurel, MD 20708, 1996.
2. Ivanina A.V., Cherkasov A.S., Sokolova I.M., *Effects of cadmium on cellular protein and glutathione synthesis and expression of stress proteins in eastern oysters, Crassostrea virginica Gmelin*, The Journal of Experimental Biology 211, 577-586, 2008.
3. Debelius B., Forja J.M., Lubián L.M., *Toxicity of copper, nickel and zinc to Synechococcus populations from the Strait of Gibraltar*, Journal of Marine Systems, 88, 113-119, 2011.
4. Pane E.F, Richards J.G., Wood C.M., *Acute waterborne nickel toxicity in the rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) occurs by a respiratory rather than ionoregulatory mechanism*, Aquatic Toxicology, 63, 65-82, 2003.
5. Nriagu J.O., Pacyna J.M., *Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals*, Nature, 333, 134-139, 1988.
6. Charlson R.J., Orians G.H., Wolfe G.V., S.S. Butcher, *Human modification of global biogeochemical cycles*, En: *Global biogeochemical cycles*, Butcher S.S. Carlson R.J., Orians G.H., Wolfe G.V (eds.) Academic Press Inc., London, 1992.
7. Rauch J.N., Pacyna J.M., *Earth's global Ag, Al, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, and Zn cycles*, Global Biogeochemical Cycles, 23, 1-16, 2009.
8. Stumm W., Morgan J.J., *Aquatic Chemistry: chemical equilibria and rates in natural waters*, 3ª Edición, John Wiley and Sons Inc., New York, 1996.
9. Nriagu J.O., *Metal pollution in the Great Lakes in relation to their carrying capacity*. En: Kullenberg G. (ed.), *The role of the oceans as a waste disposal option*, D. Reidel Publishing Co, Dordrecht, Holland, 1986.

10. López-López J.A., García-Vargas M., Moreno C., *A chemometric approach to the evaluation of atmospheric and fluvial pollutant inputs in aquatic systems: The Guadalquivir river estuary as a case study*, Environmental Pollution, 159, 1136-1143, 2011.
11. Vicente-Martorell J.J., Galindo-Riaño M.D., García-Vargas M., Granado-Castro M.D., *Heavy metal speciation of estuarine sediments affected by acid mine drainage in the Tinto and Odiel estuary, Spain. Relationship to bioconcentration of fish tissues*, Fresenius Environmental Bulletin, 17, 1744-1754, 2008.
12. Maanan M., *Heavy metal concentrations in marine molluscs from the Moroccan coastal region*, Environmental Pollution, 153, 176-183, 2008.
13. De Madrona X.D., Guieub C., Sempéré R., Conan P., Cossao D., D'Ortenzio F., Estournel C., Gazeau F., Rabouille C., Stemmann L., Bonnet S., Diaz F., Koubbi P., Radakovitch O., Babin M., Baklouti M., Bancon-Montigny C., Belviso S., Bensoussan N., Bonsang B., Bouloubassi I., Brunet C., Cadiou J., Carlotti F., Chami M., Charmasson S., Charrière B., Dachs J., Doxaran D., Dutay J., Elbaz-Poulichet F., Eléaume M., Eyrolles F., Fernandez C., Fowler S., Francour P., Gaertnerf J.C., Galzin R., Gasparini S., Ghiglione J., Gonzalez J., Goyet C., Guidi L., Guizien K., Heimbürger L., Jacquet S.H.M., Jeffrey W.H., Joux F., Le Hir P., Leblanc K., Lefèvre D., Lejeusne C., Lemé R., Loÿe-Pilot M., Mallet M., Méjanelle L., Mélin F., Mellon C., Méricot B., Merlex P., Migon C., Miller W., Mortier L., Mostajir B., Mousseau L., Moutin T., Para J., Pérez T., Petrenko A., Poggiale J., Prieur L., Pujo-Payg M., Pulido-Villena, Raimbault P., Rees A.P., Ridame C., Rontanif J., Ruiz Pino D., Sicre M.A., Taillandier V., Tamburini C., Tanaka T., Taupier-Letage I., Tedetti M., Testor P., Thébaud H., Thouvenin B., Touratier F., Tronczynski J., Ulsesi C., Van Wambeke F., Vantrepotteal V., Vaz S., Verney R., *Marine ecosystems'*

- responses to climatic and anthropogenic forcings in the Mediterranean*, Progress in Oceanography, 91, 97-166, 2011.
14. Florence T.M., Stauber J.L., Ahsanullah M., *Toxicity of nickel ores to marine organisms*, Science of The Total Environment, 148, 139-155, 1994.
 15. Pyle G., Couture P., *Nickel*, En: *Fish Physiology: Homeostasis and Toxicology of Essential Metals*, Wood C.M. (ed.), Elsevier, 31A, 253-289, 2011.
 16. Sigel A., Sigel H., Sigel R.K.O., *Metal ions in life science, Nickel and its impact in nature*, John Wiley and Sons Ltd., Chichester, England, 2007.
 17. Censi P., Spoto S.E., Saiano F., Sprovieri M., Mazzola S., Nardone G., Di Geronimo S.I., Punturo R., Ottonello D., *Heavy metals in coastal water systems. A case study from the northwestern Gulf of Thailand*, Chemosphere, 64, 1167-1176, 2006.
 18. Santos-Echeandía J., Prego R., Cobelo-García A., *Copper, nickel, and vanadium in the Western Galician Shelf in early spring after the Prestige catastrophe: is there seawater contamination?*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 382, 360-365, 2005.
 19. Nriagu J.O., Wong H.K.T., Lawson G., Daniel P., *Saturation of ecosystems with toxic metals in Sudbury basin, Ontario, Canada*, The Science of The Total Environment, 223, 99-117, 1998.
 20. Tanaka M., Maruyama M., Sato Y., *Solvent extraction recovery of nickel from spent electroless nickel plating baths using mixtures of organophosphorous acids and hydroxyoximes*, Solvent Extraction Research and Development-Japan, 10, 51-63, 2003.
 21. Lothongkum A.W., Khemglad Y., Usomboon N., Pancharoen U., *Selective recovery of nickel ions from wastewater of stainless steel industry via HFSLM*, Journal of Alloys and Compounds, 476, 940-949, 2009.
 22. Cui C., He M., Hu B., *Membrane solid phase microextraction with alumina*

- hollow fiber on line coupled with ICP-OES for the determination of trace copper, manganese and nickel in environmental water samples*, Journal of Hazardous Materials, 187, 379-385, 2011.
23. Durukan I., Şahin C.A., Bektaş S., *Determination of copper traces in water samples by flow injection-flame atomic absorption spectrometry using a novel solidified floating organic drop microextraction method*, Microchemical Journal, 98, 215-219, 2011.
24. Vullo D.L., *Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente*, Química Viva, 2, 93-104, 2003.
25. Templeton D.M., Ariese F., Cornelis R., Danielsson L., Muntau H., Van Leeuwen H.P., Lobinski R., *Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches* (IUPAC Recommendations 2000), Pure Applied Chemistry, 72, 1453-1470, 2000.
26. Liang Y., Wong M.H., *Spatial and temporal organic and heavy metal pollution at Mai Po Marshes Nature Reserve, Hong Kong*. Chemosphere, 52, 1647-1658, 2003.
27. Guevara-Riba A., Sahuquillo A., Rubio R., Rauret G., *Effect of chloride on heavy metal mobility of harbour sediments*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 382, 353-359, 2005.
28. Doong R.A., Lee S.H., Lee C.C., Sun Y.C., Wu S.C., *Characterization and composition of heavy metals and persistent organic pollutants in water and estuarine sediments from Gao-ping river, Taiwan*. Marine Pollution Bulletin, 57, 846-857, 2008.
29. Bradl H.B., *Sources and origins of heavy metals*, En: *Heavy Metals in the environment*, Bradl H.B. (ed.), Elsevier Ltd., London, 2005.
30. Sunderland E.M., Gobas F.A.P.C., Heyes A., Brainfireun B.A., Bayer A.K.,

- Cranston R.E., Parsons M.B., *Speciation and bioavailability of mercury in well-mixed estuarine sediments*, Marine Chemistry, 90, 91-105, 2004.
31. Bianchi T.S., *Biochemistry of Estuaries*. Oxford University Press, USA, Cary N. C., 2006.
32. Riba I., Casado-Martínez C., Forja J.M., Del Valls A., *Sediment quality in the atlantic coast of Spain*, Environmental Toxicology and Chemistry, 23, 271-282, 2004.
33. Morris A.W., Bale A.J., Howland R.J., Loring D.H., Rantala R.T.T. *Controls on the chemical composition of particle compositions in a macrotidal estuary (Tamar estuary, UK)*. Continental Shelf Research, 7, 1351-355, 1987.
34. Tovar-Sanchez A., Sañudo-Wilhelmy S. A., Flegal A.R. *Temporal and spatial variations in the biogeochemical cycling of cobalt in two urban estuaries: Hudson River Estuary and San Francisco Bay*. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 60, 717-728, 2004.
35. Sholkovitz E.R., *The geochemistry of plutonium in fresh and marine water environments*, Earth-Science Reviews, 64, 95-161, 1978.
36. Wells M.L., Smith G.J., Bruland K.W., *The distribution of colloidal and particulate bioactive metals in Narragansett Bay, RI*. Marine Chemistry, 71, 143-163, 2000.
37. Farley K.J., Morel F.M.M., *Role of coagulation in the kinetics of sedimentation*, Environmental Science and Technology, 20, 187-195, 1986.
38. Honeyman B.D., Santschi P.H., *A Brownian-pumping model for oceanic trace metal scavenging: evidence from Th isotopes*. Journal of Marine Research, 47, 951-992, 1989.
39. Santschi P.H., Lenhart J.J., Honeyman B.D., *Heterogeneous processes affecting trace contaminant distribution in estuaries: the role of natural organic matter*, Marine Chemistry, 58, 99-125, 1997.

40. Benjamin M.M., Honeyman B.D., *Trace Metals. In Earth System Science— from Biogeochemical Cycles to Global Change*, Jacobson, M.C., Charlson, R.J., Rodhe, H., Orians, G.H., (eds.), Academic Press, New York, 377-411, 2000.
41. Peterson G.S., Ankley G.T., Leonard E.N., *Effect of bioturbation on metal-sulfide oxidation in surficial freshwater sediments*, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15, 2147-2155, 1996.
42. Reynoldson T.B., *Interactions between sediment contaminants and benthic organisms*, *Hydrobiología*, 149, 53-66, 1987.
43. Zheng Y., Anderson R.F., Van Geen A., Fleisher M.Q., *Remobilization of authigenic uranium in marine sediments by bioturbation*, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 66, 1759-1772, 2002.
44. Bradl H.B., Kim C., Kramar U., Stüben D., *Interactions of heavy metals*, En: Bradl H.B. (ed.), *Heavy metals in the environment: origin, interaction and remediation*, Elsevier, Amsterdam, 2005.
45. Morse J.W., Arakaki T., *Adsorption and coprecipitation of divalent metals with mackinawite (FeS)*. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 57, 3635-3640, 1993.
46. Bernhard M., Brinckham F.E., Sadler P.J., *The importance of chemical speciation in environmental processes*, Springer Verlag, Berlin, Alemania, 1986.
47. Žemberyová M., Al Hakem Zwaik A., Farkašovská I., *Sequential extraction for the speciation of some heavy metals in soils*, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 229, 67-71, 1998.
48. Hung J., Lu C., Huh C., Liu J.T., *Geochemical controls on distributions and speciation of As and Hg in sediments along the Gaoping (Kaoping) Estuary-Canyon system of southwestern Taiwan*, *Journal of Marine Systems*, 76, 479-495, 2009.
49. Andrade S., Moffet J., Correa J.A., *Distribution of dissolved species and*

- suspended particulate copper in an intertidal ecosystem affected by copper mine tailings in Northern Chile*, Marine Chemistry, 101, 203-212, 2006.
50. Vandennecke J., Waeles M., Riso R. D., Le Corre P., *A stripping chronopotentiometric (SCP) method with a gold film electrode for determining inorganic arsenic species in seawater*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 388, 929-937, 2007.
 51. Murai R., Kurakane K., Sekine T., *The stability constants of nickel (II) complexes with chloride, thiocyanate, sulphate, thiosulphate, and oxalate ions, as determined by a solvent extraction method*, Bulletin of the Chemical Society of Japan, 49, 335-336, 1976.
 52. Motekaitis R.J., Martell A.E., *Speciation of metals in the oceans. I. Inorganic complexes in seawater, and influence of added chelating agents*, Marine Chemistry, 21, 101-116, 1987.
 53. Martino M., Turner A., Nimmo M., *Distribution, speciation and particle-water interactions of nickel in the Mersey Estuary, UK*, Marine Chemistry, 88, 161-177, 2004.
 54. Tipping E., *Cation binding by humic substances*, Cambridge Environmental Chemistry Series, Cambridge University Press, New York, U.S.A., 2002.
 55. Thurman E., *Organic geochemistry of natural waters*, Springer Science and Business, Dordrecht, The Netherlands, 1985.
 56. Oliver B.G., Thurman E.M., Malcolm R.L., *The contribution of humic substances to the acidity of colored natural waters*, Geochimica et Cosmochimica Acta, 47, 2031-2035, 1983.
 57. Mantoura R.F.C., Dickson A., Riley J.P., *The complexation of metals with humic materials in natural waters*, Estuarine and Coastal Marine Science, 6, 387-408, 1978.
 58. Buffle J., Altmann R.S., Filella M., Tessier A., *Complexation by natural*

- heterogeneous compounds: site occupation distribution functions, a normalized description of metal complexation. Geochimica et Cosmochimica Acta, 54, 1535-1554, 1990.*
59. Donat J.R., Bruland K.W., *Trace elements in the oceans. In: Trace Metals in Natural Waters*, Salbu B., Steinnes E., (eds.), CRC Press, Boca Ratón, Florida, 247-281, 1995.
60. Perdue E.M., Lytle C.R., *Distribution model for binding of protons and metal ions by humic substances*, Environmental Science and Technology, 17, 564-660, 1983.
61. Dzombak D.A., Fish W., Morel F.M. M., *Metal-humate interactions. I. Discrete ligand and continuous distribution models*, Environmental Science and Technology, 20, 669-675, 1986.
62. Town R.M., Filella M., *Dispelling the myths: Is the existence of L1 and L2 ligands necessary to explain metal ion speciation in natural waters?*, Limnology and Oceanography, 45, 1341-1357, 2000.
63. Hirose K., *Conditional stability constants of metal complexes of organic ligands in sea water: past and present, and a simple coordination chemistry model*, Analytica Chimica Acta, 284, 621-634, 1994.
64. Donat J.R., Lao K.A., Bruland K.W., *Speciation of dissolved copper and nickel in South San Francisco Bay: a multi-method approach*, Analytica Chimica Acta, 284, 547-571, 1994.
65. Moffett J.W., Zika R.G., Brand L.E., *Distribution and potential sources and sinks of copper chelators in the Sargasso Sea*, Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers, 37, 27-36, 1990.
66. Zhang H., Van Den Berg C.M.G., Wollast R., *The determination of interactions of cobalt(II) with organic compounds in seawater using cathodic stripping voltammetry*, Marine Chemistry, 28, 285-300, 1990.

67. Ahner B.A., Morel F.M.M., *Ohytochelatin production in marine algae. 2. Induction by various metals*, Limnology and Oceanography, 40, 658-665, 1995.
68. Rue E.L., Bruland K.W., *Complexation of iron(III) by natural organic ligands in the Central North Pacific as determined by a new competitive ligand equilibration/adsorptive cathodic stripping voltammetric method*, Marine Chemistry, 50, 117-138, 1995.
69. Fernandez-Piñas F., Mateo P., Bonilla I., *Ultrastructural changes induced by selected cadmium concentrations in the Cyanobacterium Nostoc UAM208*, Journal of Plant Physiology, 147, 452-456, 1995.
70. Bruland K.W., Donat J.R., Hutchins D.A., *Interactive influences of bioactive trace metals in oceanic waters: on biological productivity*, Limnology and Oceanography, 36, 1555-1577, 1991.
71. Mackey D.J., Zirino A., *Comments on trace metal speciation in seawater or do "onions" grow in the sea?*, Analytica Chimica Acta, 284, 635-647, 1994.
72. Gordon A.S., Dyer B.J., Kango R.A., Donat J.R., *Copper ligands isolated from estuarine water by immobilized metal affinity chromatography: temporal variability and partial characterization*, Marine Chemistry, 53, 163-172, 1996.
73. Maridokawa T., Tanoue E., *Extraction and characterization of organic ligands from oceanic water columns by immobilized metal ion affinity chromatography*, Marine Chemistry, 52, 157-171, 1996.
74. Gordon A.S., *Microbial control of trace metals in the oceans*, ASM News, 64, 79-83, 1998.
75. Buffle J., *Complexation reactions in aquatic systems: An analytical approach*, Ellis Horwood, Chichester, UK, 1988.
76. Jaroniec M., Mandey R., *Physical Adsorption on heterogeneous solids*, Elsevier, Amsterdam, Alemania, 1988.
77. Sips R., *On the structure of a catalyst surface*, Journal of Chemical Physics 16,

- 490-495, 1948.
78. Sips R., *On the structure of a catalyst surface II*, Journal of Chemical Physics, 18, 1024-1026, 1950.
79. Koopal L.K., Van Riemsdijk W.H., De Wit J.C.M., Benedetti M.F., *Analytical isotherm equations for multicomponent adsorption to heterogeneous surfaces*, Journal of Colloid and Interface Science, 166, 51-60, 1994.
80. Jaroniec M., *A new isotherm equation for single-solute adsorption from dilute solutions on energetically heterogeneous solids*, Advance in Colloid Interface Science, 18, 149-225, 1983.
81. Saar R.A., Weber J.H., *Complexation of cadmium(II) with water- and soil-derived fulvic acids: effect of pH and fulvic acid concentration*, Canadian Journal of Chemistry, 57, 1263-1268, 1979.
82. Kinniburgh D.G., Milne C.J., Benedetti M.F., Pinheiro J.P., Filius J., Koopal L.K., Van Riemsdijk W.H., *Metal ion binding by humic acid: Application of the NICA-Donnan Model*, Environmental Science and Technology, 30, 1687-1698, 1996.
83. Buffle J., Altmann R.S., Filella M, *Effect of physico-chemical heterogeneity of natural complexants. Part II. Buffering action and role of their background sites*, Analytica Chimica Acta, 232, 225-237, 1990.
84. Guthrie J.W., Mandal R., Salam M.S.A., Hassan N.M., Murimboh J., Chackrabarti C.L., Back M.H., Grégoire D.C., *Kinetic studies of nickel speciation in model solutions of a well-characterized humic acid using the competing ligand exchange method*, Analytica Chimica Acta, 480, 157-169, 2003.
85. Sedlak D.L., Phinney J.T., Bedsworth W.W., *Strongly complexed Cu and Ni in wastewaters and surface runoff*. Environmental Science and Technology, 31, 3010-3016, 1997.

86. Bedsworth W.W., Sedlak D.L., *Sources and environmental fate of strongly complexed nickel in estuarine waters: the role of ethylenediaminetetraacetate*, Environmental Science and Technology, 33, 926-931, 1999.
87. Worms I.A.M., Wilkinson K.J., *Determination of Ni²⁺ using an equilibrium ion exchange technique: important chemical factors and applicability to environmental samples*, Analytica Chimica Acta, 616, 95-102, 2008.
88. Turner D.R., Whitfield M., Dickson A.G., *The equilibrium speciation components in freshwater and seawater at 25°C and 1 atm pressure*, Geochimica et Cosmochimica Acta, 45, 855-881, 1981.
89. Achterberg E.P., Van Den Berg C.M.G., Boussemart I.M., Davison W., *Speciation and cycling of trace metals in Esthwaite Water: A productive English lake with seasonal deep-water anoxia*, Geochimica et Cosmochimica Acta, 61, 5233-5253, 1997.
90. Kozlova T., Wood C.M., McGeer J.C., *The effect of water chemistry on the acute toxicity of nickel to the Cladoceran Daphnia pulex and the development of a biotic ligand model*, Aquatic Toxicity, 91, 221-228, 2009.
91. Wood C.M., *The biotic ligand model: using physiology, geochemistry and modelling to predict metal toxicity*, Plenary Lecture, International Conference of Comparative Physiology, Biochemistry and Toxicology and 6th Chinese Comparative Physiology Conference, Hangzhou, China, 2007.
92. Di Toro D.M., Allen H.E., Bergman H.L., Meyer J.S., Paquin P.R., Santore R.C., *Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis*. Environmental Toxicology and Chemistry, 20, 2383-2396, 2001.
93. Heijerick D.G., De Schamphelaere A.C., Janssen C.R. *Predicting acute toxicity for Daphnia magna as a function of key chemistry characteristics: development and validation of a biotic ligand model*. Environmental Toxicology and Chemistry, 21, 1309-1315, 2002.

94. Santore R.C., Di Toro D.M., Paquin P.R., Allen H.E., Meyer J.S., *Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 2. Application to acute copper toxicity in freshwater fish and Daphnia*. Environmental Toxicology and Chemistry, 20, 2397-2402, 2001.
95. Niyogi S., Kent R., Wood C.M., *Effects of water chemistry variables on gill binding and acute toxicity of cadmium in Rainbow trout (Oncorhynchus mykiss): A biotic ligand model (BLM) approach*, Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, 148, 305-314, 2008.
96. Phinney J.T., Bruland K.W., *Uptake of lipophilic organic Cu, Cd and Pb complexes in the coastal diatom Thalassiosira weissflogii*, Environmental Science and Technology, 28, 1781-1784, 1994.
97. Errecalde O., Campbell P.G.C., *Cadmium and zinc bioavailability to Selenastrum capricornutum (Chlorophyceae): Accidental metal uptake and toxicity in the presence of citrate*, Journal of Phycology, 36, 473-483, 2000.
98. Errecalde O., Seidl M., Campbell P.G.C., *Influence of a low molecular weight metabolite (citrate) on the toxicity of cadmium and zinc to the unicellular alga Selenastrum capricornutum: An exception to the free-ion model*, Water Research, 32, 419-429, 1998.
99. Parent L., Twiss M.R., Campbell P.G.C., *Influences of natural dissolved organic matter on the interaction of aluminium with the microalga Chlorella: A test of the free-Ion model of trace metal toxicity*, Environmental Science and Technology, 30, 1962-1969, 1996.
100. Campbell P.G.C., *Interaction between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model*. En: *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic System*, Tessier A., Turner D. R. (eds.), John Wiley and Sons, Chichester, 1995.
101. Van Leeuwen H.P., *Metal speciation dynamics and bioavailability: Inert and*

- labile complexes*, Environmental Science and Technology, 33, 3743-3748, 1999.
102. Mandal R, Hassan N.M., Murimboh J., Chakrabarti C.L., Back M.H., *Chemical speciation and toxicity of nickel species in natural waters from the Sudbury area (Canada)*, Environmental Science and Technology, 36, 1477-1484, 2002.
103. Doig L.E., Liber K., *Nickel speciation in the presence of different sources and fractions of dissolved organic matter*, Ecotoxicology and Environmental Safety, 66, 169-177, 2007.
104. Tipping E., Hurley M., *A unifying model of cation binding by humic substances*, Geochimica et Cosmochimica Acta, 56, 3627-3641, 1992.
105. Tipping E., *Humic Ion-Binding Model VI: An improved description of the interactions of protons and metal ions with humic substances*, Aquatic Geochemistry, 4, 3-48, 1998.
106. Tipping E., Lofts S., Sonke J.E., *Humic ion-binding model VII: a revised parameterisation of cation-binding by humic substances*, Environmental Chemistry, 8, 225-235, 2011.
107. Gustafsson J.P., *Modeling the acid-base properties and metal complexation of humic substances with the Stockholm Humic Model*. Journal of Colloid and Interface Science, 244, 102-112, 2001.
108. Chakraborty P., Chakrabarti C.L., *Chemical speciation of Co, Ni, Cu, and Zn in mine effluents and effects of dilution of the effluent on release of the above metals from their metal-dissolved organic carbon (DOC) complexes*, Analytica Chimica Acta, 571, 260-269, 2006.
109. Mandal R., Salam M.S.A., Murimboh J., Hassan N.M., Chakrabarti C.L., Back M.H., *Competition of Ca(II) and Mg(II) with Ni(II) for binding by a well-characterized fulvic acid in model solutions*, Environmental Science and Technology, 34, 2201-2208, 2000.
110. Shuman M.S., Cromer J.L., *Copper Association with Aquatic Fulvic and Humic*

- Acids. Estimation of Conditional Formation Constants with a Titrimetric Anodic Stripping Voltammetry Procedure*, Environmental Science and Technology, 13, 1979
111. Celo V., Murimboh J., Salam M.S.A., Chakrabarti C.L., *A kinetic study of nickel in model systems by adsorptive stripping voltammetry*, Environmental Science and Technology, 35, 1084-1089, 2001.
112. Christl I., Milne C.J., Kinniburgh D.G., Kretzschmar R., *Relating ion binding by fulvic and humic acids to chemical composition and molecular size. 2. Metal binding*, Environmental Science and Technology, 35, 2512-2517.
113. Romero R., Jönsson J.A., *Determination of free copper concentration in natural waters by using supported liquid membrane extraction under equilibrium conditions*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 381, 1452-1459, 2005.
114. Patterson S.C., Settle D.M. *The reduction of orders of magnitude errors in lead analysis of biological materials and natural waters by controlling external sources of industrial Pb contamination introduced during sample collection and handling. In 'Reliability in Trace Analysis'*, La Fleur D.M. (ed.), National Bureau of Standards, Washington, Special Publication, 422, 321-323, 1976.
115. Mendiguchía C., Moreno C., García-Vargas M., *Evaluation of natural and anthropogenic influences on the Guadalquivir River (Spain) by dissolved heavy metals and nutrients*, Chemosphere, 69, 1509-1517, 2007.
116. Bruland K.W., Coale K.H., Mart L., *Analysis of seawater for dissolved cadmium, copper and lead - an intercomparison of voltammetric and atomic-absorption methods*, Marine Chemistry, 17, 285-300, 1985.
117. Elbaz-Poulichet F., Morley N.H., Beckers J.M., Nomerange P., *Metal Fluxes through the Strait of Gibraltar: the influence of the Tinto and Odiel rivers (SW Spain)*, Marine Chemistry, 73, 193-213, 2001.
118. Elbaz-Poulichet F., Morley N.H., Cruzado A., Velasquez Z., Achterberg E.P.,

- Braungardt C.B., *Trace metal and nutrient distribution in an extremely low pH (2.5) river-estuarine system, the Ria of Huelva (South-West Spain)*, Science of the Total Environment, 227, 73-83, 1999.
119. Pesavento M., Alberti G., Biesuz R., *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, 2009.
120. Pingarrón J.M., Sánchez P., *Química Electroanalítica: Fundamentos y aplicaciones*, Síntesis, S.A., Madrid, España, 2003.
121. Buffle J., Tercier-Waeber M., *Voltametric environmental trace metal analysis and speciation: from laboratory to in situ measurements*, Trends in Analytical Chemistry, 24, 172-190, 2005.
122. Capodaglio G., Coale K.H., Bruland K.W., *Lead Speciation in Surface Waters of the Eastern North Pacific*, Marine Chemistry, 29, 221-233, 1990.
123. Scarponi G., Capodaglio G., Toscano G., Barbante C., Cescon P., *Speciation of lead and cadmium in antartic seawater comparison with areas subject to different anthropic influence*, Microchemical Journal, 51, 214-230, 1995.
124. Town R.M., Van Leeuwen H.P., *Effects of adsorption in stripping chronopotentiometric metal speciation analysis*, Journal of Electroanalytical Chemistry, 523, 1-15, 2002.
125. Van den Berg C.M.G., *Monitoring of labile copper and zinc in estuarine waters using cathodic stripping chronopotentiometry*, Marine Chemistry, 34, 221-223, 1991.
126. Galceran J., Huidobro C., Companys E., Alberti G., *AGNES: A technique for determining the concentration of free metal ions. The case of Zn(II) in coastal Mediterranean seawater*, Talanta, 71, 1795–1803, 2007.
127. Companys E., Puy J., Galceran J., *Humic acid complexation to Zn and Cd*

- determined with the new electroanalytical technique AGNES*, Environmental Chemistry, 4, 347-354, 2007.
128. Frant M.S., *Historical perspective. History of the early commercialization of ion-selective electrodes*, Analyst, 119, 2293-2301, 1994.
129. Batley G.E., Apte S.C., Stauber, J.L. *Speciation and bioavailability of trace metals in water. Progress since 1982*. Australian Journal of Chemistry, 57, 903-919, 2004.
130. Buffle J., Greter F., Haerdi W., *Measurement of Complexation Properties of Humic and Fulvic Acids in Natural Waters with Lead and Copper Ion-Selective Electrodes*, Analytical Chemistry, 49, 216-222, 1977.
131. Alberti G., Biesuz R., Huidobro C., Companys E., Puy J., Galceran J., *A comparison between the determination of free Pb(II) by two techniques: absence of gradients and Nernstian equilibrium stripping and resin titration*. Analytica Chimica Acta, 599, 41-50, 2007.
132. Breault R.F., Colman J.A., Aiken G.R., McKnight D., *Copper speciation and binding by organic matter in copper-contaminated streamwater*, Environmental Science and Technology, 30, 3477-3486, 1996.
133. Xue H.B., Sunda W.G., *Comparison of [Cu²⁺] measurements in lake water determined by ligand exchange and cathodic stripping voltammetry and by ion-selective electrode*, Environmental Science and Technology, 31, 1902-1909, 1997.
134. Buckely J.A., *The bioavailability of copper in wastewater to Lemna minor with biological and electrochemical measures of complexation*, Water Research, 28, 2457, 1994.
135. Xue H., Sigg L., *A review of competitive ligand-exchange/voltammetric methods for speciation of trace metals in freshwater*, Rozan T.F., Taillefert M. (eds.), En: *Environmental Electrochemistry: Analyses of Trace Element Biogeochemistry*,

- ACS Symposium Series, Oxford University Press, 811, 2002.
136. Buffle J., Tercier-Waeber M., *Chemical Analysis and Speciation*, En: *In situ Monitoring of Aquatic Systems*, J. Buffle, G. Hoarvai (eds.), The IUPAC Series on Analytical and Physical Chemistry of Environmental Systems, Wiley, Chichester, UK, 2000.
 137. Xue H., Sigg L., *Comparison of the complexation of Cu and Cd by humic or fulvic acids and by ligands observed in lake waters*, *Aquatic Geochemistry*, 5, 313-335, 1999.
 138. Xue H.B., Sigg L., *Zinc speciation in lake waters and its determination by ligand exchange with EDTA and differential pulse anodic stripping voltammetry*, *Analytica Chimica Acta*, 284, 505-515, 1994.
 139. Turner A., Nimmo M., Thuresson K.A., *Speciation and sorptive behaviour of nickel in an organic-rich estuary (Beaulieu, UK)*, *Marine Chemistry*, 63, 105-118, 1998.
 140. Turner A., Martino M., *Modelling the equilibrium speciation of nickel in the Tweed Estuary, UK: Voltammetric determinations and simulations using WHAM*, *Marine Chemistry*, 102, 198-207, 2006.
 141. Pihlar B., Valenta P., Nürnberg H.W., *New high-performance analytical procedure for the voltammetric determination of nickel in routine analysis of waters, biological materials and food*, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 307, 337-346, 1981.
 142. Abbasse G., Ouddane B., Fischer J.C., *Determination of total and labile fraction of metals in seawater using solid phase extraction and inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES)*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 17, 1354-1358, 2002.
 143. Van Ginneken L., Blust R., *Determination of conditional stability constants of cadmium-humic acid complexes in freshwater by use of a competitive ligand*

- equilibration-solvent extraction technique*, Environmental Toxicology and Chemistry, 19, 283-292, 2000.
144. López-López J.A., Mendiguchía C., Pinto J.J., Moreno C., *Liquid membranes for quantification and speciation of trace metals in natural waters*, Trends in Analytical Chemistry, 29, 645-653, 2010.
145. Method 9071B, “*n-Hexane extractable material (HEW) for sludge, sediment, and solid samples*,” En: SW-846, *Test Methods for Evaluating Solid Waste: Physical/Chemical Methods 3rd ed. (Updates 1992, 1993, 1995)*, Washington, DC: US GPO, 1986.
146. Parthasarathy N., Pelletier M., Buffle J., *Permeation liquid membrane for trace metal speciation in natural waters. Transport of liposoluble Cu(II) complexes*. Journal of Chromatography A, 1025, 33, 2004.
147. Gunkel-Grillon P., Buffle J., *Speciation of Cu(II) with a flow-through permeation liquid membrane: discrimination between free copper, labile and inert Cu(II) complexes, under natural water conditions*, Analyst, 133, 954-961, 2008.
148. Chakrabarti C.L., Lu Y.J., Gregoire D.C., Back M.H., Schroeder W.H., *Kinetic studies of metal speciation using chelex cation exchange resin: application to cadmium, copper, and lead speciation in river water and snow*, Environmental Science and Technology, 28, 1957-1967, 1994.
149. Point D., Bareille G., Pinaly H., Belin C., Donard O.F.X., *Multielemental speciation of trace elements in estuarine waters with automated on-site UV photolysis and resin chelation coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry*, Talanta, 72, 1207-1216, 2007.
150. Sweileh J.A., Lucyk D., Kratochvil B., Cantwell F.F., *Specificity of the ion exchange/atomic absorption method for free copper (II) species determination in natural waters*, Analytical Chemistry, 59, 586-592, 1987.

151. Camel V., *Solid phase extraction of trace elements*, Spectrochimica Acta Part B, 58, 1177-1233, 2003.
152. Jönsson J.A., Mathiasson L., *Membrane extraction in analytical chemistry*, Journal of Separation and Science, 24, 495-507, 2001.
153. Ho T.S., Pedersen-Bjergaard S., Rasmussen K.E., *Recovery, enrichment and selectivity in liquid-phase microextraction. Comparison with conventional liquid-liquid extraction*, Journal of Chromatography A, 963, 3-17, 2002.
154. Pawliszyn J., *Solid-Phase Microextraction, Theory and Practice*. John Wiley & Sons, New York, 1997.
155. Rasmussen K.E., Pedersen-Bjergaard S., *Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction*, Trends in Analytical Chemistry, 23, 1-10, 2004.
156. Zhefeng F., *Determination of antimony(III) and total antimony by single-drop microextraction combined with electrothermal atomic absorption spectrometry*, Analytica Chimica Acta, 585, 300-304, 2007.
157. Parthasarathy N., Pelletier M., Buffle J., *Hollow fiber based supported liquid membrane: a novel analytical system for trace metal analysis*, Analytica Chimica Acta, 35, 183-195, 1997.
158. Bautista-Flores A.N., Rodríguez E., de Gyves J, Jönsson J.A., *Optimization, evaluation, and characterization of a hollow fiber supported liquid membrane for sampling and speciation of lead(II) from aqueous solutions*, Journal of Membrane Science, 363, 180-187, 2010.
159. Davison W., Zhang H., *In situ speciation measurements of trace components in natural waters using thin-film gels*, Nature, 367, 546-548, 1994.
160. Zhang H., Davison W., *Performance characteristics of the technique of diffusion gradients in thin-films (DGT) for the measurement of trace metals in aqueous solution*, Analytical Chemistry, 67, 3391-3400, 1995.
161. Zhang, H., Davison, W. *Direct measurement of labile inorganic and organic*

- metals using DGT*, Analytical Chemistry, 72, 4447-4457, 2000.
162. Quan G., Yanz J., *Binding Constants of Lead by Humic and Fulvic Acids Studied by Anodic Stripping Square Wave Voltammetry*, Russian Journal of Electrochemistry, 46, 90-94, 2010
163. Noble R.D., Way J.D., *Liquid Membranes, Theory and Applications*, ACS Symposium Series, 347, ACS, Washington, 1987.
164. Bartsch R.A., Way J.D., *Chemical Separations with Liquid Membranes*, ACS Symposium Series, 642, ACS, Washington, 1996.
165. Kislik V.S., *Liquid Membranes, Principles and applications in chemical separations and wastewater treatment*, Elsevier, Oxford, UK, 2010.
166. Ohki A., Takagi M., Takeda T., Ueno K., *Thioether-mediated copper transport through liquid membranes with the aid of redox reaction*, Journal Membrane Science, 15, 231-244, 1983.
167. Schlosser S., Rothová I., Friánová H., *Hollow-fibre pertractor with bulk liquid membrane*, Journal of Membrane Science, 80, 99-106, 1993.
168. Chakraborty M., Bhattacharya C., Datta S., *Study of the stability of W/O/W type emulsion during the extraction of nickel via emulsion liquid membrane*, Separation Science and Technology, 39, 2609-2625, 2004.
169. Pathasarathy N., Buffle J., *Supported liquid membrane for analytical separation of transition metal ions. Part II. Appraisal of lipophilic 1,10-didecyl-1,10-diaza-18-corone-6 as metal ion carrier in the membrane*, Analytica Chimica Acta, 254, 9-19, 1991.
170. Peterson R.T., Lamb J.D., *Rational design of liquid membrane separations systems*. En: *Chemical separations with liquid membranes*, Bartsch R.A., Way J.D. (eds.), ACS, Washington, 1996.
171. León G., Guzmán M.A., *Facilitated transport of copper through bulk liquid membranes containing different carriers: compared kinetic study*, Desalination,

- 223, 330-336, 2008.
172. León G., Guzmán M.A., *Kinetic study of the effect of carrier and stripping agent concentrations on the facilitated transport of cobalt through bulk liquid membranes*, *Desalination*, 184, 79-87, 2005.
 173. Teramoto M., Takeuchi N., Maki T., Matsuyama H., *Gas separation by liquid membrane accompanied by permeation of membrane liquid through membrane physical transport*. *Separation and Purification Technology*, 24, 101-112, 2001.
 174. Ho W.S.W., Poddar T.K., Neumuller T.E., *Removal and recovery of copper and zinc by supported liquid membranes with strip dispersion*. *Journal of the Chinese Institute of Chemical*, 33, 67-76, 2002.
 175. Eyal A.M., Bressler E., *Industrial separation of carboxylic and aminoacids by liquid membranes-Applicability, process considerations, and potencial advantages*. *Biotechnology and Bioengineering.*, 41, 287-295, 1993.
 176. Naim M.M., Monir A.A., *Desalination using supported liquid membranes*. *Desalination*, 153, 361-369, 2003.
 177. Marchese J., Campderros M.E., Acosta A., *Mechanistic study of cobalt, nickel and copper transfer across a supported liquid membrane*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 57, 37-42, 1993.
 178. Armenta S., Garrigues S., De la Guardia M., *Green analytical chemistry*, *Trends in Analytical Chemistry*, 27, 497-511, 2008.
 179. Pena-Pereira F., Lavilla I., Bendicho C., *Liquid-phase microextraction techniques within the framework of green chemistry*, *Trends in Analytical Chemistry*, 29, 617-628, 2010.
 180. Keith L.H., Gron L.U., Young J.L., *Green analytical methodologies*, *Chemical Reviews*, 107, 2695-2708, 2007.
 181. Sengupta B., Bhakhar M.S., Sengupta R., *Extraction of zinc and copper-zinc mixtures from ammoniacal solutions into emulsion liquid membranes using LIX*

- 84I[®], Hydrometallurgy, 99, 25-32, 2009.
182. Galan B., Castañeda D., Ortiz J., *Removal and recovery of Cr(VI) from polluted ground waters: A comparative study of ion-exchange technologies*, Water Research, 39, 4317-4324, 2005.
183. Valenzuela F., Araneda C., Vargas F., Basualto C., *Liquid membrane emulsion process for recovering the copper content of a mine drainage*, Chemical Engineering Research and Design, 87, 102-108, 2009.
184. Rounaghi G.H., Kazemi M.S., *Selective Bulk Liquid Membrane Transport of Metal ions Using Dibenzopyridinio-18-Crown-6 (DBPY18C6) as Ionophore*, 15th Iranian Seminar of Analytical Chemistry, 2007.
185. Mendiguchía C., Moreno C., García-Vargas M., *Separation of heavy metals in seawater by liquid membranes: Preconcentration of copper*, Separation Science and Technology, 37, 2337-2351, 2002.
186. Irigoyen L., Moreno C., Mendiguchía C., García-Vargas M., *Application of liquid membranes to sample preconcentration for the spectrometric determination of cadmium in seawater*, Journal of Membrane Science, 274, 169-172, 2006.
187. Granado-Castro M.D., Galindo-Riaño M.D., García Vargas M., *Separation and preconcentration of cadmium ions in natural water using a liquid membrane system with 2-acetylpyridine benzoylhydrazone as carrier by flame atomic absorption spectrometry*, Spectrochimica Acta Part B, 59, 577-583, 2004.
188. Domínguez-Lledó F.C., Galindo-Riaño M.D., Díaz-López I.C., García-Vargas M., Granado-Castro M.D., *Applicability of a liquid membrane in enrichment and determination of nickel traces from natural waters*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 389, 653-659, 2007.
189. Aouarram A., Galindo-Riaño M.D., García-Vargas M., Stitou M., El Yousfi F., *A permeation liquid membrane system for determination of nickel in seawater*,

- Talanta, 71, 165-170, 2007.
190. Parthasarathy N., Buffle J., *Capabilities of supported liquid membranes for metal speciation in natural waters: application to copper speciation*, Analytica Chimica Acta, 284, 649-659, 1994.
 191. Parthasarathy N., Buffle J., Gassama N., Cuenod F., *Speciation of trace metals in waters: direct selective separation and preconcentration of free metal ion by supported liquid membrane*, Chemia Analityczna (Warsaw), 44, 455-470, 1999.
 192. Ndungu K., Hurst M.P., Bruland K., *Comparison of copper speciation in estuarine water measured using analytical voltammetry and supported liquid membrane techniques*, Environmental Science and Technology, 39, 3166-3175, 2005.
 193. Bayen S., Worms L., Parthasarathy N., Wilkinson K., Buffle J., *Cadmium bioavailability and speciation using the permeation liquid membrane*. Analytica Chimica Acta, 575, 267, 2006.
 194. Bayen S., Wilkinson K.J., Buffle J., *The permeation liquid membrane as a sensor for free nickel in aqueous samples*, Analyst, 132, 262-267, 2007.
 195. Bayen S., Gunkel-Grillon P., Worms I., Martin M., Buffle J., *Influence of inorganic complexes on the transport of trace metals through permeation liquid membrane*, Analytica Chimica Acta, 646, 104-110, 2009
 196. Slaveykova V.I., Parthasarathy N., Buffle J., Wilkinson K.J., *Permeation liquid membrane as a tool for monitoring bioavailable Pb in natural waters*. Science of the Total Environment, 328, 55-68, 2004.
 197. Slaveykova V.I., Wilkinson K.J., Ceresa A., Pretsch E., *Role of fulvic acid on lead bioaccumulation to Chlorella Kesslerii*, Environmental Science and Technology, 37, 1114-1121, 2003.
 198. Xia L., Hu B., Jiang Z., Wu Y., Chen R., Li L., *Hollow fiber liquid phase microextraction combined with electrothermal vaporization ICP-MS for the*

- speciation of inorganic selenium in natural waters*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 21, 362-365, 2006.
199. Alpaydin S., Saf A.Ö., Bozkurt S., Sirit A., *Kinetic study on removal of toxic metal Cr(VI) through a bulk liquid membrane containing p-tert-butylcalix[4]arene derivative*, Desalination, 275, 166-171, 2011.
200. Güell R., Fontàs C., Salvadó V., Anticó E., *Modelling of liquid-liquid extraction and liquid membranes separation of arsenic species in environmental matrices*, Separation and Purification Technology, 72, 319-325, 2010.
201. Djane N., Ndung'u K., Johnsson C., Sartz H., Tornstrom T., Mathiasson L., *Chromium speciation in natural waters using serially connected supported liquid membranes*, Talanta, 48, 1121-1132, 1999.
202. Alguacil F.J., Coedo A.G., Dorado M.T., *Transport of chromium (VI) through a Cyanex 923-xylene flat-sheet supported liquid membrane*, Hydrometallurgy, 57, 51-56, 2001.
203. Alegret S., *Developments in solvent extraction*, Ellis Horwood Series in Analytical Chemistry, Chichester, UK, 1988.
204. Trtic-Petrovic T., Jönsson J.A., *Application of SLM extraction for investigation of metal-humic acid bindings*, Desalination, 148, 247-251, 2002.
205. Mulder M., *Basic principles of membrane technology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1996.
206. Canet L., Seta P., *Extraction and separation of metal cations in solution by supported liquid membrane using lasalocid A as carrier*, Pure and Applied Chemistry, 73, 2039-2046, 2001.
207. Tayeb R., Fontas C., Dhahbi M., Tingry M., Tingry S., Seta P., *Cd(II) transport across supported liquid membranes (SLM) and polymeric plasticized membranes (PPM) mediated by Lasalocid A*, Separation and Purification Technology, 42, 189-193, 2005.

208. García-Vargas M., Hernández M.P., Pérez-Bustamante J.A., *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, 1984.
209. Podyachev S.N., Burmakina N.E., Syakaev V.V., Sudakova S.N., Shagidullin R.R., Konovalov A.I., *Synthesis, IR and NMR characterization and ion exchange properties of tetranonylcalix[4]resorcinol bearing acetylhydrazone groups*, *Tetrahedron*, 65, 408-417, 2009.
210. Mendiguchía C., García-Vargas M., Moreno C., *Screening of dissolved heavy metals (Cu, Zn, Mn, Al, Cd, Ni, Pb) in seawater by a liquid-membrane-ICP-MS approach*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, 773-778, 2008.
211. Parhi P.K., Panigrahi S., Sarangi K., Nathsarma K.C., *Separation of cobalt and nickel from ammoniacal sulphate solution using Cyanex 272*, *Separation and Purification Technology*, 59, 310-317, 2008.
212. Reddy B.R., Priya D.N., Kumar J.R., *Solvent extraction of cadmium (II) from sulphate solutions using TOPS 99, PC 88A, Cyanex 272 and their mixtures*, *Hydrometallurgy*, 74, 277-283, 2004.
213. Pashkov G.L., Grigorieva N.A., Pavlenko N.I., Fleitlikh I.Y., Nikiforova L.K., Pleshkov M.A., *Nickel(II) extraction from sulphate media with bis(2,4,4-trimethylpentyl)dithiophosphinic acid dissolved in nonane*, *Solvent Extraction and Ion Exchange*, 26, 749-763, 2008.
214. Tanaka M., Huang Y., Yahagi T., Hossain M.K., Sato Y., Narita H., *Solvent extraction recovery of nickel from spent electroless nickel plating baths by a mixer-settler pextractor*, *Separation and Purification Technology*, 97-102, 2008.
215. Huang Y., Tanaka M., *Analysis of continuous solvent extraction of nickel from spent electroless nickel plating baths by a mixer-settler*, *Journal of Hazardous*

- Materials, 164, 1228-1235, 2009.
216. Sridhar V., Verma J.K., Kumar S.A., *Selective separation of copper and nickel by solvent extraction using LIX 984N*, Hydrometallurgy, 99, 124-126, 2009.
217. Parthasarathy N., Pelletier M., Buffle J., *Transport of lipophilic metal complexes through permeation liquid membrane, in relation to natural water analysis: Cu(II)-8-hydroxyquinoline complex as a model compound*, Journal of Membrane Science, 355, 78-84, 2010.
218. Farajzadeh M.A., Bahram M., Zorita S., Mehr B.G., *Optimization and application of homogeneous liquid-liquid extraction in preconcentration of copper (II) in a ternary solvent system*, Journal of Hazardous Materials, 161, 1535-1543, 2009.
219. Komjarova I., Blust R., *Comparison of liquid-liquid extraction, solid phase extraction and co-precipitation preconcentration methods for the determination of cadmium, copper, nickel, lead and zinc in seawater*, Analytica Chimica Acta, 576, 221-228, 2006.
220. Mackey D.J., O'Sullivan J.E., Watson R.J., Dal Pont G., *Interference effects in the extraction of trace metals from estuarine waters*, Marine Chemistry, 59, 113-126, 1997.
221. Kinrade J.D., Van Loon J.C., *Solvent extraction for use with flame atomic absorption spectrometry*, Analytical Chemistry, 46, 1894-1898, 1974.
222. Moore F.L., *Long chain amines versatile acid extractants*, Analytical Chemistry, 29, 1660-1662, 1957.
223. Xiaowei Z., Naizhong S., Qiong J., Weihong Z., *Studies on the sorption of cadmium(II), zinc(II), and copper(II) with PTFE selective resin containing primary amine N1923 and cyanex923*, Industrial and Engineering Chemistry Research, 50, 4625-4630, 2011.
224. Mortaheb H.R., Zolfaghari A., Mokhtarani B., Amini M.H., Mandanipour V.,

- Study on removal of cadmium by hybrid liquid membrane process*, Journal of Hazardous Materials, 177, 660-66, 2010.
225. Benguerel E., Demopoulos G.P., Harris G.B., *Speciation and separation of rhodium (III) from chloride solutions: a critical review*, Hydrometallurgy, 40, 135-152, 1996
226. Sayar N.A., Sayar A.A., Filiz M., *Simulation- and optimisation- oriented modelling considerations for the extraction of Ni(II) from its acidic aqueous chloride solutions into Alamine 336-m-xylene systems*, Hydrometallurgy, 95, 280-284, 2009.
227. Gupta B., Deep A., Malik P., *Extraction and recovery of cadmium using Cyanex 923*, Hydrometallurgy, 61, 65-71, 2001.
228. Alguacil F.J., Tayibi H., *Carrier-facilitated transport of Cd(II) from a high-salinity chloride medium across a supported liquid membrane containing Cyanex 923 in Solvesso 100*, Desalination, 180, 181-187, 2005.
229. Mishra R.K., Rout P.C., Sarangi K., Nathsarma K.C., *A comparative study on extraction of Fe(III) from chloride leach liquor using TBP, Cyanex 921 and Cyanex 923*, Hydrometallurgy, 104, 298-303, 2010.
230. Vajda M., Schollosser S., Kovacova K., *Pertraction of silver through bulk liquid membranes*, Chemical Papers, 54, 423-429, 2000.
231. López-López J.A., En: *Interacción atmósfera-hidrosfera: incidencia de los aportes atmosféricos y fluviales en la zona de influencia mareal del río Guadalquivir y estudio de la especiación química de contaminantes*, Tesis Doctoral, Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cádiz, Cádiz, cap. 3, 83-128, 2010.
232. Chitra K.R., Gaikwad A.G., Surender G.D., Damadaran A.D., *Studies on ion transport of some rare earth elements through solvating extractants immobilised on supported liquid membrane*, Journal of Membrane Science, 125, 257-268,

- 1997.
233. Campderrós M.E., Marchese J., *Facilitated transport of niobium (V) and tantalum (V) with supported liquid membrane using TBP as carrier*, Journal of Membrane Science, 164, 205-210, 2000.
234. Walkowiak W., Kozłowski C.A., *Macrocyclic carriers for separation of metal ions in liquid membrane processes – a review*, Desalination, 240, 186-197, 2009.
235. Ekberg C., Dubois I., Fermvik A., Retegan T., Skarnemark G., Drew M.G.B., Foreman M.R.S., Hudson M.J., *Extraction behaviour of nickel (II) using some of the BTBP-Class Ligands*, Solvent Extraction and Ion Exchange, 25, 603-617, 2007.
236. Venkateswaran P., Palanivelu K., *Studies on recovery of hexavalent chromium from plating wastewater by supported liquid membrane using tri-n-butylphosphate as carrier*, Hydrometallurgy, 78, 107-115, 2005.
237. Saji J., Reddy M.L.P., *Liquid-liquid extraction separation of iron (III) from titania wastes using TBP-MIBK mixed solvent system*, Hydrometallurgy 61, 81-87, 2001.
238. Cakir U., Cicek B., *Extraction-ability and –selectivity of tetra-aza-crown ethers for transition metal cations*, Transition Metal Chemistry, 29, 263-268, 2004.
239. Belkhouche N., Dide M.A., *Separation of nickel and copper by solvent extraction using di-2 ethylhexylphosphoric acid-based synergistic mixture*, Solvent Extraction and Ion Exchange, 23, 677-693, 2005.
240. Preston J., *Solvent extraction of cobalt and nickel by organophosphorus acids. I. Comparison of phosphoric, phosphonic and phosphonic acid systems*, Hydrometallurgy, 9, 115-133, 1982.
241. Rice N.M., Gibson R.W., *Solvent extraction with Cyanex 302 and 301 for the upgrading of chloride leach liquors from lateritic nickel ores*. En: Proceedings

- of the ISEC 96. Melbourne University Press, Australia, 1996.
242. Gasperov V., Gloe K., Lindoy L.F., Mahinay M.S., *Host-guest assembly of ligand systems for metal ion complexation. Synergistic solvent extraction of copper (II) and silver(I) by 1,4,8,11-tetrabenzyl-1,4,8,11-tetraazacyclodecane in combination with carboxylic acids*, Dalton Transactions, 22, 3829-3834, 2004.
243. Wojciechowski K., Buffle J., *The interaction of azacrown ether with fatty acid in nonpolar solvents and at the organic-aqueous interface*, Biosensors and Bioelectronics, 20, 1051-1059, 2004.
244. Guyon F., Parthasarathy N., Buffle J., *Permeation Liquid Membrane Metal Transport: Studies of Complex Stoichiometries and Reactions in Cu(II) Extraction with the Mixture 22DD-Laurate in Toluene/Phenylhexane*, Analytical Chemistry, 72, 1328-1333, 2000.
245. Andrade F., Elizalde M.P., *Synergistic extraction of Ni(II) by mixtures of LIX 860 and bis(2-ethylhexyl) phosphoric acid*, Solvent Extraction and Ion Exchange, 23, 85-99, 2005.
246. Zhang P., Yokoyama T., Suzuki T. M., Inoue K., *The synergistic extraction of nickel and cobalt with a mixture of di(2-ethylhexyl) phosphoric acid and 5-dodecylsalicylaldoxime*, Hydrometallurgy, 61, 223-227, 2001.

CAPÍTULO II

SELECCIÓN DE UN SISTEMA DE TRANSPORTE PARA LA SEPARACIÓN DE DISTINTAS FRACCIONES DE NÍQUEL EN AGUAS NATURALES

II.I. INTRODUCCIÓN

Como se ha comentado anteriormente, el análisis de níquel en las muestras de aguas naturales debe realizarse teniendo en cuenta que éste puede estar presente en diferentes formas químicas, ya que dependiendo de la forma en la que se encuentre puede actuar como un elemento esencial o tóxico para los organismos acuáticos [1]. Es por ello que el análisis del contenido total de la muestra no aporta toda la información necesaria para entender su biodisponibilidad en el ecosistema acuático a estudiar, siendo necesario un estudio más exhaustivo de la especiación metálica de la muestra.

El fácil manejo de la extracción líquido-líquido, junto a la gran variedad de agentes extractantes comerciales y no comerciales desarrollados para su aplicación en muestras acuosas, hace interesante su uso para elegir el sistema químico más adecuado para realizar el análisis tanto de contenidos totales de metales como de las distintas fracciones en aguas naturales. Es por ello que en este segundo capítulo se expone el trabajo previo de extracción líquido-líquido realizado para estudiar, por un lado la capacidad de distintos sistemas químicos para la extracción de las especies de níquel

presentes en aguas naturales, y por otro los efectos producidos por los principales ligandos presentes en este tipo de muestras. De este modo, se podrá realizar su posterior aplicación a sistemas de membranas líquidas, en los cuales, como se ha descrito en la introducción teórica, los procesos de extracción y reextracción se producen simultáneamente reduciendo la manipulación de la muestra.

El trabajo se ha enfocado a desarrollar dos sistemas extractantes diferentes para la determinación de níquel en aguas naturales, uno de ellos para determinar el contenido total de níquel, y otro para determinar las distintas especies presentes en las muestras.

De entre todos los agentes extractantes presentes en la bibliografía para su aplicación a la extracción de níquel en muestras acuosas se seleccionaron dos compuestos organofosforados comerciales, el ácido bis(2-etilhexil) fosfórico (DEHPA) y el tributilfosfato (TBP) y una bisaroihidrazona sintetizada, la 1,2-ciclohexanodiona bisbenzoilhidrazona (1,2-CHBBH) [2].

Las aplicaciones del ácido bis(2-etilhexil) fosfórico (DEHPA) a la extracción de níquel a través de sistemas de extracción líquido-líquido de muestras acuosas son muy numerosas [3,4], aunque en su mayoría están centradas en su aplicación para la recuperación y purificación en la industria metalúrgica [5-7].

Este reactivo, que presenta una apariencia aceitosa e incolora, es un extractante no selectivo cuya fórmula molecular se presenta en la figura II.1.

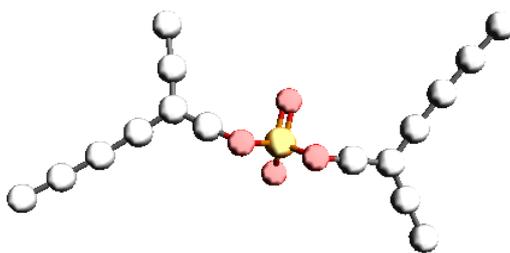


Figura II.1. Molécula del ácido bis (2-etilhexil) fosfórico (DEHPA). ◯ átomo de C, ● átomo de P, ● átomo de O.

Como se aprecia en la figura posee un grupo funcional fosforilo y otro hidroxilo que puede aceptar o ceder protones.

En la disolución orgánica dicho compuesto se encuentra como dímero, por lo que la reacción principal que tiene lugar durante la extracción del metal es la que se muestra a continuación:



donde AH representa al agente extractante y M al catión metálico [8]. Como se observa en la reacción, por cada mol de metal que reacciona con el extractante hay dos moles de protones que pasan a la disolución acuosa que podrían producir un cambio en el pH de la muestra. Al mismo tiempo, el propio carácter ácido del extractante puede contribuir a aumentar la concentración de protones en la muestra al disolverse en parte durante el tiempo de contacto con la misma. A consecuencia de ambos fenómenos, el pH resultante de la muestra cambiaría a valores más ácidos durante la extracción que podrían no ser los adecuados para que se produzca la misma. Esto podría facilitar por otro lado que se estuviera produciendo un fenómeno de reextracción hacia la fase acuosa de los iones metálicos que hubieran sido extraídos en la fase orgánica previamente. Es por ello que el estudio del efecto del pH durante la extracción y el uso de tampones apropiados para mantener los valores de pH adecuados serán aspectos fundamentales de este trabajo.

Por otro lado, uno de los principales inconvenientes que presenta este extractante es que no es selectivo y por tanto se puede producir la co-extracción de otros cationes durante el proceso de extracción. Este hecho fue observado anteriormente por Irigoyen y col. para un sistema de extracción de cadmio con DEHPA basado en el uso de membranas líquidas de volumen [9].

El segundo agente extractante que se ha utilizado es el tributilfosfato (TBP). Este reactivo, cuya estructura aparece en la figura II.2 es un agente extractante

solvatante orgánico con grupos donadores, como el grupo fosforilo (P=O), a través del cual forma un enlace de tipo covalente con el metal. El proceso de extracción se realiza a través de la co-extracción de un anión (Cl⁻, NO₃⁻, SCN⁻,...) que estabiliza la carga del catión a extraer formando con el TBP un complejo neutro que puede ser extraído a la fase orgánica. Así, a diferencia del reactivo anterior, no se produce un cambio en el pH de la disolución acuosa durante la extracción.

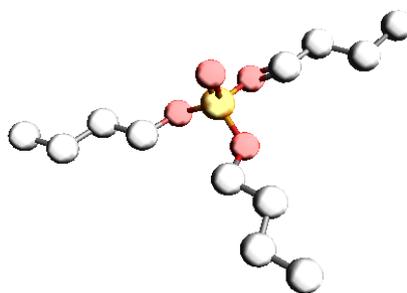


Figura II.2. Molécula del ácido tributilfosfato (TBP). ○ átomo de C, ● átomo de P, ● átomo de O.

En cuanto a la aplicación del TBP para la extracción de metales en aguas naturales los ejemplos son escasos, reduciéndose su aplicación para la recuperación de dicho metal en muestras ácidas procedentes de las refinerías [10,11]. En este trabajo se ha estudiado la aplicación de este reactivo para la extracción de níquel en muestras acuosas en las que el co-anión elegido ha sido el cloruro, debido a su presencia mayoritaria en muchas aguas naturales. De una manera general podemos escribir la reacción que tiene lugar durante la extracción de la siguiente manera [12]:



donde HR es el TBP, X es el contra-anión (Cl⁻, NO₃⁻, SCN⁻,...) y M el metal a extraer.

El último agente extractante utilizado es un reactivo orgánico no comercial que ha sido sintetizado y descrito como reactivo de aplicación en análisis espectrofotométricos de metales [2]. Este compuesto se encuentra dentro de la familia de las hidrazonas derivadas de las cetonas cíclicas, la 1,2-ciclohexanodiona bis-benzoil hidrazona (1,2-CHBBH). En la figura II.3 podemos ver que este reactivo orgánico presenta la agrupación básica ($>C=N-NH-$) descrita como perteneciente a los derivados imínicos. Este grupo presenta un protón que puede ser cedido durante el proceso de extracción del metal a la disolución cargada. Como consecuencia este reactivo podría modificar el pH de la muestra durante la extracción, siendo necesario el uso de disoluciones reguladoras.

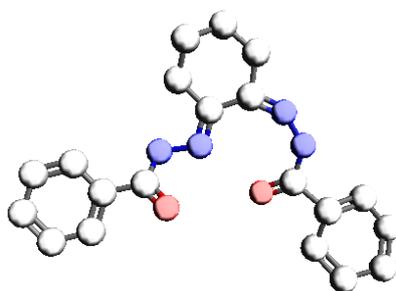
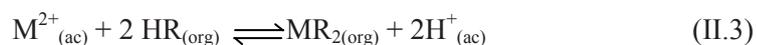


Figura II.3. Molécula del 1,2-ciclohexanodiona bis-benzoil hidrazona (1,2-CHBBH). ○ átomo de C, ● átomo de N, ● átomo de O.

La reacción que tiene lugar entre el 1,2-CHBBH con los metales divalentes en general puede describirse como sigue [13]:



donde HR representa al reactivo y M al metal. Los autores García-Vargas y col. estudiaron la reactividad del 1,2-CHBBH, observando que se formaban complejos metálicos con los siguientes iones: Fe(III), Fe(II), Ti(IV), Pd(II), V(V), Sb(III), W(VI),

Mo(VI), Cu(II) y Bi(III), siendo luego extraídos con cloroformo sólo los formados con Cu(II), Mo(VI), Bi(III) y Sb(III) [2]. Posteriormente este reactivo ha sido utilizado para la extracción de cobre en muestras reales en extracción líquido-líquido mediante un sistema de membranas líquidas [13].

Como se ha explicado anteriormente, el DEHPA y el 1,2-CHBBH son extractantes ácidos y como tales van a producir un paso de protones a las muestras acuosas durante el proceso de extracción. Ello supone que el pH de la muestra será una de las variables más importantes a controlar especialmente para el desarrollo del sistema para la especiación de níquel, ya que si éste varía también lo harán las distintas especies presentes en la muestra. De este modo, es necesario el uso de disoluciones tampón para que las condiciones naturales de las muestras reales no se vean afectadas. Sin embargo, en el caso del TBP, al ser un reactivo solvatante, no modificará el pH de la muestra durante la extracción. Sin embargo el estudio del pH de la muestra es igualmente necesario, ya que si se quiere aplicar el sistema a la especiación de níquel en aguas naturales es preciso que la extracción se produzca en el rango de pH propio de estas muestras.

Una vez establecidos los dos sistemas químicos más adecuados se procedió a estudiar el efecto de los parámetros más influyentes en la extracción de níquel, como es el tipo de disolvente utilizado en la disolución orgánica, la concentración de reactivo en la misma y la concentración de ácido nítrico en la disolución de re-extracción. Por último, con el objeto de ver si el sistema es capaz de diferenciar entre las distintas especies de níquel presentes en las muestras se realizó un estudio del efecto de los ligandos mayoritarios presentes en aguas naturales, eligiendo para ello los ácidos húmicos como representación de los ligandos orgánicos y los cloruros como ejemplo de inorgánicos. Los resultados obtenidos se compararon con las concentraciones de las distintas especies formadas en las muestras acuosas en el equilibrio obtenidas teóricamente con el programa WinHumic V.

II.II. DESARROLLO EXPERIMENTAL

A continuación se describe detalladamente cómo se han realizado los experimentos necesarios para establecer qué sistema era más adecuado para la extracción de las concentraciones totales de níquel y cuál lo era para su especiación. Todas las disoluciones y reactivos utilizados para estos experimentos aparecen recogidos en el Anexo A.1.

Selección del agente extractante

DEHPA como agente extractante

En este caso se utilizó como disolución orgánica DEHPA disuelto en keroseno, ya que esta disolución ha sido utilizada anteriormente con eficacia en otro tipo de estudios de extracción de metales [8].

En primer lugar se realizaron experimentos de extracción de níquel para verificar su aplicabilidad a estudios de concentraciones totales o para diferenciar entre las distintas especies de níquel. Para ello, se realizó un estudio de pH en un amplio rango, desde pH 1 a 9, con una relación de volúmenes orgánica:acuosa de 1:1. Como primera aproximación al sistema la disolución cargada que se utilizó contenía una concentración de $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de níquel y $35 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de NaCl y la disolución orgánica 0,05 M de DEHPA disuelto en keroseno, que nos aporta una relación molar DEHPA:Ni de 2940. En teoría, ésta relación debería dar un exceso de reactivo suficiente para que se produzca una extracción completa del metal. Además para mantener el pH durante la extracción en el intervalo óptimo de trabajo, se utilizó el tampón acético/acetato en una concentración final de 0,1 M en la disolución acuosa.

Para estudiar la viabilidad de este extractante para la diferenciación de las distintas especies de níquel al pH propio de las aguas naturales se utilizaron otras disoluciones reguladoras como el ácido 4-(2-hidroxietil)piperacina-1-etanosulfónico

(HEPES), cuyo rango de pH es de 7,2 a 7,8 y el 2-(N-morfolino)etano monohidrato de ácido sulfónico (MES), cuyo rango de pH es de 5,5 a 6,7. El pH de las disoluciones acuosas se ajustó con ayuda de distintas disoluciones de hidróxido sódico y ácido clorhídrico y fue controlado midiéndolo antes y después de la extracción. El tiempo de extracción utilizado para estas pruebas fue de 30 minutos, dejando unos minutos al finalizar la extracción para que se separen las fases y poder retirar la disolución orgánica superior.

TBP como agente extractante

Del mismo modo que para el reactivo anterior, se realizó una búsqueda bibliográfica de los disolventes orgánicos más recomendables para disolver este reactivo, encontrando al keroseno como el disolvente más adecuado [12].

En este caso al ser un extractante solvatante y realizar la extracción de níquel a través de la formación de un complejo neutro no se van a producir cambios de pH de la disolución acuosa, por lo que no se utilizaron disoluciones tampón para regular el pH. Sin embargo, el pH de la disolución acuosa fue controlado, al igual que en el caso anterior, antes y después de realizar la extracción del metal. Las condiciones químicas utilizadas en este caso fueron las mismas que para el DEHPA, con el mismo rango de pH, relación de volúmenes y concentración de reactivos en la disolución acuosa, aunque en este caso no se adicionó tampón. La concentración de TBP utilizada fue de 0,05 M disuelto en keroseno. De este modo, al igual que para el caso anterior, la relación molar TBP:Ni que se obtenía era de 2940, lo que aseguraba un exceso de reactivo durante el proceso de extracción.

1,2-CHBBH como agente extractante

En primer lugar se sintetizó este extractante no comercial, siguiendo los pasos descritos en la bibliografía por García-Vargas y col. [2], que aparecen en el Anexo A.2. Como podemos comprobar en la figura II.4 en dicha síntesis se hace reaccionar un mol de la cetona cíclica, en este caso la 1,2-ciclohexanodiona con 2 moles de la bisbenzoil-hidracida.

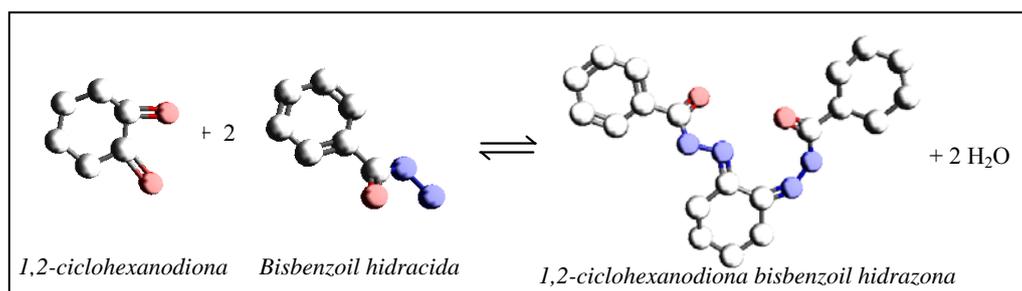


Figura II.4. Reacción de síntesis de la 1,2-ciclohexanodiona bis-benzoil hidrazona (CHBBH). ○ átomo de C, ● átomo de N, ● átomo de O.

Una vez sintetizado el reactivo no comercial, se realizó un estudio de solubilidad del mismo en diferentes disolventes, para asegurar la estabilidad del reactivo en la fase orgánica. La concentración de reactivo utilizada para ver su solubilidad se mantuvo en el rango de 0,5 a 7 mmol·l⁻¹. Los disolventes que se probaron fueron: tolueno, dodecano, hexano, keroseno, dihexileter y octanol. El estudio se realizó disolviendo la cantidad necesaria del reactivo con un modificador de matriz para mejorar su solubilidad en la disolución orgánica. Los modificadores de matriz utilizados fueron: acetona, metanol, etanol, dimetilformamida, dodecanol, hexanol, tributilfosfato y propanol. Una vez disuelto se estudió la estabilidad de la disolución con el paso del tiempo, para así poder ver por cuantos días era estable la disolución a utilizar en los siguientes estudios.

Los experimentos de extracción líquido-líquido se realizaron de la misma forma que en los anteriores estudios. Las muestras acuosas se prepararon con $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de níquel, $35 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl y la disolución reguladora utilizada fue HEPES a una concentración final en la muestra de 0,25 M, siendo el rango de pH estudiado en este caso entre 6 y 9. Al igual que en el caso de las extracciones realizadas con el agente extractante DEHPA se midieron los valores de pH antes y después de las extracciones, para asegurar que el pH del medio no ha sido modificado y por consiguiente las especies en la muestra permanecen invariables. La concentración de reactivo utilizada en la disolución orgánica fue de 3 mM para garantizar el exceso de agente extractante en la disolución orgánica. Con este exceso de reactivo se obtiene una ratio molar de aproximadamente 176 (CHBBH:Ni).

Extracción y reextracción líquido-líquido

Las extracciones se realizaron usando tubos de vidrio en los que se añadieron 5 mililitros de la muestra acuosa de $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de níquel en el rango de pH estudiado en cada caso y 5 mililitros de la disolución orgánica preparada como se explicó anteriormente para cada extractante utilizado. Una vez que las disoluciones están en los tubos éstos se cierran herméticamente y se colocan en un agitador como el que se muestra en la figura II.5, donde se mantienen durante 30 minutos con una agitación constante.

Finalizada la agitación, se dejan en reposo los tubos para que se separen bien las dos fases. Una vez que la separación se ha producido, se elimina la fase orgánica de cada tubo, siendo la fase acuosa almacenada hasta su análisis por espectroscopía de absorción atómica con llama (F-AAS) mediante el equipo que se muestra en la figura II.6.



Figura II.5. Agitador de tubos utilizado para los procesos de extracción y reextracción.

Antes de proceder a la determinación de níquel en las muestras acuosas se comprobó el pH de las mismas, ya que durante la extracción con los agentes extractantes ácidos se ha podido producir un transporte de protones de la fase orgánica a la acuosa, tal y como se ha explicado anteriormente al describir los sistemas en estudio.

Para calcular el porcentaje de extracción (E) se midió la concentración de níquel antes y después de la extracción y se aplicó la ecuación II.4.

$$E(\%) = \frac{[Ni]_i - [Ni]_f}{[Ni]_i} \cdot 100 \quad (\text{II.4})$$

donde $[Ni]_i$ representa a la concentración inicial de níquel presente en la muestra y $[Ni]_f$ es la concentración medida en la muestra al finalizar la extracción.



Figura II.6. Espectrómetro de absorción atómica utilizado para medir la fase acuosa.

Posteriormente, se realizó un estudio de la concentración de extractante en la disolución orgánica para cada extractante bajo las condiciones optimizadas anteriormente de pH, concentración de tampón y solubilidad de la disolución orgánica. Estas concentraciones de reactivo estuvieron en un rango entre 25 y 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ de DEHPA disuelto en keroseno y entre 1 y 7 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ de 1,2-CHBBH disuelto en tolueno con un 2% de DMF.

Una vez seleccionadas las variables óptimas de extracción para cada sistema se realizaron los experimentos de reextracción del metal desde la fase orgánica una vez cargada, utilizando distintas concentraciones de ácido nítrico. Para ello, tras el proceso de extracción se tomó la disolución orgánica y se puso en contacto con el mismo volumen de disolución ácida. Tras la extracción se midió la concentración de níquel en la disolución acuosa y se obtuvo el porcentaje de níquel transportado. Calculado con la ecuación II.5.

$$R(\%) = \frac{[Ni]_r}{[Ni]_e} \cdot 100 \quad (\text{II.5})$$

donde $[Ni]_r$ es la medida en la disolución acuosa después de la extracción y la $[Ni]_e$ es la concentración presente inicialmente en la disolución orgánica. Por último se determinó la influencia de la concentración de ácido nítrico en la disolución reextractante en un rango de 0,1 a 1 mol·l⁻¹ para los extractantes estudiados.

Efecto de los ligandos mayoritarios presentes en aguas naturales

Una vez seleccionadas las condiciones óptimas de extracción se procedió a estudiar el efecto de los principales ligandos tanto inorgánicos como orgánicos presentes en aguas naturales. Como ejemplo de ligando inorgánico se utilizó el cloruro, debido a su importancia en las aguas marinas [14]. Por otro lado, como representante de los ligandos orgánicos se seleccionaron los ácidos húmicos (AH). Los intervalos de concentración utilizados para estos ligandos fueron de 5-25 g·l⁻¹ de Cl⁻ y de 15-100 mg·l⁻¹ de AH, cubriendo así los niveles naturales más frecuentes.

Para cada concentración de ligando se realizó una extracción en las condiciones óptimas y se calculó el porcentaje de extracción con la ecuación II.4. En el caso de los ligandos orgánicos se repitieron las extracciones después de eliminar la materia orgánica de las muestras mediante oxidación en un digestor de radiación UV siguiendo el procedimiento descrito en el anexo A.3. De este modo podría establecerse los efectos producidos por los complejos orgánicos.

Por último se calcularon las concentraciones teóricas de las distintas especies de níquel en presencia de los ligandos orgánicos e inorgánicos mediante el programa WinHumic V, que utiliza el modelo V desarrollado por Edward Tipping en los años 90 [15]. Estos datos teóricos se compararon con los resultados experimentales obtenidos mediante los procesos de extracción.

II.III. RESULTADOS

En este apartado se recogen los resultados obtenidos a partir de los experimentos descritos en el desarrollo experimental.

Selección del agente extractante

A continuación se presentan los resultados obtenidos para cada uno de los extractantes utilizados en las condiciones estudiadas con el objeto de obtener dos sistemas químicos para la determinación de níquel en aguas naturales, uno para la concentración total y otro para poder diferenciar entre las distintas especies formadas de níquel.

DEHPA como agente extractante

Como se ha comentado, en primer lugar se estudió el porcentaje de extracción obtenido para un rango de pH entre 1 y 9 en muestras salinas tamponadas con una disolución de acético/acetato.

Los resultados obtenidos para el primer estudio realizado con este reactivo son los que aparecen en la figura II.7, en la que se han representado los valores de porcentaje de extracción de níquel obtenidos para los distintos pH estudiados. Las barras de error se corresponden con la desviación estándar de dos réplicas distintas del mismo experimento.

Como puede observarse en la figura, la extracción fue prácticamente cuantitativa para valores de pH superiores a 5. Sin embargo, al comprobar el pH de las muestras después de las extracciones se observó una disminución de pH hasta un valor de 4,5-5 para valores superiores a 5, como puede observarse en la figura II.8, donde ΔpH representa la diferencia entre el valor del pH final e inicial. Es por ello que estos

resultados no permiten establecer cuál es el comportamiento del reactivo para los valores de pH superiores a 5.

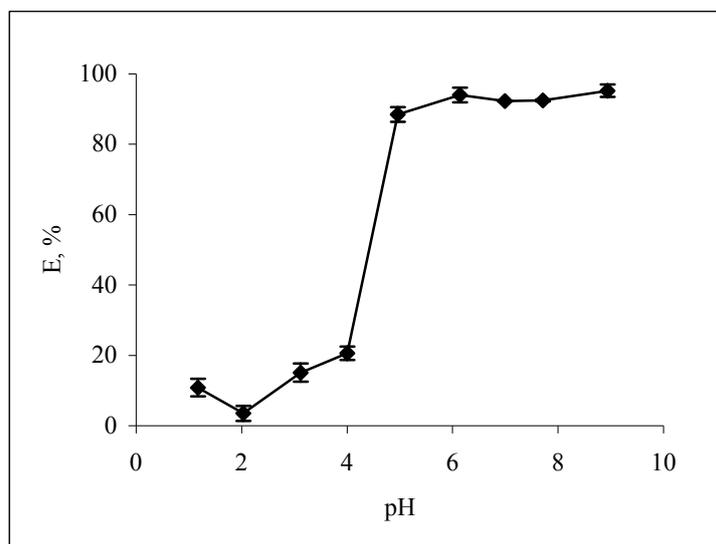


Figura II.7. Variación del porcentaje de extracción de níquel frente al pH de la disolución acuosa. Disolución acuosa: $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Ni; $0,1 \text{ M}$ Ac/AcH; $35 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; Disolución orgánica: $0,05 \text{ M}$ de DEHPA en keroseno.

Sin embargo los resultados de la figura II.7 indican que el pH adecuado para obtener una extracción completa del níquel presente en la muestra con este reactivo es cercano a 5, como se ha visto en otros trabajos realizados con DEHPA [3,4,16].

Estos resultados hacen patente el notable contra transporte de protones que se produce hacia la muestra, por lo que es necesario el estudio de otros tampones más adecuados para realizar la extracción de níquel a estos valores de pH de 6 a 9. De este modo, podemos ver si este reactivo es adecuado o no para realizar estudios de especiación de níquel en muestras de aguas naturales.

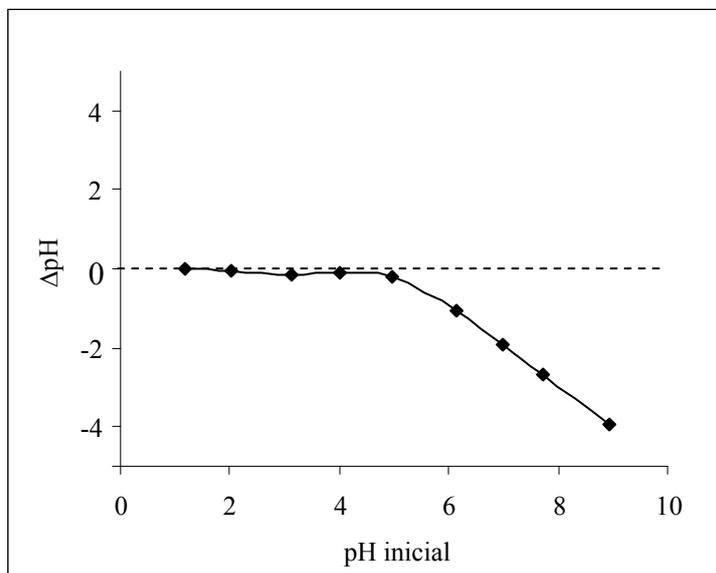


Figura II.8. Variación de pH observada durante el proceso de extracción para distintos pH iniciales de las muestras. Disolución acuosa: $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Ni; $0,1 \text{ M}$ Ac/AcH; $35 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de NaCl; Disolución orgánica: $0,05 \text{ M}$ de DEHPA en keroseno.

Para evaluar el funcionamiento del sistema para pH entre 6-9 se probó a tamponar la muestra con los tampones MES (5,5-6,7) y HEPES (7,2-7,8), manteniendo las mismas condiciones que en el estudio anterior.

En primer lugar se estudió el porcentaje de extracción para muestras tamponadas con MES mostrándose los resultados en la figura II.9.

Como se observa en la figura, la extracción de níquel fue completa independientemente del pH de la muestra. Sin embargo, al controlar los valores de pH en las muestras después de las extracciones se pudo observar el mismo efecto que cuando se utilizó el tampón acético-acetato. Es decir, los valores de pH sufren una disminución hasta un valor de 5,5, dándose una extracción completa al ser este el valor óptimo de pH para la extracción de níquel con DEHPA.

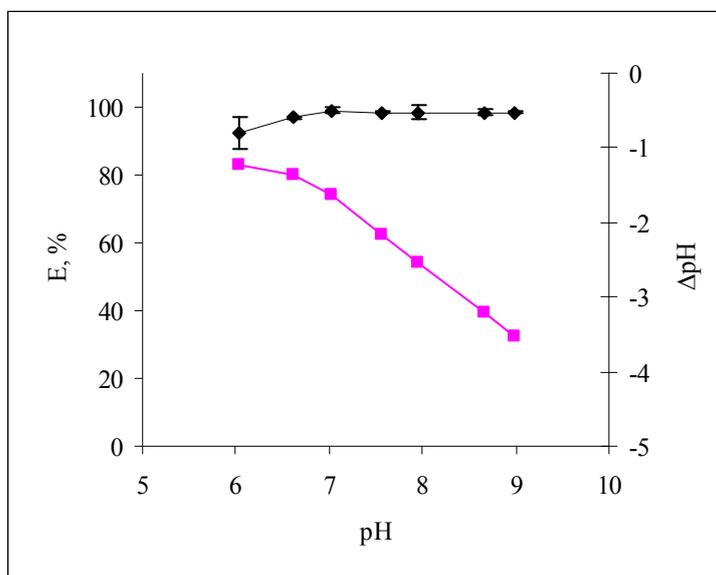


Figura II.9. ◆ Variación del porcentaje de extracción de níquel frente a pH de la muestra tamponada con MES. ■ Variación de pH producido durante el proceso de extracción de níquel. Disolución acuosa: $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Ni; $35\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; $0,01 \text{ M}$ MES; Disolución orgánica: $0,05 \text{ M}$ de DEHPA en keroseno.

Posteriormente, se utilizó HEPES para tamponar las muestras con un rango de pH óptimo más adecuado para los valores que se quieren estudiar. Se probaron tres concentraciones de HEPES para preparar las muestras: $0,01 \text{ M}$, $0,1 \text{ M}$ y $0,25 \text{ M}$, siendo esta última concentración de HEPES la que mejor controlaba el pH, como puede comprobarse en la tabla II.1.

En la figura II.10 se muestran los resultados obtenidos de porcentaje de extracción cuando la muestra se tampona con HEPES hasta una concentración final de $0,25 \text{ M}$, pudiendo observar una disminución drástica del porcentaje de extracción a partir de valores de pH mayores a 6 sin que exista alteración del pH inicial de la muestra tras la extracción.

pH _{inicial}	0,01M HEPES	0,1M HEPES	0,25M HEPES
	Δ pH	Δ pH	Δ pH
5,9	-2,1	-1,1	-0,9
6,6	-2,3	-1,1	-1,1
7,1	-2,3	-1,3	-0,3
7,6	-2,2	-0,7	-0,3
8,0	-2,5	-0,7	-0,3
9,0	-3,2	-1,3	-0,7

Tabla II.1. Variación de pH observado durante el proceso de extracción de níquel para las distintas concentraciones de tampón HEPES utilizadas. Disolución acuosa: $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Ni; $35 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; Disolución orgánica: 0,05 M de DEHPA en keroseno

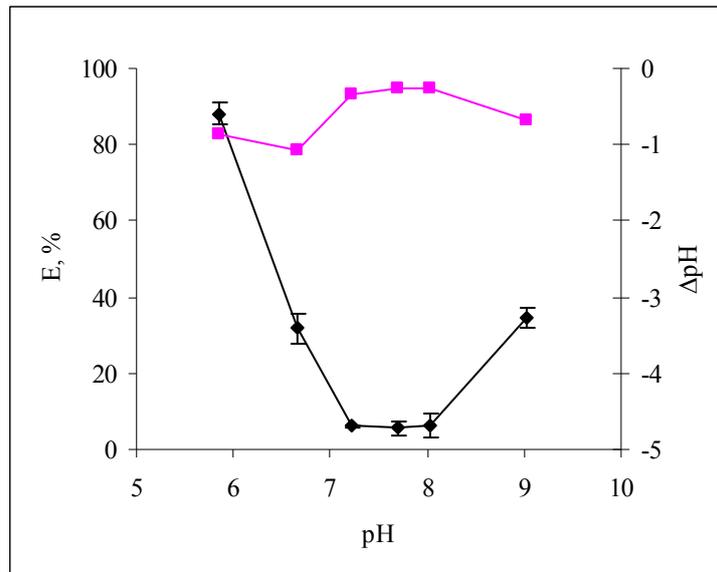


Figura II.10. ♦ Variación del porcentaje de extracción de níquel frente al pH para muestras tamponadas con HEPES. ■ Variación de pH producido durante el proceso de extracción de níquel. Disolución acuosa: $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Ni; $35 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; 0,25 M HEPES; Disolución orgánica: 0,05 M de DEHPA en keroseno.

El aumento observado a pH 9 puede ser debido a la precipitación del metal en forma de hidróxidos, que no son cuantificados al realizar la medida con el equipo de absorción atómica por llama. Esto puede ser explicado por la forma en la que se mide la muestra, debido a que al finalizar la extracción estos precipitados han podido quedar en la interfase formada acuosa:orgánica habiendo sido retirados de la muestra al eliminar la fase orgánica y por tanto no se cuantifica ese níquel en la medida de la concentración final resultando en una aparente extracción del metal.

Los resultados obtenidos nos indican que la extracción con DEHPA no puede ser usada a pH próximos al de las aguas naturales y por tanto no podría ser aplicado el sistema para la separación de fracciones lábiles. Sin embargo, como se ha visto en ocasiones anteriores, es posible su uso para cuantificar contenidos totales de níquel una vez que se ajuste el pH en un rango de 4,5-5,5 [4].

TBP como agente extractante

Una vez establecida la aplicación de DEHPA para extraer níquel total se intentó encontrar un extractante que no modificara el pH de las muestras y pudiera utilizarse en estudios de especiación. Para ello, se probó en primer lugar el uso de un agente solvatante, el TBP. Los experimentos se realizaron con una concentración de cloruro sódico en las muestras sin tamponar de 35 g·l⁻¹, actuando así el cloruro como especie co-extraída. La concentración utilizada de TBP fue de 0,05 M disuelto en keroseno. En la figura II.11 se observan los porcentajes de extracción obtenidos para distintos pH.

Aunque durante la extracción no se modificó el pH de las muestras, el níquel transportado a la disolución acuosa fue insignificante. Este fenómeno fue observado por Pospiech y col. al estudiar el comportamiento frente a la extracción de varios metales en medio ácido clorurado con TBP disuelto en keroseno, encontrando que el Fe(III) fue el metal mayoritariamente extraído con un 99% de extracción, seguido de

Mn(II), Ni(II), Cu(II) y Co(II) con un 11,2; 5,63; 4,1 y 8,7%, respectivamente [17]. Esto puede ser explicado debido a que bajo las condiciones de estudio el Fe(III) forma varios cloro-complejos, como FeCl_2^- , FeCl_2^+ , FeCl_3 , que podrían ser extraídos por el TBP, mientras que el níquel sólo forma un complejo catiónico con cloro (NiCl^+) más débil [18]. En vistas de que el TBP no podía tampoco aplicarse a la extracción de Ni al pH de las aguas naturales, como alternativa se probó como agente extractante un reactivo no comercial, el 1,2-ciclohexano bisbenzoilhidrazona (1,2-CHBBH), que ya había demostrado anteriormente su capacidad para la extracción de metales en disoluciones acuosas [2].

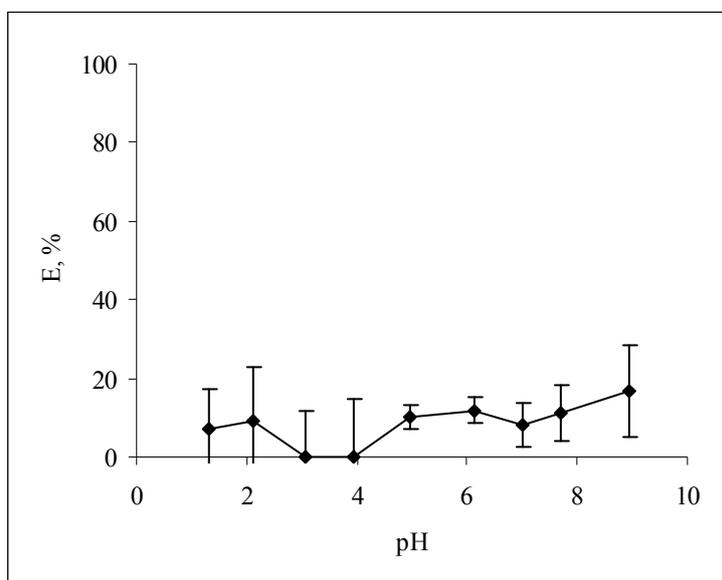


Figura II.11. Variación del porcentaje de extracción de níquel frente a pH. Disolución acuosa: $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Ni; $35 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de NaCl; Disolución orgánica: 0,05 M de TBP en keroseno.

1,2-CHBBH como agente extractante

En primer lugar se realizó la síntesis del reactivo siguiendo los pasos descritos en el Anexo A.2. Posteriormente, se preparó una disolución $1,15 \cdot 10^{-4}$ M del reactivo sintetizado en una disolución acuoetanólica al 4% de etanol y pH =12,41. Se realizó el espectro UV-VIS de dicha disolución, que aparece en la figura II.12, y se comparó con el descrito anteriormente para dicho reactivo en las mismas condiciones [2].

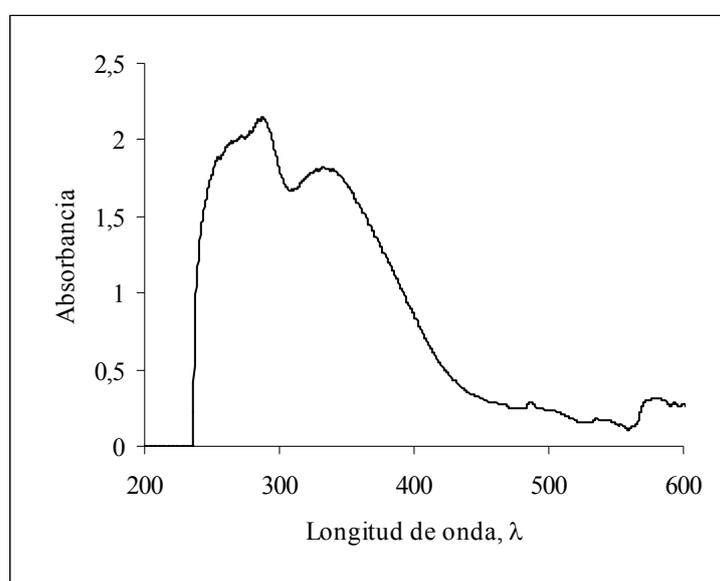


Figura II.12. Espectro UV-VIS de una disolución $1,15 \cdot 10^{-4}$ M de 1,2-CHBBH en medio acuoetanólico al 4% de etanol y pH =12,41.

Como se observa en la figura II.12 el espectro coincidió con el descrito anteriormente, presentando dos picos, uno a 289 nm y otro a 335 nm.

Una vez comprobada la validez de la síntesis se realizaron distintas pruebas de solubilidad del reactivo en varios disolventes orgánicos

Pruebas de solubilidad

Los resultados de las pruebas de solubilidad del reactivo en los disolventes estudiados se recogen en la tabla II.2.

Disolvente	Modificador de matriz	% modificador de matriz	Concentración máxima de reactivo disuelta	Estabilidad disolución orgánica
Tolueno	Acetona	20	No se disuelve	
	Metanol	5	2 mM	Presenta turbidez
	Etanol	5	4 mM	A los dos días precipita
	Dimetilformamida	1	2 mM	Al día siguiente precipita
		2	7 mM	Estable una semana
Dodecano	Dodecanol	10	No se disuelve	-
Octanol	-	-	No se disuelve	-
Hexano	Hexanol	7	0,4 mM	Al día siguiente precipita
Keroseno	Tributilfosfato	50	4 mM	Estable una semana
Keroseno: Tolueno (1:3)	Dimetilformamida	2	2 mM	Al día siguiente precipita
Octanol	Propanol	10	0,5 mM	Al día siguiente precipita

Tabla II.2. Pruebas de solubilidad realizadas para el reactivo 1,2-CHBBH.

Como se observa en la tabla en todos los casos fue necesario el uso de un modificador de matriz para poder disolver el reactivo y garantizar la estabilidad del mismo en la disolución orgánica. No obstante se intentó que la cantidad de modificador fuera la menor posible para evitar su disolución en la fase acuosa durante las extracciones, especialmente con aquellos con mayor solubilidad como la DMF, acetona, etanol, etc.

De los distintos disolventes que se probaron dos de ellos, octanol y dodecano, no consiguieron disolver al reactivo, al igual que la mezcla tolueno:acetona al 20% que ni siquiera podía disolver concentraciones tan bajas como 0,5 mM. Del resto de pruebas realizadas muchas disoluciones fueron inestables apareciendo precipitados al cabo de 24 horas, como la mezcla hexano:hexanol al 7%, keroseno:tolueno (1:3) con DMF al 2%, octanol con propanol al 10% y tolueno con DMF al 1%.

Las disoluciones que presentaron mejor estabilidad y solubilidad del reactivo en la disolución fueron las preparadas en tolueno al 2% DMF y keroseno al 50% de TBP. Sin embargo, ésta última precisa una cantidad de modificador de matriz muy elevada y podría darse la formación de moléculas asociadas entre el TBP y el 1,2-CHBBH que disminuyan la efectividad de la extracción del metal. Este hecho fue observado anteriormente por Gajda y col. en la extracción de níquel y cobalto con mezcla de DEHPA/TBP cuando utilizaban cantidades elevadas de TBP, probablemente debido a que el par de electrones libres del átomo de oxígeno de la molécula de TBP forma un puente de hidrógeno con el grupo hidroxilo de la molécula del DEHPA [19]. En nuestro caso el puente de hidrógeno podría producirse con el grupo amino (-NH-) presente en la molécula del 1,2-CHBBH, por este motivo se eligió el tolueno al 2% de DMF como disolvente más adecuado para el 1,2-CHBBH.

Pruebas de extracción

Al igual que con el DEHPA y el TBP se realizaron pruebas de extracción con el 1,2-CHBBH con muestras salinas tamponadas con HEPES en el rango 5-9, ya que se trataba de buscar la aplicación del reactivo al pH de las aguas naturales para estudios de especiación puesto que el sistema Ni-DEHPA funcionaba para la extracción de los contenidos totales. Los resultados obtenidos se muestran en la figura II.13, en la que se observan porcentajes de extracción bajos para valores de pH cercanos a 6, aumentando

los mismos conforme aumenta el pH de la muestra hasta conseguir el 100% de extracción a partir de un pH de 7.

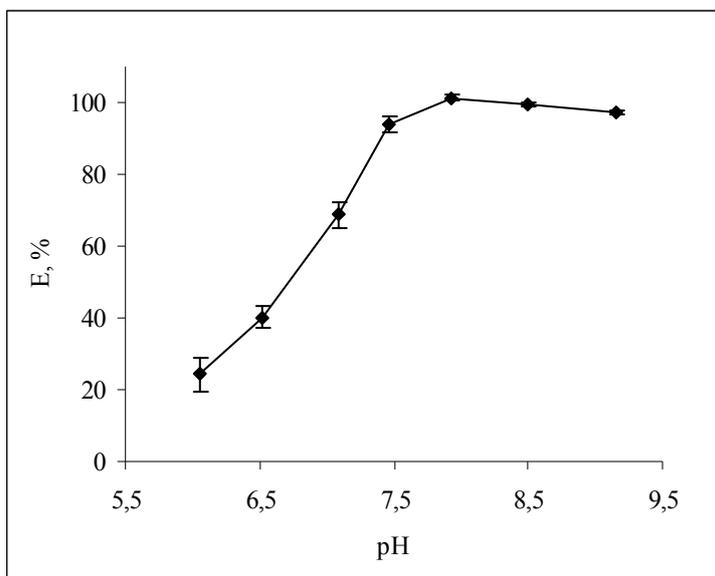


Figura II.13. Variación del porcentaje de extracción de níquel frente a pH. Disolución acuosa: $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Ni, $0,25 \text{ M}$ de HEPES; $35\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de NaCl; disolución orgánica: 3 mM de CHBBH en tolueno (2% DMF).

Al medir el pH después de la extracción se comprobó que no se producían cambios en el mismo durante el proceso de extracción. Este hecho implica que el sistema de extracción basado en el 1,2-CHBBH como agente extractante permite el transporte de níquel en muestras a pH natural, pudiendo por tanto ser aplicado en estudios de especiación.

A la vista de los resultados obtenidos en los estudios previos de extracción se decidió estudiar el efecto de los distintos parámetros más influyentes en la extracción para los sistemas Ni-DEHPA y Ni-CHBBH pensando en su aplicación para la determinación de contenidos totales de níquel y de distintas especies de dicho metal, respectivamente.

Estudio de los sistemas de extracción Ni-DEHPA y Ni-CHBBH

Una vez seleccionados los sistemas de extracción se estudió el efecto de los parámetros químicos de extracción, así como para el caso del sistema Ni-CHBBH la influencia de los ligandos orgánicos e inorgánicos mayoritariamente presentes en las aguas naturales.

Efecto de los parámetros químicos en la extracción

Después de realizar el estudio de la viabilidad de los sistemas químicos y habiendo establecido el valor de pH óptimo de cada sistema, se analizó el efecto de la concentración de reactivo en la disolución orgánica y la concentración de ácido en la disolución de reextracción para cada uno de ellos.

Sistema de extracción Ni-DEHPA

En primer lugar se estudió el efecto de la concentración de DEHPA (25 a 100 mM) en la extracción, mostrándose los resultados obtenidos en la figura II.14.

Como se observa en la figura, el porcentaje de extracción aumenta rápidamente con el aumento de la concentración de DEHPA, siendo prácticamente del 100% a partir de una concentración de 0,05 M del extractante. De hecho, Belkhouche y col. encontraron que con una concentración de este reactivo tan baja como 0,006 M, utilizando como disolvente n-heptano, ya obtenían una extracción de Ni(II) de un 83% para pH 6 y de un 94% para pH 4 [4]. Por tanto los siguientes experimentos se realizaron utilizando una concentración de DEHPA de 0,05M.

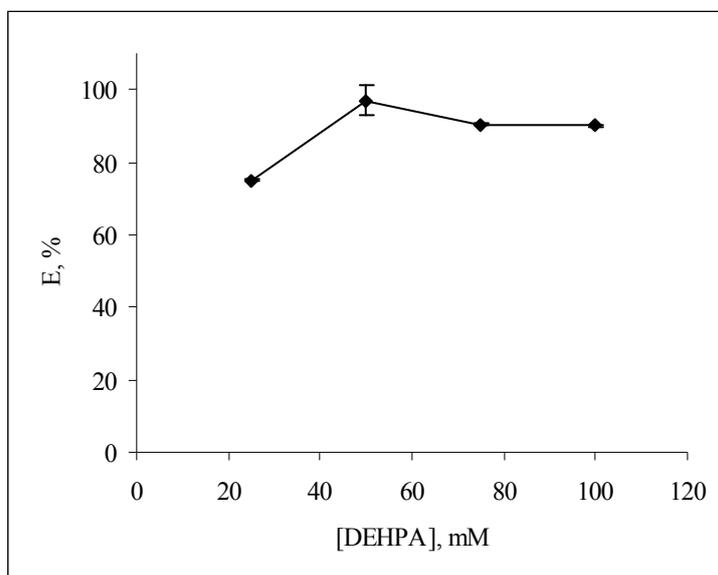


Figura II.14. Efecto de la concentración de DEHPA en la extracción de níquel en el sistema Ni-DEHPA. Disolución acuosa: $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Ni; $0,1 \text{ M}$ de Ac^-/AcH ; pH 5; Disolución orgánica: DEHPA disuelto en keroseno.

En segundo lugar se estudió la reextracción del metal desde la fase orgánica en la que se había extraído el níquel previamente utilizando distintas concentraciones de ácido nítrico ($0,05$ a 1M). Los resultados obtenidos se muestran en la figura II.15, pudiendo observar que se extrajo todo el níquel contenido en la fase orgánica independientemente de la concentración de ácido utilizada.

Por ello, una concentración de ácido de $0,05 \text{ M}$ fue suficiente para obtener la reextracción completa del metal.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos podemos resumir las condiciones de extracción del sistema Ni-DEHPA para su uso en la determinación de contenidos totales en aguas naturales en la tabla II.3.

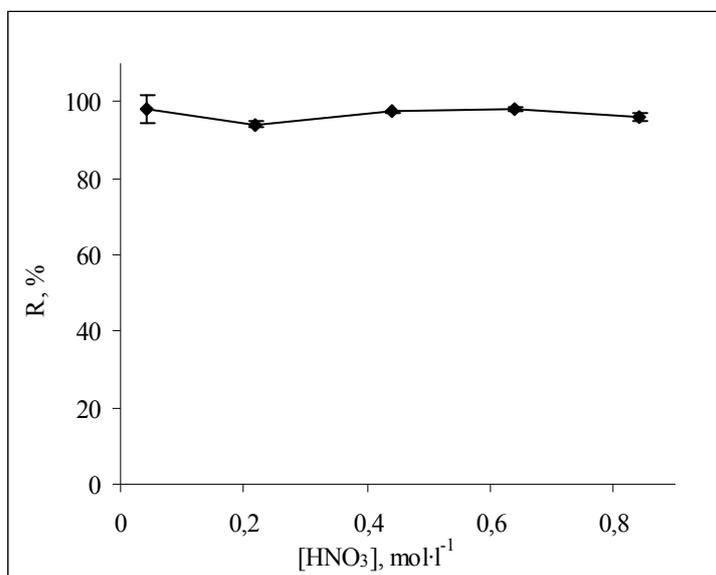


Figura II.15. Efecto de la concentración de ácido nítrico en la reextracción de Ni en el sistema Ni-DEHPA. Disolución acuosa: 1 mg·l⁻¹ Ni; 35g·l⁻¹ de NaCl; 0,1 M Ac/AcH; pH 5; Disolución orgánica: 0,05 M de DEHPA en keroseno.

Disolución acuosa (muestra)	pH = 5 [Ac ⁻ /AcH] = 0,1 M
Disolución orgánica	[DEHPA] = 50 mM disuelto en keroseno
Disolución de reextracción	[HNO ₃] = 0,05 M

Tabla II.3. Condiciones de extracción del sistema Ni-DEHPA para la determinación de contenidos totales de níquel en aguas naturales.

Posteriormente, se trató de trasladar el sistema de extracción estudiado a un sistema de membranas líquidas que permita la extracción y reextracción de níquel de manera simultánea. Al existir un sistema para la determinación de la concentración total de níquel en muestras de aguas de mar utilizando membranas líquidas de volumen

con DEHPA [20], se pasó directamente este sistema químico a un sistema de membranas líquidas soportadas con capilares de fibra hueca.

Sistema de extracción Ni-CHBBH

Al igual que en el sistema Ni-DEHPA se estudió en primer lugar el efecto de la concentración del extractante 1,2-CHBBH (1 a 7 mM) en la extracción. Como se puede comprobar en la figura II.16 se obtuvo una extracción cuantitativa del metal para todas las concentraciones estudiadas.

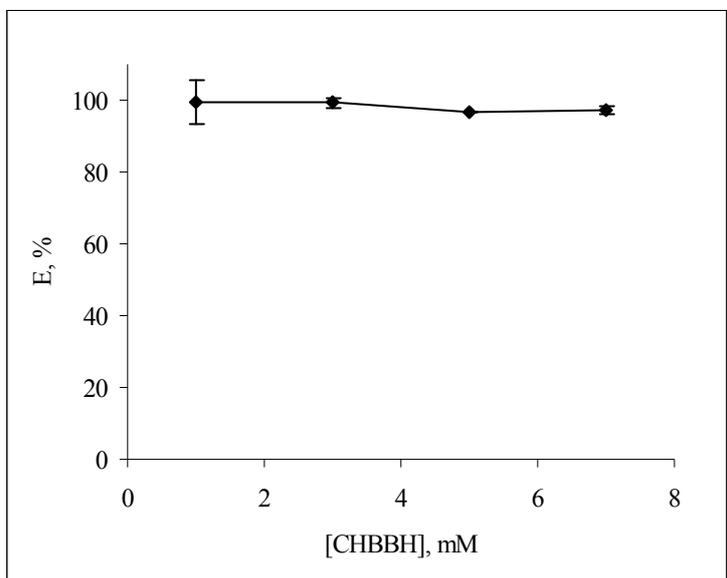


Figura II.16. Efecto de la concentración de 1,2-CHBBH en la extracción de Ni en el sistema Ni-CHBBH. Disolución acuosa: 1 mg·l⁻¹ Ni; 0,25 M de HEPES; 35 g·l⁻¹ de NaCl; pH 8; Disolución orgánica: 1,2-CHBBH en tolueno (2% DMF).

A continuación se procedió, al estudio de la reextracción de níquel a distintas concentraciones de ácido nítrico. Los resultados de este estudio se muestran en la figura II.17, donde se observa que, al igual que para el sistema Ni-DEHPA, la reextracción de níquel fue completa e independiente de la concentración de ácido

presente en la disolución receptora. Se decidió por tanto utilizar una concentración de ácido nítrico intermedia de 0,5 M para los experimentos posteriores.

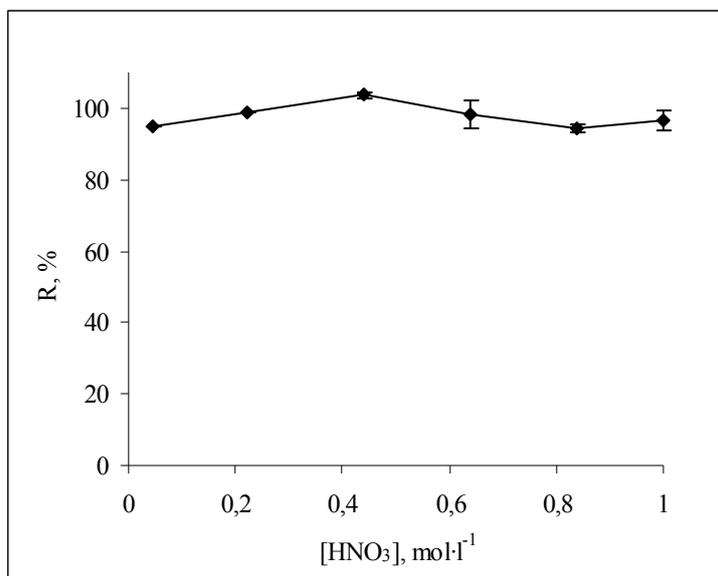


Figura II.17. Efecto de la concentración de ácido nítrico en la re-extracción de Ni con el sistema Ni-CHBBH. Disolución acuosa: 1 mg·l⁻¹ Ni; 35 g·l⁻¹ de NaCl; 0,25 M de HEPES; pH 8; disolución orgánica: 3 mM de CHBBH disuelto en tolueno (2% DMF).

Así, las condiciones del funcionamiento del sistema de extracción se resumen en la tabla II.4.

Disolución acuosa (muestra)	pH = 8 [HEPES] = 0,25 M
Disolución orgánica	[1,2-CHBBH] = 3 mM disuelto en tolueno (2% DMF)
Disolución de reextracción	[HNO ₃] = 0,5 M

Tabla II.4. Condiciones de extracción del sistema Ni-CHBBH para estudios de especiación de níquel en muestras de aguas naturales.

Debido a que este sistema será utilizado para la separación de distintas fracciones de níquel en aguas naturales se estudió la influencia de distintos ligandos en el sistema.

Efecto de los ligandos inorgánicos en el sistema Ni-CHBBH

Como se ha comentado anteriormente, como ejemplo de ligando inorgánico se eligió el cloruro dada su significación en los ecosistemas acuáticos, especialmente en los marinos y estuáricos. Para ello se realizaron las extracciones de níquel utilizando el sistema Ni-CHBBH, adicionando diferentes concentraciones de cloruros a la muestra en el rango 0 a 25 g·l⁻¹. En la figura II.18 se pueden observar los resultados obtenidos para el estudio del efecto de este ligando en los porcentajes de extracción de níquel.

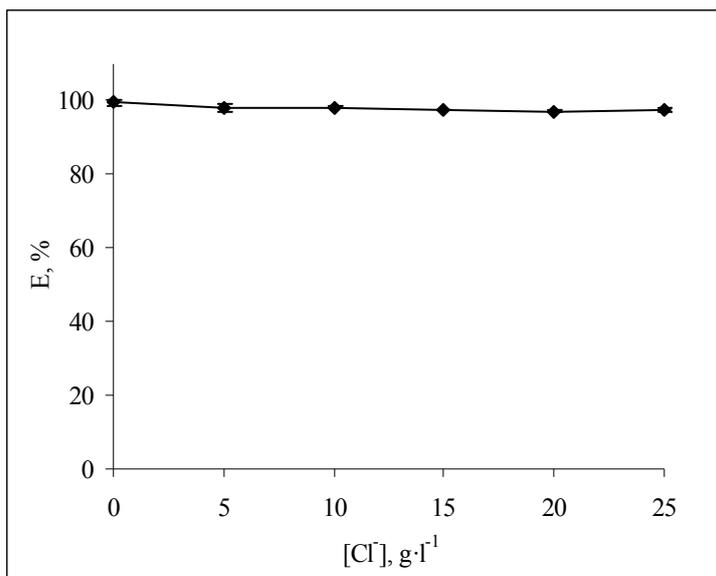


Figura II.18. Efecto del ligando cloruro en el sistema de extracción Ni-CHBBH. Disolución acuosa: 1 mg·l⁻¹ Ni; 0,25 M de HEPES; pH 8; disolución orgánica: 3 mM de CHBBH disuelto en tolueno (2% DMF).

Como se puede apreciar en la figura II.18, la eficiencia de la extracción fue independiente de la concentración de cloruros presente en la muestra. Estos resultados muestran que el níquel que se encuentra formando complejos con los cloruros en las disoluciones acuosas podría ser extraído por el sistema. Como se observa en los datos de especiación de la tabla II.5 obtenidos a partir del programa WinHumic V, la presencia de complejos clorurados de níquel en las muestras llegan a suponer el 28% del total de níquel en aquellas de mayor salinidad y sin embargo todo el níquel es transportado a la fase orgánica. Esto puede deberse bien a la extracción directa del complejo o bien a una mayor estabilidad del complejo Ni-CHBBH que el NiCl^+ , que haría que se formara preferentemente este complejo. De hecho, Byrne y col. basándose en la clasificación realizada por Turner donde define al níquel como catión que forma complejos débiles con los principales iones presentes en el agua de mar, como el NiCl^+ , con valores de $\log\beta$ de -0,49 [21].

$[\text{Cl}^-]$, $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	$[\text{Ni}^{2+}] \cdot 10^5$, M	$[\text{NiCl}^+] \cdot 10^6$, M	$[\text{Ni}(\text{OH})_2] \cdot 10^9$, M	$[\text{NiOH}^+] \cdot 10^8$, M
0	1,69	0,00	6,89	12,50
5	1,52	1,69	4,78	9,67
10	1,42	2,74	4,46	9,03
15	1,34	3,54	3,34	7,53
21	1,26	4,34	2,89	6,81
25	1,22	4,75	2,69	6,47

Tabla II.5. Datos teóricos de la especiación de níquel en muestras acuosas a pH 8 para distintas concentraciones de NaCl.

Teniendo en cuenta estos resultados, parece posible la aplicación de este sistema a muestras tanto salinas como no salinas debido a que la salinidad no va a afectar a la extracción del metal.

Efecto de los ligandos orgánicos en el sistema Ni-CHBBH

Para estudiar el efecto causado por la presencia de ligandos orgánicos en el sistema de extracción se realizó la adición de diferentes concentraciones de la sal sódica de ácidos húmicos a las muestras antes de extraerlas, en un rango de concentración de 15-100 mg·l⁻¹. Una porción de esas muestras fue digerida con radiación UV (Anexo A.3) y extraída posteriormente con el sistema propuesto, mientras que otra porción fue extraída directamente. De este modo se establece si el efecto producido por la presencia de los ácidos húmicos se debe a la formación de complejos orgánicos que al ser destruidos permitirían eliminar dicho efecto. Los resultados obtenidos en ambos casos se muestran en la figura II.19.

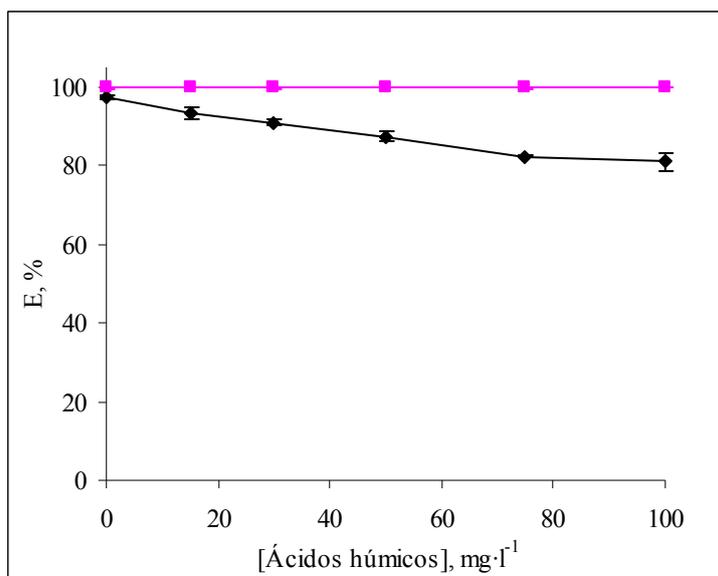


Figura II.19. Efecto de los ácidos húmicos en el sistema de extracción Ni-CHBBH. ♦: Muestras sin digerir. ■: Muestras digeridas. Disolución acuosa: 1 mg·l⁻¹ Ni; 0,25 M de HEPES; 35 g·l⁻¹ de NaCl; pH 8; disolución orgánica: 3 mM de CHBBH disuelto en tolueno (2% DMF).

Como se observa en la figura II.19, el porcentaje de níquel extraído disminuye al aumentar la concentración de ácidos húmicos presente en las muestras, llegando incluso a producir un descenso del 20% para una concentración de ácidos húmicos de $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ en comparación con el porcentaje de níquel extraído en ausencia de ácidos húmicos. Esto puede estar causado por la formación de complejos mayoritariamente aniónicos entre el níquel y los ácidos húmicos presentes en la muestra que no serían extraídos por el 1,2-CHBBH. De hecho, al romper dichos complejos mediante la destrucción oxidativa de la materia orgánica por digestión ultravioleta y realizar la extracción es posible conseguir porcentajes de extracción similares a los obtenidos cuando los ácidos húmicos no están presentes en la muestra, como se observa en la figura II.19.

Estudios realizados en resinas de intercambio iónico muestran resultados similares al obtenido con extracción líquido-líquido, encontrando que al aumentar la concentración de carbono orgánico disuelto (COD) en la muestra disminuye la concentración de níquel que puede ser retenido en la resina debido a la formación de complejos orgánicos no lábiles [22,23]. En el caso del sistema en estudio los complejos orgánicos formados podrían disminuir el níquel que podría ser extraído por el 1,2-CHBBH.

Para establecer la relación existente entre el porcentaje de extracción obtenido en presencia de los ácidos húmicos y los complejos orgánicos formados por el níquel se calcularon los porcentajes de las distintas especies de níquel presentes en la muestra en equilibrio con el programa WinHumic V. En la tabla II.6 aparecen las concentraciones calculadas de las especies de níquel mayoritarias presentes en las muestras para distintas concentraciones de ácidos húmicos, tales como Ni^{2+} , NiCl^+ y Ni-AH .

[AH], mg·l ⁻¹	[Ni ²⁺]·10 ⁵ , M	[NiCl ⁺]·10 ⁶ , M	[Ni-AH]·10 ⁶ , M
0	1,26	4,34	0
15	1,17	4,03	1,08
30	1,09	3,75	2,04
50	1,00	3,43	3,16
75	0,90	3,09	4,35
100	0,81	2,80	5,35

Tabla II.6. Datos teóricos de las especies mayoritarias de níquel en el equilibrio según las distintas concentraciones de ácidos húmicos (AH). Disolución acuosa: pH = 8; 35 g·l⁻¹ NaCl.

Como se puede observar en la tabla II.6, las concentraciones de las especies Ni²⁺ y NiCl⁺ disminuyen al aumentar la de ácidos húmicos, mientras que las de los complejos orgánicos aumentan.

De hecho, como muestra la figura II.20, se observó una relación lineal negativa entre la concentración de las especies orgánicas y el porcentaje de extracción de níquel. Además el coeficiente de correlación de Spearman calculado entre ambas variables fue de -1,00.

Este comportamiento indica que probablemente el sistema químico no extrae los complejos orgánicos que se forman entre el níquel y los ácidos húmicos (Ni-AH). Sin embargo, la cantidad de níquel que permanece en la disolución acuosa después de las extracciones es menor que la cantidad de complejos orgánicos formados calculada teóricamente, como puede observarse en la tabla II.7.

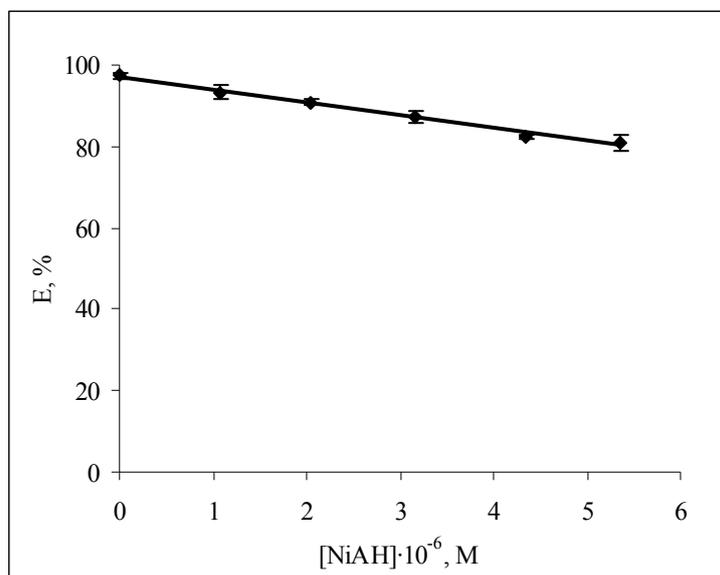


Figura II.20. Relación entre el porcentaje de extracción de níquel y la concentración de complejos orgánicos en la muestra.

[AH], mg·l ⁻¹	Ni _r *, %	Ni-AH**, %	Ni _r /Ni-AH
0	0,00	0,00	--
15	4,13	6,32	0,65
30	6,57	11,95	0,55
50	10,15	18,52	0,55
75	15,10	25,51	0,59
100	16,49	31,37	0,52

(*) Níquel no extraído de la disolución acuosa, medido experimentalmente.

(**) Níquel como complejos orgánicos en la disolución acuosa, calculados teóricamente.

Tabla II.7. Porcentajes de níquel no extraído que permanece en disolución acuosa y su relación con la concentración de Ni-AH.

Teniendo en cuenta la relación calculada entre el níquel no extraído que queda en la disolución acuosa después de la extracción (Ni_r) y la concentración total de los complejos orgánicos (Ni-AH) es posible establecer que, una vez que se alcance el

equilibrio, el 57,2 ($\pm 5,0$) % de los complejos orgánicos son extraídos de la disolución acuosa. Este transporte de parte de los complejos orgánicos puede deberse a distintos procesos químicos. Por un lado, algunos complejos podría pasar a la disolución orgánica si poseen constantes de reparto favorables. En este sentido se ha observado la extracción pasiva de ciertos complejos orgánicos lipofílicos a la disolución orgánica en algunos sistemas de membranas líquidas [24]. Por otro lado, puede existir la posibilidad de que se formen complejos orgánicos cargados que pueden ser extraídos activamente por el 1,2-CHBBH. Finalmente, podría ocurrir la disociación competitiva de los complejos Ni-AH debido a que se vería favorecida la formación de los complejos de níquel con el agente complejante en la fase orgánica si presentaran mayores constantes de formación. En este sentido Mandal y col. estudiaron la cinética de disociación de los complejos orgánicos de níquel en aguas naturales, encontrando que entre el 30 y el 95% del níquel total se encontraba en las muestras formando complejos que eran fácilmente disociables [25]. Igualmente existen estudios que demuestran que una mayoría de los complejos orgánicos de cadmio y cobre que se forman en las aguas naturales son débiles [26]. En el caso del níquel estaríamos ante un porcentaje de complejos orgánicos más lábiles que podrían ser extraídos por el sistema con el extractante 1,2-CHBBH. Este hecho permitiría utilizar el sistema propuesto para separar y cuantificar las fracciones más lábiles de níquel de la disolución acuosa, las cuales suelen ser más fácilmente asimilables por los organismos. Por tanto, esta fracción de complejos inorgánicos y orgánicos lábiles representa una mejor aproximación de la cantidad de níquel biodisponible en las aguas naturales y su determinación es la mejor alternativa para estudiar los efectos que el níquel presente en el medio acuático puede tener sobre los organismos [27].

Una vez establecido el efecto de los ácidos húmicos en la extracción se comprobó que la presencia de este ligando en la muestra no afectaba a la reextracción de níquel. Los resultados obtenidos se muestran en la figura II.21.

Como cabía esperar, la presencia de ácidos húmicos en la disolución cargada afecta al proceso de extracción del metal, pero una vez en la fase orgánica el proceso de reextracción resulta independiente del contenido inicial de materia orgánica en la muestra. Esto es debido a que en el proceso de extracción se extrae a la disolución orgánica el níquel como complejo Ni-CHBBH procedente de las especies lábiles tanto inorgánicas como orgánicas, que posteriormente puede ser reextraído sin problemas por la disolución ácida utilizada, según la ecuación II.3.

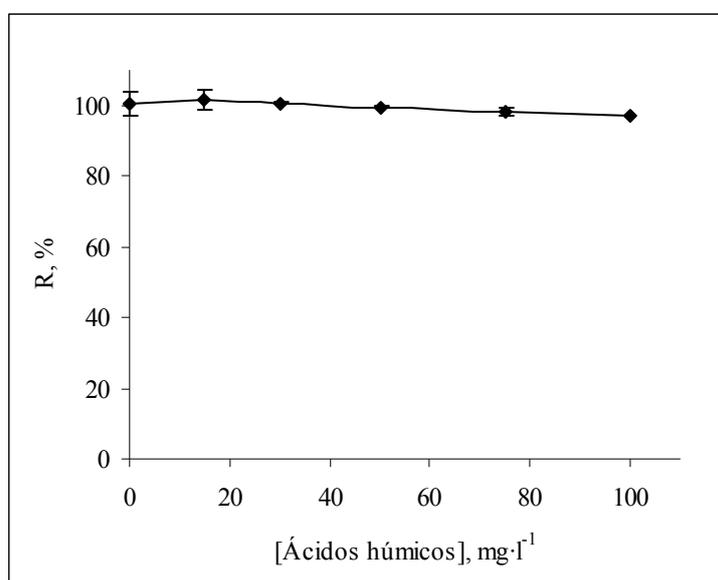


Figura II.21. Efecto de la concentración de ácidos húmicos en la reextracción de Ni con el sistema Ni-CHBBH. Disolución acuosa: 1 mg·l⁻¹ Ni; 35 g·l⁻¹ de NaCl; 0,25 M de HEPES; pH 8; disolución orgánica: 3 mM de CHBBH disuelto en tolueno (2% DMF).

Una vez seleccionados los sistemas químicos para el análisis de contenidos totales y de la fracción lábil y no-lábil de níquel en aguas naturales se procedió a su traslado a los sistemas de membranas líquidas (ML), ya que permiten aumentar los factores de preconcentración y realizar simultáneamente la extracción y reextracción.

En el caso del sistema Ni-DEHPA se aplicó directamente a un sistema de microextracción en fase líquida con capilares de fibra hueca (HF-LPME) ya que existe un mayor conocimiento de este sistema en membranas líquidas de volumen [20]. Sin embargo, en el caso del sistema Ni-CHBBH se trasladó en primer lugar a un sistema de membrana de volumen (MLV) que permite un acceso más fácil a la disolución receptora y resulta más práctico para realizar un estudio en profundidad. Una vez establecidas las condiciones en el sistema de MLV se trasladó a un sistema de microextracción en fase líquida con capilares de fibra hueca (HF-LPME) que permite reducir el volumen de reactivos y aumentar los factores de preconcentración.

II.IV. BIBLIOGRAFÍA

1. Salbu B., Steinnes E., *Trace elements in natural waters*, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 1995.
2. García-Vargas M., Trevilla S., Milla M., *Synthesis and characterization of 1,2-cyclohexanedione bis-benzoyl-hydrazone and its application to the determination of Ti in minerals and rocks*, *Talanta*, 33, 209-214, 1986.
3. Van de Voorde I., Pinoy L., Courtijn E., Verpoort F., *Equilibrium studies of nickel(II), copper(II), and cobalt(II) extraction with aloxime 800, D(2)EHPA, and Cyanex reagents*, *Solvent Extraction and Ion Exchange*, 24, 893-914, 2006.
4. Belkhouche N., Didi M.A., Villemin D., *Separation of nickel and copper by solvent extraction using Di-2-ethylhexylphosphoric acid-based synergistic mixture*, *Solvent Extraction and Ion Exchange*, 23, 677-693, 2005.
5. Nogueira C.A., Delmas F., *New flow sheet for the recovery of cadmium, cobalt and nickel from spent Ni-Cd batteries by solvent extraction*, *Hydrometallurgy*, 52, 267-287, 1999.
6. Sana T., Shiomori K., Kawano Y., Nagayoshi K., *Extraction equilibria of nickel with LIX860 and DEHPA*, En: *Proceedings of ISEC'99*, The Society Chemical Industry, London, 1999.
7. Bourget C.C., Cox M., Flett D.S. *Stoichiometry of the extraction of nickel with organophosphorus acids*, En: *Proceedings of ISEC'99* Barcelona, Spain, Society Chemical Industry, London, 1999.
8. Aguilar M., *Graphical treatment of liquid-liquid equilibrium data*, En: *Developments in solvent extraction*, Alegret S. (ed.) Wiley, New York, 1988.
9. Irigoyen L., Moreno C., Mendiguchía C., García-Vargas M., *Application of liquid membranes to sample preconcentration for the spectrometric determination of cadmium in seawater*, *Journal of Membrane Science*, 274, 169-

- 172, 2006.
10. Ipinmoroti K.O., Komolafe R.T., *Extraction of nickel (II) with methyl isobutyl ketone and tri-n-butylphosphate*, Indian Journal of Chemistry section A-Inorganic, Bio-inorganic, Physical, Theoretical and Analytical Chemistry, 35, 441-442, 1996.
 11. Sato T., *Solvent extraction of nickel(II) from aqueous thiocyanate solutions by tributyl phosphate*, Solvent Extraction Research and Development, 7, 44-54, 2000.
 12. Danesi P.R., *Solvent extraction in the nuclear industry*, En: *Developments in solvent extraction*, Alegret S. (ed.) Ellis Horwood Ltd, Chichester, 1988.
 13. Pinto J.J., *Nuevos sistemas químicos para la preconcentración de trazas de cobre en muestras acuosas. Implementación al análisis on-line en nuevas alternativas para la simplificación y mejora de la metodología de análisis de metales pesados en muestras ambientales*, Tesis Doctoral, Servicio de publicaciones de la Universidad de Cádiz, Cádiz, cap 4, 249-299, 2008.
 14. Millero F.J., *Chemical Oceanography*, 2ª edición, CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA, 1996.
 15. WINHUMIC V for Win95/98/NT (http://www.lwr.kth.se/english/OurSoftWare/Win_humicV/index.htm).
 16. Preston J.S., *Solvent extraction of cobalt and nickel by organophosphorus acids. I. Comparison of phosphoric, phosphonic and phosphinic acid systems*, Hydrometallurgy, 9, 115-133, 1982.
 17. Pospiech B., Walkowiak W., Wozniak M.J., *Application of TBP in selective removal of iron(III) in solvent extraction and transport through polymer inclusion membranes processes*, Physicochemical Problems of Mineral Processing, 39, 89-98, 2005.
 18. Montekaitis R.J., Martell A.E., *Speciation of metals in the oceans I. Inorganic*

- complexes in seawater, and influence of added chelating agents*, Marine Chemistry, 21, 101-116, 1987.
19. Gajda B., Bogacki M.B., *The effect of tributylphosphate on the extraction of nickel(II) and cobalt(II) ions with di(2-ethylhexyl)phosphoric acid*, Physicochemical Problems of Mineral Processing, 41, 145-152, 2007.
 20. Mendiguchía C., García-Vargas M., Moreno C., *Screening of dissolved heavy metals (Cu, Zn, Mn, Al, Cd, Ni, Pb) in seawater by a liquid-membrane-ICP-MS approach*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 391, 773-778, 2008.
 21. Byrne R.H., Kump L.R., Cantrell K.J., *The influence of temperature and pH on trace metal speciation in seawater*, Marine Chemistry, 25, 163-181, 1988.
 22. Worms I.A.M., Wilkinson K.J., *Determination of Ni²⁺ using an equilibrium ion exchange technique: important chemical factors and applicability to environmental samples*, Analytica Chimica Acta, 616, 95-102, 2008.
 23. Doig L.E., Liber K., *Nickel speciation in the presence of different sources and fractions of dissolved organic matter*, Ecotoxicology and Environmental Safety, 66, 169-177, 2007.
 24. Parthasarathy N., Buffle J., *Capabilities of supported liquid membranes for metal speciation in natural waters: application to copper speciation*, Analytica Chimica Acta, 284, 649-659, 1994.
 25. Mandal R., Hassan N.M., Murimboh J., Chakrabarti C.L., Back M.H., *Chemical speciation and toxicity of nickel species in natural waters from the Sudbury area (Canada)*, Environmental Science and Technology, 36, 1477-1484, 2002.
 26. Zhang H., Davison W., *Direct in situ measurements of labile inorganic and organically bound metal species in synthetic solutions and natural waters using diffusive gradients in thin film*, Analytical Chemistry, 72, 4447-4457, 2000.
 27. Ferreira D., Tousset N., Ridame C., Tusseau-Vuillemin M.H., *More than inorganic copper is bioavailable to aquatic mosses at environmentally relevant*

concentrations, Environmental Toxicology and Chemistry, 27, 2108-2116, 2008.

CAPÍTULO III

OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA DE TRANSPORTE Ni-CHBBH EN MEMBRANAS LÍQUIDAS DE VOLUMEN

III.I. INTRODUCCIÓN

Las membranas líquidas constituyen una herramienta de gran utilidad para desarrollar procesos de separación de una manera efectiva, a la vez que rápida y limpia, haciéndola de gran valía para sistemas enfocados al estudio de trazas y subtrazas de una gran diversidad de compuestos. Es por ello que en nuestro caso, y una vez seleccionados los sistemas químicos para el análisis de níquel se procedió al traslado del sistema Ni-CHBBH a las membranas líquidas de volumen.

Como se ha explicado en la introducción teórica, las membranas líquidas de volumen suponen una interesante alternativa para separar y preconcentrar metales en aguas naturales debido a que presentan las siguientes ventajas sobre la técnica de extracción líquido-líquido:

- Al ser un sistema de preconcentración permite determinar las bajas concentraciones de metales propias de las muestras medioambientales, permitiendo su análisis mediante técnicas asequibles como la espectrometría de absorción atómica [1].

- Los procesos de extracción y reextracción se producen en un sólo paso, por lo que se consigue reducir la manipulación de la muestra y por tanto evitar la contaminación de la misma durante el proceso.
- Como sistema de separación permite eliminar los efectos de matriz durante la etapa de análisis.
- El fácil acceso a las disoluciones acuosas, hace de las membranas líquidas de volumen (MLV) la configuración más útil para realizar estudios de optimización de sistemas químicos.
- La amplia variedad de diseños con distintas relaciones de volúmenes entre la muestra y la disolución receptora permiten desarrollar sistemas que presenten mejores factores de preconcentración.

El presente estudio se ha basado en el estudio de extracción líquido-líquido previo, y ha consistido fundamentalmente en un proceso de optimización, mediante metodología univariante, del sistema en membranas líquidas de volumen, concretamente de los parámetros químicos que más influyen en la extracción, como son la concentración de extractante disuelto en la fase orgánica y la concentración de ácido en la disolución receptora. Posteriormente se optimizaron los parámetros hidrodinámicos, como la velocidad de agitación. Una vez establecidas las condiciones óptimas se estudió el efecto de los distintos ligandos tanto orgánicos como inorgánicos que se encuentran presentes en las aguas naturales de forma mayoritaria. Finalmente, en las condiciones optimizadas previamente se estudió la eficiencia de la extracción.

III.II. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Al igual que en el capítulo anterior se describen en primer lugar las condiciones experimentales en las que se realizaron cada uno de los experimentos necesarios para desarrollar el sistema de membranas líquidas de volumen utilizando el

1,2-CHBBH como agente extractante. En un apartado posterior se detallan los resultados obtenidos a partir de estos experimentos.

Descripción de la celda

Los experimentos que se exponen a continuación fueron realizados con una celda de vidrio de fabricación propia como la que se muestra en la figura III.1.

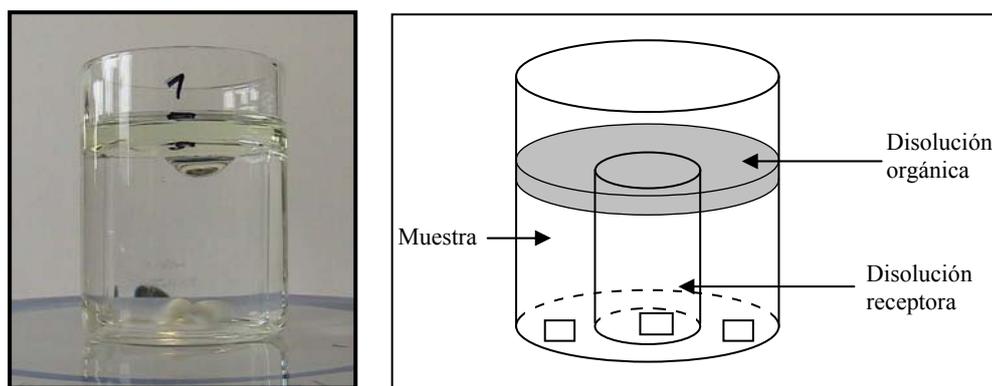
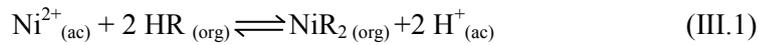


Figura III.1. Celda de membrana líquida de volumen.

El sistema consiste en dos vasos concéntricos, encontrándose en el exterior la disolución cargada y en el interior la disolución receptora. En este caso el volumen de disolución receptora fue de 23,5 ml y el de muestra de 38 ml, lo que permitía conseguir un factor de preconcentración de hasta 1,6. Ambas disoluciones acuosas se mantienen en contacto a través de la disolución orgánica que se encuentra sobre ellas, la cual contiene el extractante utilizado (1,2-CHBBH) disuelto en tolueno al 2% de DMF. De este modo el metal es extraído de la muestra hacia la fase orgánica donde se forma el complejo Ni-CHBBH, el cual difunde hacia la fase receptora donde se produce la reextracción del metal en la disolución ácida regenerándose el extractante según la reacción III.1.



donde HR representa al reactivo 1,2-CHBBH. Para facilitar los intercambios en la interfase ambas muestras acuosas se someten a agitación mediante varias barras agitadoras magnéticas y un agitador magnético, reduciéndose de este modo los procesos asociados con la capa de difusión, a la vez que se aumenta el transporte por convección. El volumen de la disolución orgánica se eligió para que fuera el mínimo posible, 7 ml en este caso, y de este modo maximizar la velocidad de transporte del metal.

Optimización del sistema

El parámetro elegido para realizar la optimización del sistema fue el coeficiente de permeabilidad (P) que permite cuantificar la eficiencia del transporte de níquel en función del flujo de masa a través de la membrana. Este parámetro desarrollado por Danesi y col. se encuentra relacionado con el flujo de materia (J) a través de la membrana líquida en un periodo de tiempo dado [2]. El flujo de materia J es descrito por la ley de Fick, pudiendo ser representado con la ecuación III.2.

$$J = - \frac{d[\text{Ni}^{2+}]_C \cdot V_C}{dt \cdot S} \quad (\text{III.2})$$

donde J representa el flujo del metal, $[\text{Ni}^{2+}]_C$ y V_C representan la concentración de níquel y el volumen en la disolución cargada, respectivamente y S el área efectiva de la membrana. A través de la ecuación anterior y sabiendo que la permeabilidad es definida como el cociente entre el flujo y la concentración del metal en la disolución cargada se puede deducir la ecuación III.3.

$$-\ln[\text{Ni}^{2+}]_c = \frac{S}{V_c} \cdot P \cdot t - \ln[\text{Ni}^{2+}]_0 \quad (\text{III.3})$$

donde S es el área efectiva de la membrana, V_c el volumen de la disolución cargada y $[\text{Ni}^{2+}]_0$ y $[\text{Ni}^{2+}]_c$ son las concentraciones de níquel en la disolución cargada a los tiempos 0 y t, respectivamente. De este modo, tenemos una relación lineal de la concentración de níquel en la disolución cargada frente al tiempo de extracción, pudiendo obtener el valor del coeficiente de permeabilidad a partir del valor de la pendiente de la recta de regresión obtenida.

En este caso, para obtener el coeficiente de permeabilidad se tomaron alícuotas de 1,6 ml de disolución receptora cada 30 minutos durante dos horas, siendo sustituidas por porciones nuevas de la disolución ácida. Las alícuotas tomadas se analizaron mediante espectroscopía de absorción atómica (AAS) para determinar el níquel que había sido transportado a cada tiempo y estimar la concentración de níquel que quedaba en la disolución cargada obteniendo a partir de ella el coeficiente de permeabilidad con la ecuación III.3, como se ha explicado previamente.

Con el objetivo de maximizar el coeficiente de permeabilidad se realizó un estudio univariante del sistema, variando cada vez el valor de una de las variables de estudio mientras permanecían constante las demás. Entre las variables optimizadas se incluyeron tanto las variables químicas, tales como la concentración de extractante disuelto en la disolución orgánica y la concentración de ácido en la disolución receptora, como las hidrodinámicas.

Las disoluciones cargadas utilizadas para llevar a cabo estas experiencias fueron preparadas con $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de níquel, $35 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cloruro sódico y pH 8. Las disoluciones se tamponaron con una disolución ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-N´-(2-etanosulfónico) (HEPES) hasta una concentración final de 0,25 M y la cantidad necesaria de una disolución de hidróxido sódico 2 M para alcanzar el pH deseado.

Efecto de los ligandos

Una vez establecidas las condiciones óptimas se procedió a estudiar el efecto de los ligandos presentes en la muestra en el transporte de níquel en términos de permeabilidad. Al igual que en el sistema de extracción líquido-líquido se utilizó para estudiar el efecto de los ligandos inorgánicos presentes en las aguas naturales el Cl^- y como ejemplo de ligandos orgánicos los ácidos húmicos.

Los experimentos se realizaron de forma análoga a los anteriores. En el caso de los ligandos orgánicos se analizó el carbono orgánico de cada muestra y se repitieron cada una de las experiencias tras una digestión UV de las mismas, tal como se explica en los Anexos A.3 y A.4, respectivamente. Al realizar estos análisis se encontró una relación AH:COD de 3:1, proporción que se corresponde con la definida en la bibliografía [3].

Eficiencia de extracción

En las condiciones óptimas de transporte se determinó la variación temporal de la eficiencia de la extracción (E_e) del sistema entendida como el porcentaje de níquel transportado a través de la membrana a un tiempo dado. Para ello, se realizó un estudio a lo largo de 24 horas de funcionamiento, en las condiciones optimizadas anteriormente y en ausencia de agentes complejantes. Cada hora se tomó una alícuota de 1,6 ml de disolución receptora hasta las 11 horas, tomando dos alícuotas más de control tras 23-24 horas de funcionamiento. A estas alícuotas recogidas durante todo el proceso se les determinó el contenido de níquel, a partir del cual se calculó el valor de la eficiencia de la extracción (E_e), que representa al porcentaje de níquel transportado, con la ecuación III.4.

$$E_e (\%) = \frac{m_t}{m_{C_0}} \cdot 100 \quad (\text{III.4})$$

donde m_t es la masa de níquel transportada a través de la membrana a cada tiempo estudiado y m_{c0} es la masa de níquel inicial en la disolución cargada.

Con el objetivo de mejorar la eficiencia de la extracción, se realizó el estudio de la influencia sobre este parámetro del disolvente y modificador de matriz utilizado en la disolución orgánica, así como del uso de distintos ácidos en la disolución receptora.

Por último se estudió el efecto causado sobre la eficiencia de la extracción por la presencia de ligandos orgánicos en la disolución cargada.

III.III. RESULTADOS

A continuación se discuten los resultados obtenidos en los diferentes estudios realizados con el sistema de membrana líquida de volumen con el sistema químico elegido en el capítulo anterior, Ni-CHBBH, para determinar los contenidos de las distintas fracciones en muestras de aguas naturales.

Optimización del sistema

Como se ha explicado en el desarrollo experimental para la optimización del sistema de membrana líquida se estudió el efecto sobre el coeficiente de permeabilidad de las variables químicas e hidrodinámicas del sistema.

La primera variable estudiada fue la concentración de reactivo (1,2-CHBBH) extractante en la membrana. Los experimentos se realizaron variando la concentración de reactivo en un intervalo entre 0,5 y 3 mM. La figura III.2 recoge los resultados obtenidos, pudiendo observar cómo se produce un incremento inicial del valor del coeficiente de permeabilidad al aumentar la concentración de reactivo.

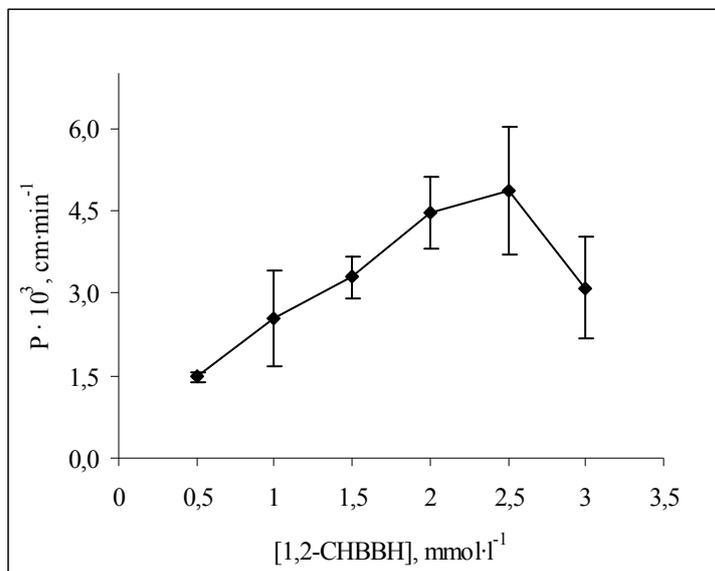


Figura III.2. Efecto de la concentración de 1,2-CHBBH en el coeficiente de permeabilidad. Disolución acuosa: 1 mg·l⁻¹ Ni; 0,25 M HEPES; pH 8; 35 g·l⁻¹ NaCl; Disolución receptora: 0,7 M HNO₃.

Este comportamiento es debido a que existe una mayor relación molar CHBBH:Ni que favorece el transporte de los iones níquel a través de la membrana. Sin embargo, para concentraciones superiores a 2,5 mmol·l⁻¹ se produce una disminución del transporte, posiblemente relacionada con la aparición de precipitados en la interfase, debido al aumento de la concentración del reactivo 1,2-CHBBH sin aumentar la proporción de modificador de matriz DMF. Este mismo comportamiento fue encontrado por Mendiguchía y col. para la separación y preconcentración de cobre con el reactivo DEHPA en un sistema de membrana líquida de volumen similar [1]. En su caso, el descenso del transporte del metal se debía al aumento de la viscosidad de la disolución orgánica al aumentar la concentración de reactivo en la misma.

En vista de los resultados obtenidos, para posteriores experimentos se utilizó una concentración de 2,5 mmol·l⁻¹ de 1,2-CHBBH.

A continuación se procedió al estudio de la siguiente variable química del sistema, la concentración de ácido nítrico en la disolución receptora, en un intervalo entre 0,5 y 2,5 M mostrándose los resultados obtenidos en la figura III.3.

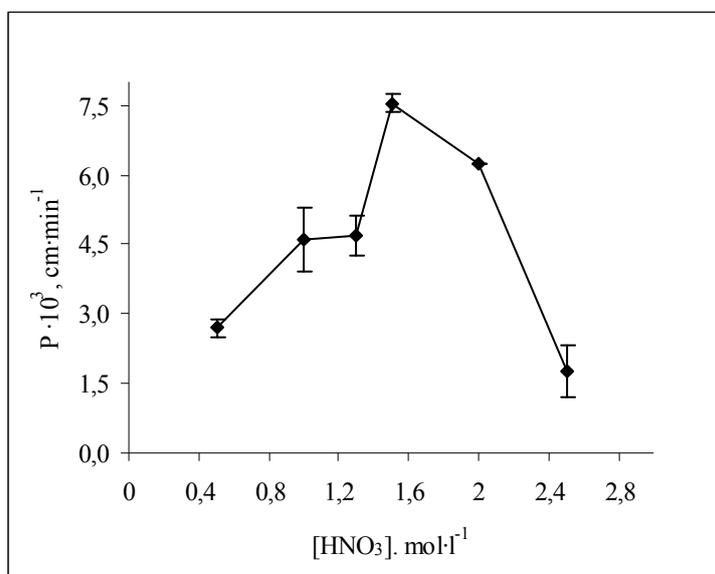


Figura III.3. Efecto de la concentración de ácido nítrico en el coeficiente de permeabilidad. Disolución acuosa: 1 mg·l⁻¹ Ni; 0,25 M HEPES; pH 8; 35 g·l⁻¹ NaCl; Disolución orgánica: 2,5 mM 1,2-CHBBH.

Como se observa, el valor del coeficiente de permeabilidad experimenta un incremento gradual al aumentar la concentración de ácido nítrico hasta 1,5 M, a partir de la cual comienza a disminuir. Este comportamiento puede ser debido a que el aumento de concentración de ácido nítrico mantiene un gradiente de protones mayor que favorece el transporte de níquel según la ecuación de la extracción, sin embargo cuando la acidez es demasiado alta es posible que exista una disolución/descomposición parcial del reactivo que ralentiza su transporte. Otros autores observaron este comportamiento en sistemas similares para la determinación de cobre [1].

Por último, una vez que las variables químicas del sistema se optimizaron, se realizó el estudio de las condiciones hidrodinámicas del mismo, variando la velocidad de agitación entre 300 y 600 rpm, mostrándose los resultados en la figura III.4.

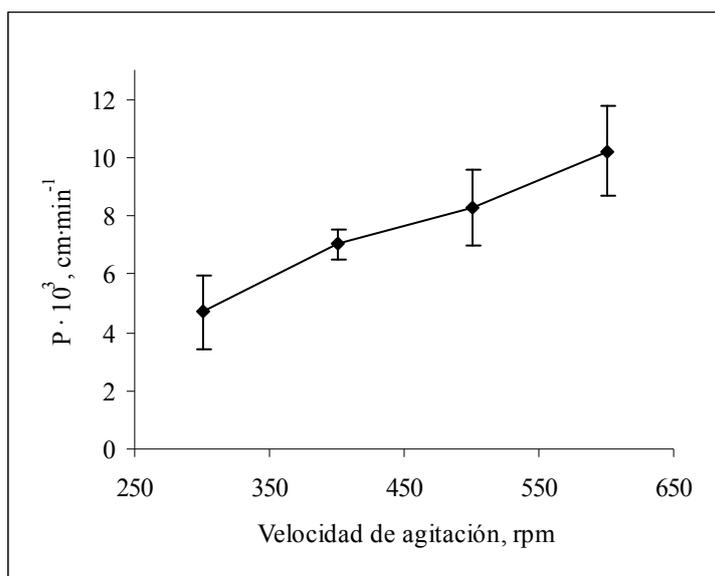


Figura III.4. Efecto de la velocidad de agitación en el coeficiente de permeabilidad. Disolución acuosa: $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ Ni; $0,25 \text{ M}$ HEPES; pH 8; $35 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl; Disolución orgánica: $2,5 \text{ mM}$ 1,2-CHBBH; Disolución receptora: $1,5 \text{ M}$ HNO_3 .

Como se observa en la gráfica, el transporte de níquel mejoró al aumentar la velocidad de agitación, ya que se favorece la difusión del metal en el seno de la disolución acuosa hacia la interfase con la disolución orgánica, renovándola y mejorando con ello la difusión del mismo a través de la membrana líquida hacia la interfase orgánica/receptora. Sin embargo, para una velocidad de agitación de 600 rpm, ya se produce ocasionalmente la ruptura de la membrana, por lo que se seleccionó 500 rpm como velocidad óptima de trabajo. Este comportamiento es similar al observado anteriormente en otros sistemas de membranas líquidas similares [1,4].

Efecto de los ligandos

Efecto de los ligandos inorgánicos

El siguiente estudio se centró en establecer la influencia sobre el coeficiente de permeabilidad de los principales agentes complejantes presentes en el agua de mar, en primer lugar los ligandos inorgánicos utilizando como representativo el cloruro. Los experimentos se realizaron a lo largo de 2 horas en las condiciones optimizadas anteriormente mostrándose los resultados obtenidos en la figura III.5.

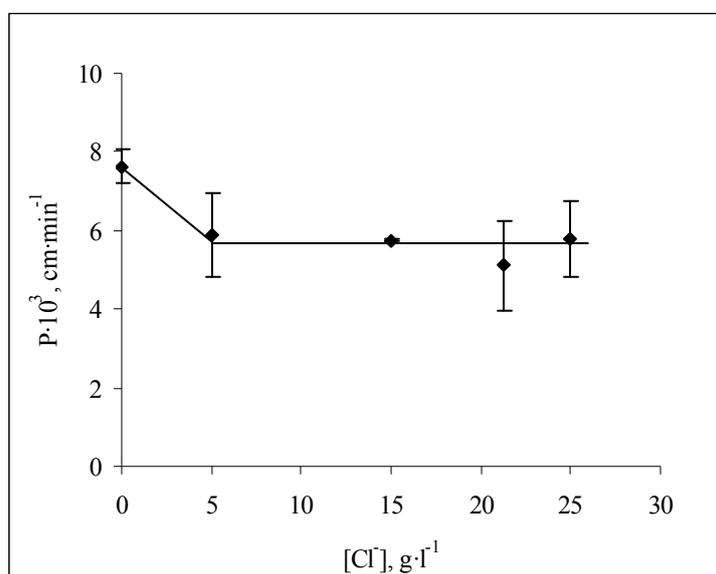


Figura III.5. Efecto de la concentración de cloruros en el coeficiente de permeabilidad. Disolución acuosa: 1 mg·l⁻¹ Ni; 0,25 M HEPES; pH 8; Disolución receptora: 1,5 M HCl; Disolución orgánica: 2,5 mM CHBBH.

Como se puede observar existe una disminución de la permeabilidad cuando hay cloruros en la muestra, aunque esa disminución es la misma independientemente de la concentración de cloruros usada. Esta disminución podría estar relacionada con la formación del complejo monovalente NiCl⁺ que podría no ser extraído directamente

por el agente extractante o cuya velocidad de transporte podría ser diferente a la de la especie Ni^{2+} . Aunque en los experimentos de extracción líquido-líquido no se observó este comportamiento hay que tener en cuenta que el contacto entre la fase orgánica y la cargada en la membrana es mucho menor y que por tanto la relación efectiva entre las moléculas de metal y extractante también lo es, lo que podría influir en el transporte competitivo de la especie NiCl^+ a través de la membrana líquida [5].

Si observamos los datos de especiación de níquel obtenidos teóricamente con el programa WinHumic V en la tabla III.1 podemos comprobar que la cantidad de la especie NiCl^+ aumenta al aumentar la concentración de cloruro sódico en la muestra.

[Cl ⁻], g·l ⁻¹	[NiCl ⁺]·10 ⁶		[Ni ²⁺]·10 ⁵		[Ni(OH) ₂]·10 ⁹		[NiOH ⁺]·10 ⁸	
	M	%	M	%	M	%	M	%
0	0,0	0,0	1,7	99,2	6,9	0,0	0,1	0,0
5	1,7	9,9	1,5	89,2	4,8	0,0	9,7	0,6
15	3,5	20,8	1,3	78,7	3,3	0,0	7,5	0,4
21,24	4,3	25,5	1,3	74,0	2,9	0,0	6,8	0,4
25	4,8	27,9	1,2	71,6	2,7	0,0	6,5	0,4

Tabla III.1. Datos teóricos de especiación calculados con el programa WinHumic V para distintas concentraciones de cloruro.

Sin embargo, no existe una dependencia del coeficiente de permeabilidad con la concentración de estos complejos, ya que el efecto se traduce en una disminución del coeficiente de permeabilidad de un valor de $7,63 \cdot 10^{-3} \pm 0,43 \cdot 10^{-3}$ a un valor medio de $5,64 \cdot 10^{-3} \pm 0,36 \cdot 10^{-3}$ cuando existen cloruros en el rango de 5 a 25 g·l⁻¹. Para los valores de cloruros propios del agua de mar (21,24 g·l⁻¹), esta disminución del coeficiente de permeabilidad se corresponde con un decrecimiento del 26% respecto a su valor en ausencia de cloruros, porcentaje que prácticamente coincide con el porcentaje de la especie NiCl^+ en este tipo de muestras, como se observa en la tabla

III.1. Este resultado confirmaría que esta especie podría no estar siendo extraída por el sistema, como se comentó anteriormente.

Efecto de los ligandos orgánicos

En el caso de los agentes complejantes orgánicos se estudió el efecto causado por la presencia de ácidos húmicos en las muestras. Como en el caso anterior, el estudio se realizó para distintas concentraciones de ácidos húmicos, y se repitió tras la eliminación de los mismos mediante digestión por radiación UV (Anexo A.3). Los datos obtenidos en ambos casos se han representado en la figura III.6.

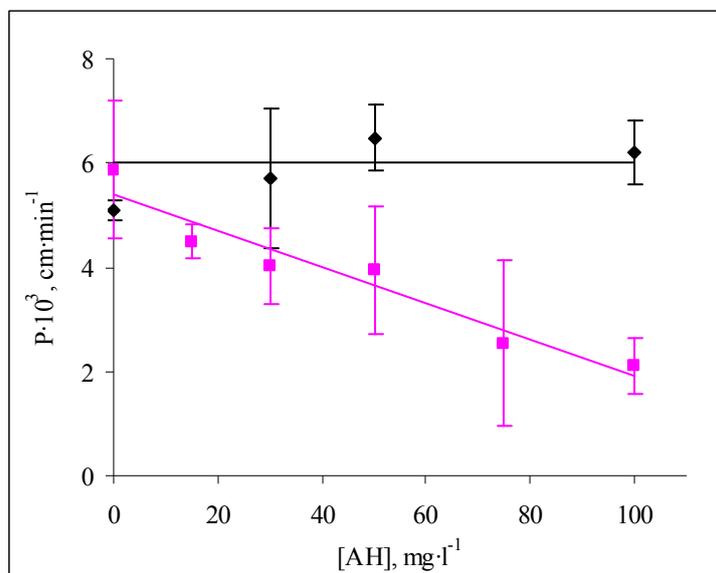


Figura III.6. Efecto de la concentración de los ácidos húmicos en el coeficiente de permeabilidad.; Disolución receptora: 1,5 M HCl; Disolución orgánica: 2,5 mM CHBBH; Disolución cargada: 1 mg·l⁻¹ Ni; 0,25 M HEPES; 35 g·l⁻¹ NaCl; pH 8, ■: sin digerir, ◆: digeridas.

Para establecer la relación existente entre los resultados de permeabilidad observados y los complejos orgánicos de níquel presentes en la muestra se recurrió a

los datos de especiación teóricos obtenidos con el programa Winhumic V y que se muestran en la tabla III.2.

[AH], mg·l ⁻¹	[Ni ²⁺]·10 ⁶ , M	[NiCl ⁺]·10 ⁶ , M	[NiAH]·10 ⁶ , M
0	12,3	4,3	0
15	11,7	4,0	1,1
50	9,9	3,4	3,2
75	9,0	3,1	4,4
100	8,1	2,8	5,4

Tabla III.2. Datos teóricos de especiación de níquel para distintas concentraciones de ácidos húmicos.

Como se comentó en el capítulo II, las concentraciones de las especies Ni²⁺ y NiCl⁺ disminuyen con el aumento de la concentración de ácidos húmicos en la muestra, mientras que los complejos orgánicos de níquel aumentan de forma proporcional a la disminución observada en el coeficiente de permeabilidad.

Estos resultados podrían relacionarse con la existencia de complejos orgánicos que el sistema químico Ni-CHBBH no es capaz de extraer, es decir, complejos con constantes de formación lo suficientemente elevadas para no poder ser disociados para formar complejos con el 1,2-CHBBH y ser transportados por el sistema. Esto ya había sido observado en el sistema de extracción líquido-líquido, en el que aproximadamente el 50% de los complejos orgánicos formados no podían ser transportados.

Eficiencia de extracción

Una vez establecidas las condiciones óptimas de transporte, se determinó la eficiencia del sistema de membrana en términos de la variación temporal del porcentaje de níquel transportado a través de la membrana a lo largo de 24 horas, mostrándose en la figura III.7 los resultados obtenidos.

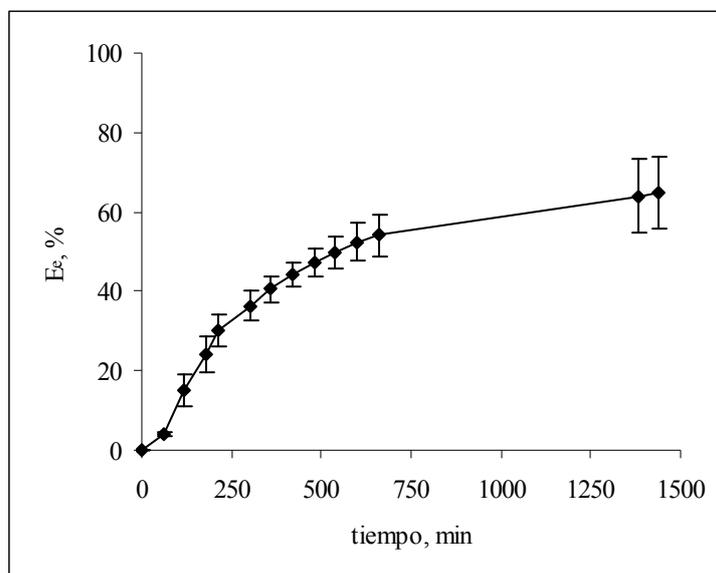


Figura III.7. Variación temporal de la eficiencia de extracción. Disolución acuosa: $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Ni; 0,25 M HEPES; pH 8; Disolución orgánica: 2,5 mM 1,2-CHBBH; Disolución receptora: 1,5 M HNO_3 .

Como se observa en la figura el porcentaje de extracción aumenta rápidamente durante las primeras horas de funcionamiento del sistema haciéndose el transporte mucho más lento a partir de las 6-7 horas, y prácticamente invariable para tiempos mayores a 9 horas. Por esta razón se seleccionó este tiempo como el necesario para conseguir los mayores porcentajes de extracción, alcanzando la eficiencia de la extracción un valor del 49,8%. Aunque para este tiempo el transporte prácticamente ha finalizado, no es posible extraer todo el níquel presente en la disolución cargada inicial.

Este hecho indica que existe una fracción de níquel en disolución que no llega hasta la disolución receptora, quedándose posiblemente en la disolución cargada o en la orgánica, probablemente por causas cinéticas. De hecho, un estudio realizado por Vajda y col. con un sistema de membrana de volumen parecido a éste, demostró que la velocidad del transporte del metal estaba determinada principalmente por la cinética de la reextracción del metal por la disolución receptora [6].

Cabe destacar que a partir de las tres horas de funcionamiento se observó en el sistema la aparición de un precipitado rojizo en la interfase cargada/orgánica del sistema, comprobándose experimentalmente que dicho precipitado estaba constituido por algún compuesto de níquel.

Mediante la realización de distintos blancos, uno de ellos sin reactivo extractante y otro sin ácido nítrico en la disolución receptora, se comprobó que el precipitado sólo aparecía cuando ambos compuestos estaban presentes en el sistema. Para evitar la aparición de este precipitado se probaron distintos ácidos en la disolución receptora comprobando que con ácido clorhídrico no se producía la precipitación de níquel. En este caso la variación de la eficiencia de extracción permanecía prácticamente idéntica a la observada cuando se utiliza ácido nítrico en la disolución receptora, finalizando el transporte a las 9 horas de funcionamiento con una eficiencia de extracción del 50,14%.

Una vez establecidas las condiciones que permitían un mejor transporte de níquel hasta la disolución receptora es posible resumir las condiciones óptimas de funcionamiento del sistema en la tabla III.3.

Disolución cargada	1 mg·l ⁻¹ Ni; 0,25 M HEPES; pH 8; 35 g·l ⁻¹ NaCl
Disolución orgánica	2,5 mM 1,2-CHBBH disuelto en tolueno al 2% DMF
Disolución receptora	1,5 M HCl
Velocidad de agitación	500 rpm
Tiempo	9 horas
E _e	50,14%

Tabla III.3. Condiciones óptimas del sistema Ni-CHBBH en membranas líquidas de volumen.

Efecto de los ligandos orgánicos

Finalmente se estudió el efecto de los ligandos orgánicos sobre la eficiencia de extracción, puesto que se observó que la permeabilidad disminuía proporcionalmente con la concentración de estos ligandos en la disolución cargada. Para ello se estudió la eficiencia de extracción a lo largo de 11 horas para distintas concentraciones de ácidos húmicos mostrándose los resultados obtenidos en la figura III.8 junto a los porcentajes obtenidos en ausencia de ácidos húmicos.

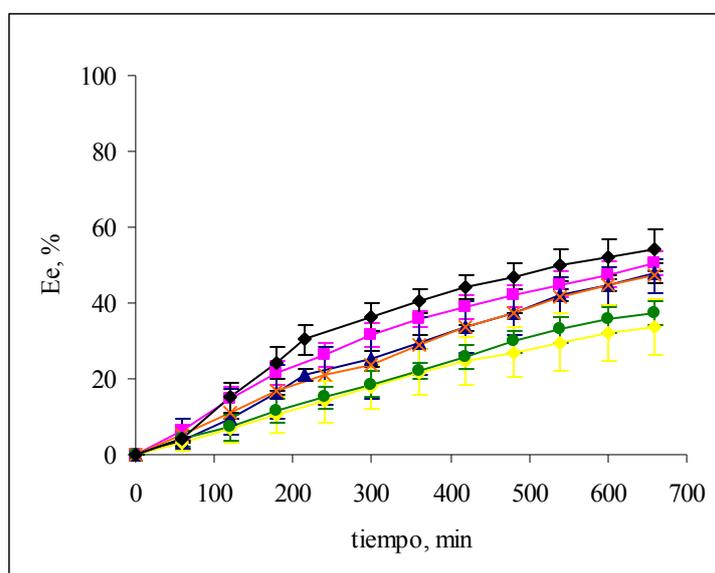


Figura III.8. Efecto de la concentración de ácidos húmicos en la eficiencia de extracción de níquel. Disolución acuosa: $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Ni, $0,25 \text{ M}$ HEPES, $35 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl, pH 8 ♦: sin ligandos, ■ : 0 ppm ácidos húmicos, ▲: 15 ppm ácidos húmicos, ×: 50 ppm ácidos húmicos, ◆: 75 ppm ácidos húmicos, ●: 100 ppm ácidos húmicos; Disolución receptora: $1,5 \text{ M}$ HCl; disolución orgánica: $2,5 \text{ mM}$ CHBBH.

Como se observa en la figura, la variación temporal de la eficiencia de la extracción es similar para las distintas concentraciones de ácidos húmicos, aunque los

valores de E_e disminuyen al aumentar la concentración de estos ligandos para cada tiempo, haciéndose esta diferencia más notable para tiempos mayores de extracción. Al igual que ocurre con el coeficiente de permeabilidad, esta disminución en el porcentaje de extracción a medida que aumenta el contenido de ácidos húmicos en la muestra se puede relacionar con la formación de complejos orgánicos de níquel que no serían transportados a través de la membrana.

Para establecer la relación existente entre los porcentajes de extracción observados y los complejos orgánicos de níquel presentes en la muestra se recurrió a los datos de especiación teóricos obtenidos con el programa Winhumic V que se muestran en la tabla III.4 junto con los porcentajes de eficiencia de la extracción para 9 horas de funcionamiento del sistema.

[AH], mg·l ⁻¹	[COD], mg·l ⁻¹	E_e , %	[Ni ²⁺]·10 ⁶ , M	[NiCl ⁺]·10 ⁶ , M	[NiAH]·10 ⁶ ,M
0	0	45,0 ± 3,5	12,3	4,3	0
15	3,7	42,1 ± 1,2	11,7	4,0	1,1
50	12,2	41,5 ± 5,2	9,9	3,4	3,2
75	18,6	29,5 ± 7,7	9,0	3,1	4,4
100	26,0	32,9 ± 6,6	8,1	2,8	5,4

Tabla III.4. Datos teóricos de especiación de níquel y eficiencias de extracción a 9 horas para distintas concentraciones de ácidos húmicos.

Al igual que en el estudio de la variación del coeficiente de permeabilidad, la concentración del complejo orgánico de níquel (NiAH) aumenta con el incremento de la concentración de ácidos húmicos en la muestra, mientras que la eficiencia de la extracción decrece de forma proporcional al aumento de dicha concentración de ligandos orgánicos en las muestras. De hecho estos resultados muestran una correlación lineal negativa entre la concentración de los complejos Ni-AH de la muestra y el porcentaje de E_e obtenido para 9 horas de extracción, con un coeficiente

de correlación de Spearman de -0,90 para un nivel de significación (α) de 0,05. Esta relación indicaría que existen complejos orgánicos que el sistema químico Ni-CHBBH no es capaz de extraer, es decir, estos complejos tienen constantes de formación lo suficientemente elevadas para no poder ser disociados para formar complejos con el 1,2-CHBBH y ser transportados por el sistema. Esto ya había sido observado en el sistema de extracción líquido-líquido, en el que aproximadamente el 50% de los complejos orgánicos formados no podían ser transportados.

Con estos resultados es posible además establecer una relación lineal entre la eficiencia de la extracción y la concentración de carbono orgánico disuelto (COD) en la muestra con un coeficiente de regresión lineal de 0,75, la cual se muestra en la ecuación III.5.

$$E_e (\%) = -0,5 [\text{COD}] + 44,7 \quad (\text{III.5})$$

De este modo, a partir de la medida de COD en la disolución receptora sería posible establecer cuál es la eficacia de extracción del sistema.

En vista de los resultados obtenidos parece posible realizar el transporte selectivo de algunas especies de níquel que podrían definirse como lábiles. Considerando este punto sería posible obtener la fracción lábil de níquel inicialmente presente en la muestra a partir de la medida de níquel en la disolución receptora a un tiempo determinado y teniendo en cuenta el porcentaje de extracción y la relación de volúmenes de la celda. Partiendo de este conocimiento inicial del sistema se realizó la aplicación del mismo a la especiación de níquel en aguas naturales utilizando para ello una celda con mayor relación de volúmenes. De este modo es posible obtener un mayor factor de preconcentración, necesario para la aplicación del sistema al análisis de muestras reales en las cuales la concentración de níquel puede llegar a ser menor a 1 ppb.

III.IV. BIBLIOGRAFÍA

1. Mendiguchía C., Moreno C., García-Vargas M., *Separation of heavy metals in seawater by liquid membranes: preconcentration of copper*, Separation Science and Technology, 37, 2337-2351, 2002.
2. Danesi P.R., Reichley-yinger L., *Origin and significance of the deviations from a pseudo first order rate law in the coupled transport of metal species through supported liquid membrane*, Journal of Membrane Science, 29, 195-206, 1986.
3. Tipping E., *Cation binding by humic substances*, Cambridge University Press, New York, U.S.A., 2002.
4. Mendiguchía C., Moreno C., García-Vargas M., *Determination of copper in seawater based on a liquid membrane preconcentration system*, Analytica Chimica Acta, 460, 35-40, 2002
5. López-López J.A., En: *Interacción atmósfera-hidrosfera: incidencia de los aportes atmosféricos y fluviales en la zona de influencia mareal del río Guadalquivir y estudio de la especiación química de contaminantes*, Tesis Doctoral, Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cádiz, Cádiz, cap. 3, 83-128, 2010.
6. Vajda M., Schlosser S., Kovacova K., *Pertraction of silver through bulk liquid membranes*, Chemical Papers, 54, 423-429, 2000.

CAPÍTULO IV

SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE FRACCIONES DE NÍQUEL EN AGUAS NATURALES CON MEMBRANAS LÍQUIDAS DE VOLUMEN

IV.I. INTRODUCCIÓN

Una vez confirmada la viabilidad del sistema químico Ni-CHBBH como herramienta de separación mediante membranas líquidas de volumen, se abordó la mejora de dicho sistema de membranas, con la finalidad de permitir la aproximación a la resolución de muestras reales de aguas naturales, en las que las concentraciones de níquel son menores a las utilizadas hasta el momento. Con esta finalidad, se diseñó una nueva celda de transporte, con dos objetivos fundamentales: por un lado se permitir un mayor factor de preconcentración, mediante la modificación de la relación de volúmenes, y por otro lado utilizar un material para su fabricación que permita minimizar la contaminación de la muestra durante su utilización, habiéndose utilizado en este caso materiales poliméricos fluorados, para asegurar la inalterabilidad de las diferentes fracciones de níquel presentes en la muestra.

Cabe recordar diversos aspectos referentes a las membranas líquidas, algunos de ellos ya abordados anteriormente. De este modo, al realizar estudios de especiación como los que se abordarán en este capítulo, es de gran importancia la propiedad de las membranas líquidas por lo que respecta a su funcionamiento como una técnica de no

equilibrio, donde la separación ocurre por un gradiente de potencial químico. Es por ello que la especiación será siempre dinámica, es decir va a existir una interconversión entre las especies naturalmente presentes en la muestra durante el proceso de separación [1], lo cual debe ser tenido en cuenta a la hora de interpretar los resultados de los estudios de especiación o fraccionamiento realizados.

Por otro lado, un aspecto común a las técnicas de separación de fracciones metálicas en aguas naturales es la necesidad de definir la “labilidad” de las especies presentes en el sistema [2]. Como se ha comentado en la introducción es posible definir las especies lábiles y no lábiles desde un punto de vista funcional u operacional, optando la mayoría de los investigadores por éste último, por lo que esta definición dependerá de la técnica de análisis utilizada y de las condiciones en las que se realizó el análisis. En este caso se plantea como hipótesis de trabajo la utilización de la membrana líquida conteniendo el extractante 1,2-ciclohexanodiona bisbenzoilhidrazona (1,2-CHBBH), como herramienta de discriminación de las especies lábiles de níquel presentes en el agua.

A la hora de establecer la validez de la metodología propuesta para separar fracciones de níquel en aguas naturales se recurrió no sólo cálculos de tipo teórico, sino a la comparación con los resultados obtenidos con metodologías de referencia bien establecidas. En este sentido se utilizó la voltamperometría de redisolución catódica adsorbtiva (AdCSV) para analizar la fracción lábil, ampliamente utilizada con este fin [3,4]. Para la determinación de los contenidos totales de níquel se utilizó la metodología tradicional basada en la extracción líquido-líquido con mezcla de carbamatos (APDC/DDDC) utilizada en oceanografía [5].

Por lo que respecta a la utilización de cálculos teóricos como apoyo a los estudios de especiación, cada vez son más robustos aquellos basados en la utilización de las constantes de formación de complejos [6-8]. En nuestro caso se realizaron comparaciones con datos calculados teóricamente mediante programas de especiación

química en equilibrio, como el WinHumic V [9]. El problema que conlleva esta última actuación es que los programas de especiación química devuelven datos de la distribución de las distintas especies formadas en el equilibrio y como se ha comentado anteriormente, las membranas líquidas son técnicas de no equilibrio, con lo que hay que entender que estos programas aportan información sobre aproximaciones teóricas simplificadas de los sistemas reales.

IV. II. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Como consecuencia del cambio de celda, se llevó a cabo una nueva optimización del sistema, realizándose en esta ocasión mediante una estrategia multivariante mediante el uso del simplex modificado, para tener en cuenta de este modo posibles interacciones entre las variables optimizadas [10]. Finalmente se estudió la influencia de la matriz real de agua de mar en el sistema y se aplicó el mismo a la separación y determinación de las fracciones lábiles y no lábiles de níquel en aguas naturales de distinta salinidad.

Al igual que en el capítulo anterior se expondrán primero las condiciones experimentales en las que se realizaron cada uno de los experimentos para la aplicación del sistema químico optimizado con 1,2-CHBBH como agente extractante a la determinación de las distintas fracciones de níquel en muestras de aguas naturales. Posteriormente se detallan los resultados obtenidos en estos experimentos.

Descripción de la celda

En primer lugar se trasladó el sistema optimizado en el capítulo anterior a una celda de teflón de mayores dimensiones, la cual se muestra en la figura IV.1, que permitía alcanzar un factor de volúmenes de 58,4, con 730 ml de muestra y 12,5 ml de disolución receptora. De este modo, se consiguen factores más altos que permiten el

análisis de las bajas concentraciones de níquel presentes en las aguas naturales. En este caso el volumen de disolución orgánica fue de 100 ml.



Figura IV.1. Celda de membrana líquida de volumen.

Al cambiar la relación de volúmenes entre las disoluciones también cambia la proporción de Ni:CHBBH, así como las condiciones hidrodinámicas del sistema, por lo que se consideró necesario una nueva optimización del sistema partiendo del conocimiento inicial del mismo. Aunque el sistema permite trabajar con concentraciones de níquel inferiores a $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ en la disolución cargada, las concentraciones utilizadas para el estudio de optimización fueron de $100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, ya que permitía trabajar con mayor rapidez al poder realizar los análisis mediante espectrometría absorción atómica con llama (F-AAS). Las demás condiciones de esta disolución se mantuvieron igual que en experimentos anteriores.

Optimización multivariante del sistema

La optimización del sistema con la nueva celda utilizada se realizó a través de una optimización multivariante mediante Simplex modificado, método introducido por Spendley en 1962 para realizar la optimización de resultados empíricos y que se explica en detalle en el Anexo A.5 [10]. En este caso, las variables utilizadas para llevar a cabo la optimización fueron la concentración de agente extractante disuelto en la disolución orgánica y la concentración de ácido en la disolución receptora. En la tabla IV.1 se recogen los valores de referencia y el tamaño de paso para cada una de las variables estudiadas en el proceso.

Variables	Valor de referencia	Tamaño de paso
[1,2-CHBBH], mM	1	0,5
[HCl], M	0,5	0,5

Tabla IV.1. Condiciones iniciales del Simplex.

Las respuestas se cuantificaron mediante el valor del coeficiente de permeabilidad calculado en este caso para cuatro horas de extracción, ya que en la celda de mayores dimensiones la difusión del metal será más lenta y es necesario un tiempo de extracción mayor para calcular correctamente la pendiente de la recta. Para ello se tomaron alícuotas de la disolución receptora cada hora y se midió en ellas el níquel extraído mediante F-AAS.

Blancos del sistema

Una vez optimizado el sistema químico, se realizó el estudio de los blancos de extracción para poder cuantificar la posible contaminación introducida en el sistema tanto por los reactivos utilizados como por el propio montaje de las celdas. Para ello, se realizaron dos réplicas de cada experimento en condiciones de extrema limpieza en una

sala blanca clase 10.000 y se tomaron alícuotas de la disolución receptora cada hora entre las 7 y las 11 horas de extracción, tomando dos últimas alícuotas de control a las 23 y 24 horas. Estas muestras fueron medidas por espectrometría de absorción atómica con horno de grafito (GF-AAS), debido a las bajas concentraciones que presentaban las alícuotas. Las condiciones utilizadas para llevar a cabo estos análisis se recogen en la tabla IV.2.

Etapas	Temperatura, °C	Tiempo, s	Rampa, s	Flujo argón l·min ⁻¹
Secado	100	30	10	0,2
Secado	130	20	30	0,2
Calcinación	1000	20	150	0,2
Atomización	2400	3	0	0
Limpieza	2600	3	0	0,2

Tabla IV.2. Condiciones de funcionamiento del horno de grafito.

Eficiencia de extracción

Una vez seleccionadas las condiciones óptimas de funcionamiento del sistema se estudió la eficiencia de la extracción a lo largo del tiempo para establecer los factores de preconcentración y el tiempo de extracción. Para ello se utilizó una muestra real, Muestra 1, procedente de la Bahía de Cádiz, (ver Anexo A.6 para protocolos de muestreo). Dicha muestra fue digerida con radiación ultravioleta para destruir los posibles complejos orgánicos presentes en la muestra y se dopó con 5 µg·l⁻¹ de níquel para su posterior análisis. En este caso, no se adicionó el tampón utilizado en las disoluciones sintéticas, ya que al ser una muestra de agua de mar real ya contiene su propio sistema regulador de carbonato/bicarbonato.

Para obtener los porcentajes de eficiencia de la extracción a lo largo del tiempo se realizó un experimento de extracción durante 24 horas, tomando alícuotas de 1 ml cada hora durante las primeras 11 horas que eran sustituidas por el mismo volumen de

disolución receptora. Las alícuotas se analizaron por GF-AAS y se utilizó el porcentaje de la eficiencia de la extracción descrito anteriormente (ecuación III.4).

Posteriormente se realizó el estudio del efecto de los ligandos naturales más abundantes sobre la eficacia del transporte. En este caso, teniendo en cuenta que las distintas concentraciones de cloruros habían demostrado no influir sobre el transporte de níquel a través de la membrana líquida, sólo se evaluó el efecto de los ligandos orgánicos, utilizándose la misma muestra real dopada que en el caso anterior. Para realizar los experimentos se añadieron diferentes concentraciones de la sal de ácido húmico a la muestra en el rango de concentraciones de 11,3 a 42,4 mg·l⁻¹, que corresponde a un rango de 3,97 a 12,58 mg·l⁻¹ de COD, representativo de los niveles presentes en las aguas naturales [11]. La eficiencia de la extracción fue cuantificada al igual que en el caso anterior a lo largo de 24 horas analizando alícuotas de disolución receptora cada hora durante las primeras 11 horas de extracción.

A la vista de los resultados se seleccionó el tiempo necesario para realizar la extracción y se calcularon los factores de preconcentración en función del COD de la muestra para su aplicación en la determinación de las distintas fracciones de níquel tal y como se recoge en los apartados posteriores.

Separación y determinación de distintas fracciones de níquel

Para este estudio se utilizaron distintas muestras reales procedentes del litoral gaditano, cuyas características se detallan en el anexo A.6 junto con el procedimiento empleado en la toma de las mismas. Estas muestras fueron analizadas por duplicado mediante el sistema de membrana líquida de volumen propuesto y se calculó el contenido total y las fracciones lábiles y no lábiles a partir de los factores de preconcentración obtenidos anteriormente. Para comprobar la validez del método se tomaron porciones de muestra para la determinación de los contenidos totales y de la fracción lábil mediante técnicas bien establecidas. Para el caso de contenidos totales se

utilizó una extracción con APDC/DDDC y posterior determinación con ICP-MS [5] y para la fracción lábil se recurrió a la AdCSV [12]. Ambos procedimientos se detallan en el anexo A.7. Para establecer si existían diferencias significativas entre los resultados obtenidos con el método de membrana líquida y los obtenidos con los métodos de referencia se realizó el test-t de Student para la comparación de dos valores experimentales recogido en el anexo A.8.

Además, se ha realizado la comparación de los resultados obtenidos mediante el sistema de membrana líquida de volumen propuesto con los calculados con programas químicos de especiación. Para ello, se han definido las distintas fracciones presentes en las muestras reales analizadas con el sistema de membrana y por otro lado se han calculado teóricamente haciendo uso del programa WinHumic V. De este modo, es posible comparar las predicciones teóricas con las observadas experimentalmente. Para realizar dicha comparación se ha utilizado el test estadístico t de Student de comparación de un valor experimental con un valor de referencia para un nivel de probabilidad del 95 % que se detalla en el anexo A.8.

IV.III. RESULTADOS

Optimización multivariante del sistema

En primer lugar se trasladó directamente el sistema químico optimizado a la nueva celda y se evaluó el porcentaje de extracción obtenido a lo largo del tiempo. Para ello, se mantuvo la relación Ni:CHBBH que teníamos en la anterior celda, la cual suponía una concentración de 1,2-CHBBH en la disolución orgánica de 2,7 mM. Los resultados obtenidos son los que aparecen en la figura IV.2.

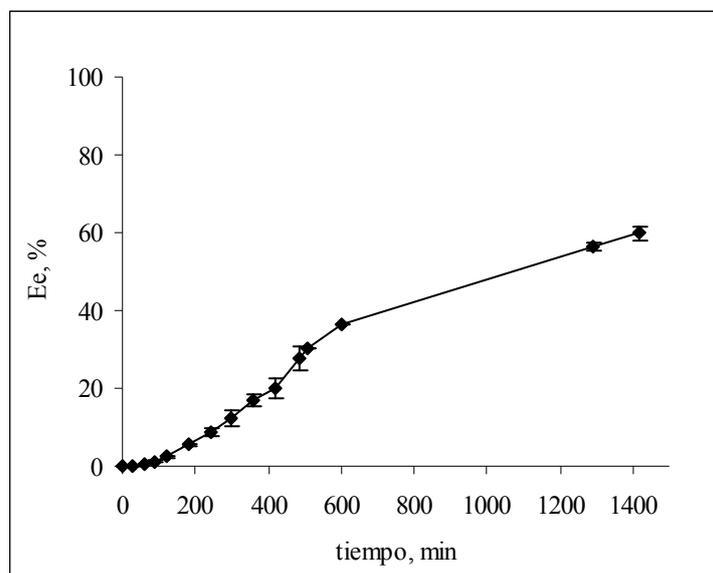


Figura IV.2. Variación temporal de la eficiencia de la extracción. Disolución cargada: $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Ni; $0,25 \text{ M}$ HEPES; $35 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; pH 8; Disolución receptora: $1,5 \text{ M}$ HCl; Disolución orgánica: $2,7 \text{ mM}$ CHBBH.

En la figura IV.2 se puede observar que el transporte de níquel fue más lento que para la celda más pequeña probablemente debido al mayor volumen de disolución orgánica que dificulta el proceso de difusión al tener que realizar el complejo formado Ni-CHBBH un mayor recorrido desde la interfase con la disolución cargada a la receptora. Sin embargo, una vez alcanzado el equilibrio la eficiencia de la extracción alcanza el 60% como se comprobó con las muestras de control a las 23 y 24 horas. De hecho, con la nueva celda disminuye ligeramente el porcentaje de extracción a 9 horas, que es de sólo un 30,3% frente al 50,1% obtenido con la otra celda.

Para intentar aumentar este porcentaje, se procedió a realizar de nuevo la optimización química e hidrodinámica del sistema con la nueva celda a través del estudio del coeficiente de permeabilidad.

Por lo que respecta a los aspectos hidrodinámicos, para una velocidad de agitación a 600 rpm se observó un ligero aumento en los coeficientes de permeabilidad,

aunque con un aumento considerable de la desviación estándar, probablemente debido a la posible mezcla de fases en algunos experimentos. Para velocidades mayores se produce la ruptura de la membrana, y la consiguiente mezcla de ambas disoluciones acuosas, por lo que se mantuvo una agitación de 500 rpm para los siguientes experimentos.

Como se ha comentado en el desarrollo experimental, la optimización química del sistema se realizó a través del método Simplex modificado, siendo las variables estudiadas la concentración de agente extractante y la concentración de ácido en la disolución receptora, y la respuesta a optimizar el coeficiente de permeabilidad a cuatro horas de funcionamiento del sistema. En la tabla IV.3 se muestran los distintos experimentos realizados para optimizar el sistema y el valor de respuesta obtenido.

Vértices	Tipo	[HCl], M	[1,2-CHBBH], mM	$P \cdot 10^3$, $\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$	SD
1	I	0,50	1,00	1,73	0,32
2	I	1,00	1,00	2,53	0,38
3	I	0,75	1,44	1,98	0,01
4	R	1,25	1,44	1,77	0,10
5	C	1,06	1,33	2,85	0,45
6	R	1,31	0,89	2,11	0,22
2'	2'	1,00	1,00	1,98	0,28
7	R	1,38	1,22	1,90	0,08
8	C	1,09	1,05	2,07	0,28
5'	5'	1,06	1,33	1,88	0,03

Tabla IV.3. Valores del Simplex modificado utilizado para la optimización química del sistema. I: vértices iniciales, R: reflexión, C: contracción. ' Vértice reevaluado.

Tanto los valores de permeabilidad como de desviaciones estándar han sido calculados a partir de dos réplicas del mismo experimento. El simplex se paró después de ocho experimentos mediante la prueba F que compara la varianza del último simplex con la estimada para el método, siendo la del método de 0,010 para tres réplicas y la del último simplex de 0,015, y por lo tanto el valor de F fue de 1,50, menor que el valor crítico de F (2,00) para un valor de significación $p = 0,67$.

El valor máximo del coeficiente de permeabilidad se obtuvo para el vértice 6, correspondiente a una concentración de 1,2-CHBBH de 0,89 mM y 1,3 M de HCl. Con estas condiciones se realizó el estudio de la variación temporal de la eficiencia de la extracción. Como se observa en la figura IV.3, no hubo diferencias en los porcentajes de extracción para las nuevas condiciones y los obtenidos con el sistema inicial.

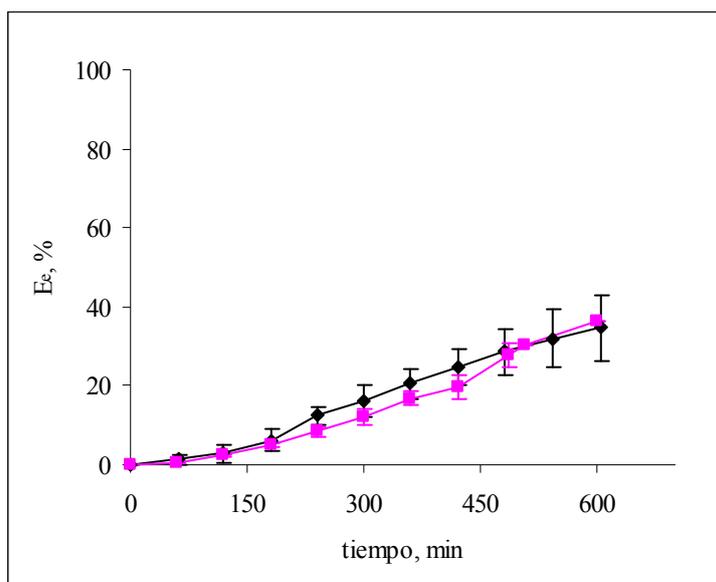


Figura IV.3. Variación temporal de la eficiencia de la extracción. ♦: Condiciones iniciales ■: Condiciones optimizadas

Sin embargo la optimización ha permitido reducir la concentración de reactivo orgánico y ácido clorhídrico sin reducir la eficiencia de extracción además de mejorar la reproducibilidad del sistema.

De este modo las condiciones de funcionamiento del sistema en la nueva celda se pueden resumir en la tabla IV.4.

Disolución orgánica	[1,2-CHBBH] = 0,89 mM disuelto en tolueno 2 % DMF
Disolución receptora	1,3 M HCl
Agitación	500 rpm
Tiempo	9 horas
E _e	31,9

Tabla IV.4. Condiciones optimizadas para la celda con mayor factor de volumen (58,4).

Blancos del sistema

Antes de evaluar el efecto de los ligandos orgánicos en el sistema se procedió a realizar el estudio de los blancos para asegurar la correcta cuantificación de las muestras reales. Para ello se aplicó el sistema a muestras sintéticas sin metal para determinar la concentración de níquel que proviene de los reactivos utilizados y del montaje del sistema. La concentración de níquel obtenida inicialmente presentó un valor de $10,68 \pm 1,38 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, el cual resultaba demasiado elevado para la aplicación del sistema a muestras reales, y que era probablemente debido a la contaminación que introducían los reactivos, principalmente el NaOH y el HEPES usados para regular el pH en la disolución cargada. Para reducir este valor se decidió realizar los experimentos en una sala blanca clase 10.000 y con reactivos de alta pureza. Además, a la disolución orgánica se le realizó una limpieza mediante extracciones con una disolución ácida de la misma concentración que la disolución receptora, siguiendo el protocolo que aparece en el anexo A.9. Con este procedimiento se consiguió reducir la

contaminación medida en la disolución receptora a un valor de $5,98 \pm 2,88 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de níquel.

Posteriormente se realizaron blancos sin tampón, ya que las aguas naturales poseen su propio sistema regulador del pH carbonato/bicarbonato y no es necesaria la adición de HEPES, como se comprobó controlando el pH de una muestra real a lo largo de 8 horas de extracción sin que se observara ninguna modificación en el mismo.

De este modo, para preparar el blanco se utilizó agua desionizada como disolución cargada. Además, con el objeto de disminuir al máximo la contaminación de níquel se realizó un protocolo de limpieza de todo el material utilizado junto con la limpieza de la disolución orgánica expuesta anteriormente. Estos protocolos de limpieza se encuentran en los anexos que aparecen al final de la tesis (anexos A.9 y A.10). Bajo estas condiciones se realizaron dos réplicas del blanco de extracción en la sala blanca obteniendo una concentración de níquel en la disolución receptora de $0,41 \pm 0,26 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, mucho más adecuado para aplicar el sistema al análisis de muestras reales. Todos los experimentos que se detallan a continuación, tanto para el estudio del efecto de los ligandos como para la aplicación a muestras reales, se realizaron en las mismas condiciones que estos blancos, es decir, sin añadir reactivos para ajustar el pH de la muestra y en condiciones de extrema limpieza.

Eficiencia de extracción

Con vistas a aplicar el sistema al análisis de muestras reales se estudió la variación de la eficiencia de la extracción (E_e) a lo largo del tiempo utilizando una muestra de agua de mar real digerida con radiación UV y dopada con $5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de níquel para diferentes concentraciones de COD. De este modo, se trata de establecer una relación entre ambas variables que permita obtener, a partir de la medida del COD, el valor de E_e a aplicar para calcular la concentración de níquel en la muestra a partir de la concentración de níquel medida en la disolución receptora. Para ello se añadieron

distintas concentraciones de la sal de ácidos húmicos para conseguir la concentración deseada de carbono orgánico disuelto en el rango típico de las aguas naturales 0-12 mg·l⁻¹ [13].

En primer lugar cabe destacar que, tal como muestra la figura IV.4, la matriz real no afecta a la eficiencia de la extracción de níquel con el sistema utilizado si lo comparamos con la obtenida en la muestra sintética (figura IV.3).

Por otro lado, se observa una disminución del porcentaje de reextracción de níquel conforme aumenta la concentración de carbono orgánico disuelto de la muestra. Sin embargo, independientemente de la concentración de COD, a las nueve horas parece que el transporte ha finalizado prácticamente, por lo que se eligió éste como el tiempo necesario para realizar la extracción.

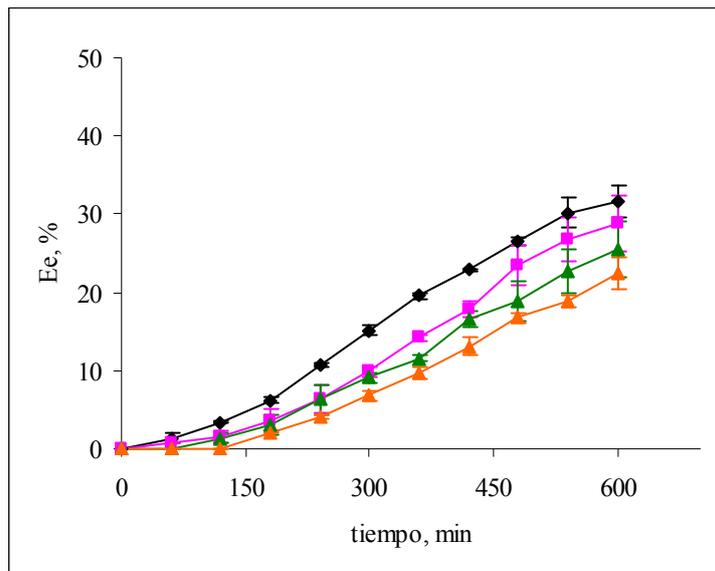


Figura IV.4. Efecto de la concentración de COD en la variación temporal de la eficiencia de la extracción. Disolución receptora: 1,3 M HCl; Disolución orgánica: 0,89 mM CHBBH; Disolución cargada: muestra real digerida, 5 µg·l⁻¹ Ni²⁺ ◆: 0 mg·l⁻¹ COD, ■: 3,97 mg·l⁻¹ COD, ▲: 8,71 mg·l⁻¹ COD, ◆: 12,58 mg·l⁻¹ COD.

A partir de los datos de la especiación teórica para las distintas concentraciones de COD que aparecen en la tabla IV.5, se observa que los complejos orgánicos formados aumentan proporcionalmente al aumentar la concentración de COD en la muestra.

[COD], mg·l ⁻¹	E _e , %	[Ni ²⁺]·10 ⁸ , M	[NiCl ⁺]·10 ⁸ , M	[NiAH]·10 ⁸ , M
0	30,15 ± 1,95	6,34	2,13	0
3,97	26,82 ± 0,66	5,46	1,84	1,18
8,71	22,71 ± 2,73	4,74	1,59	2,16
12,58	18,85 ± 0,75	4,27	1,44	2,78

Tabla IV.5. Datos de especiación teóricos para distintas concentraciones de COD y eficiencias de extracción a 9 horas.

Este aumento de complejos orgánicos se corresponde a su vez con un descenso de la eficiencia de la extracción, tal y como se observa en la figura IV.5, siendo posible por tanto establecer una correlación lineal negativa entre ambas variables con un coeficiente de correlación de Spearman de -1,00.

Como se comentó anteriormente, estos resultados indican que existe una fracción de níquel que no es transportada por el agente extractante relacionada con la formación de complejos orgánicos que no pueden ser transportados a través de la membrana, lo que permitiría aplicar el sistema para separar distintas fracciones de níquel que pueden ser además cuantificadas como se explica en el apartado siguiente.

Este comportamiento ha sido descrito anteriormente por Bayen y col. para un sistema de membranas líquidas utilizando un éter corona como agente extractante, pudiendo diferenciar entre la cantidad de níquel libre y la que se encontraba formando complejos orgánicos, debido a que el flujo de níquel a través de la membrana, y como consecuencia la permeabilidad, era proporcional a la cantidad de níquel libre presente en la muestra [14].

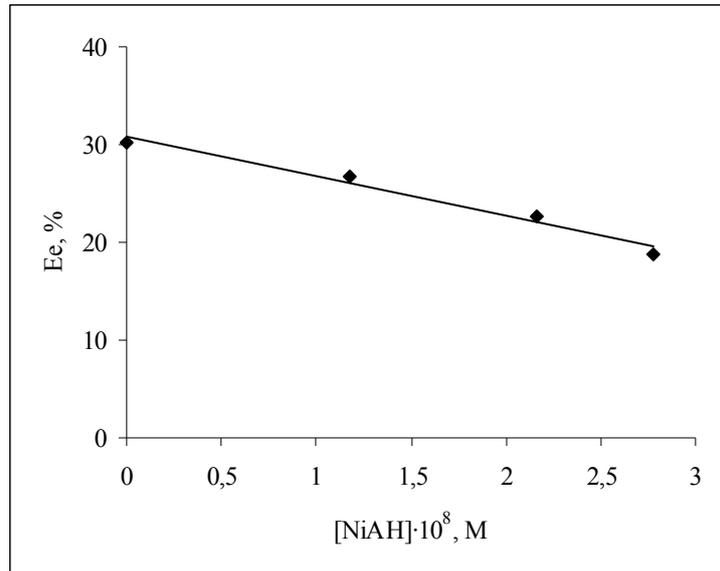


Figura IV.5. Relación entre la concentración de complejos orgánicos (NiAH) y la eficiencia de la extracción a 9 horas. Disolución cargada: muestra real digerida, $5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Ni; Disolución receptora: 1,3 M HCl; Disolución orgánica: 0,89 mM CHBBH.

De hecho, en el sistema de membrana líquida que aquí se propone también se ha observado esta relación lineal entre el coeficiente de permeabilidad calculado a cuatro horas y la concentración de la especie Ni^{2+} , tal y como muestra la figura IV.6.

Del mismo modo que para los complejos orgánicos es posible establecer una relación lineal entre la concentración de DOC en la muestra y la eficiencia de la extracción obteniendo mediante un ajuste de mínimos cuadrados la ecuación IV.1.

$$\% E_e = -1,147 [\text{COD}] + 30,885 \quad (\text{IV.1})$$

De este modo, esta ecuación proporcionará el valor de la eficiencia de extracción que le corresponderá a cada muestra a través de la medida de concentración de COD en la misma. A partir de la medida de níquel en la disolución receptora y

haciendo uso del valor de la eficiencia de extracción calculado será posible obtener la cantidad de níquel total presente inicialmente en la muestra, tal y como se explica en detalle en un apartado posterior.

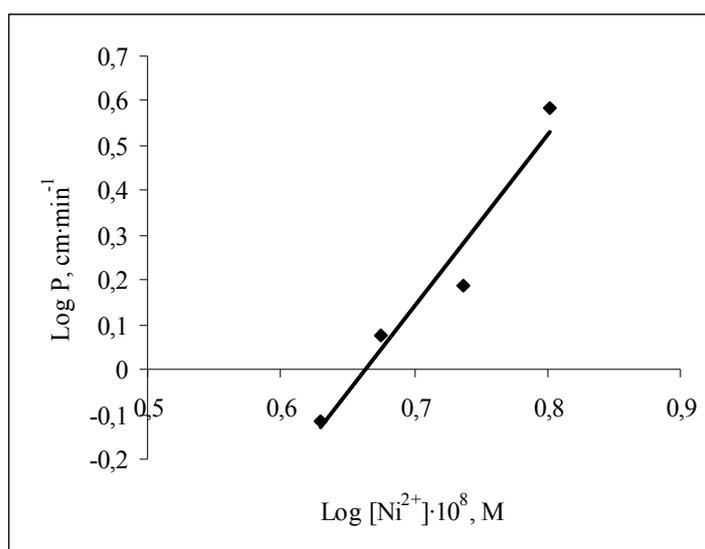


Figura IV.6. Efecto de la concentración de la especie Ni^{2+} en la permeabilidad. Disolución cargada: muestra real, $5 \mu g \cdot l^{-1}$ Ni, $[DOC]= 3,97-12,58 \text{ mg} \cdot l^{-1}$; Disolución receptora: 1,3 M HCl; Disolución orgánica: 0,89 mM CHBBH..

Aplicación del sistema a la determinación de distintas fracciones de níquel

Para realizar este estudio se utilizaron tres muestras de aguas naturales, dos de agua de mar y una de agua de río tomadas en la Bahía de Cádiz (anexo A.6). El análisis de especiación de dichas muestras se realizó haciendo uso del método optimizado de membrana líquida y posteriormente se comparó con las dos técnicas de referencia comentadas anteriormente.

Para realizar la determinación de las distintas fracciones de níquel en las muestras reales se ha considerado como fracción lábil aquella que puede ser

transportada a través de la membrana, mientras que la fracción no-lábil sería la que permanece en la disolución cargada (muestra) una vez finalizada la extracción. De este modo cada una de las distintas fracciones puede ser obtenida tal y como se recoge en la figura IV.7 y que se explica en detalle a continuación.

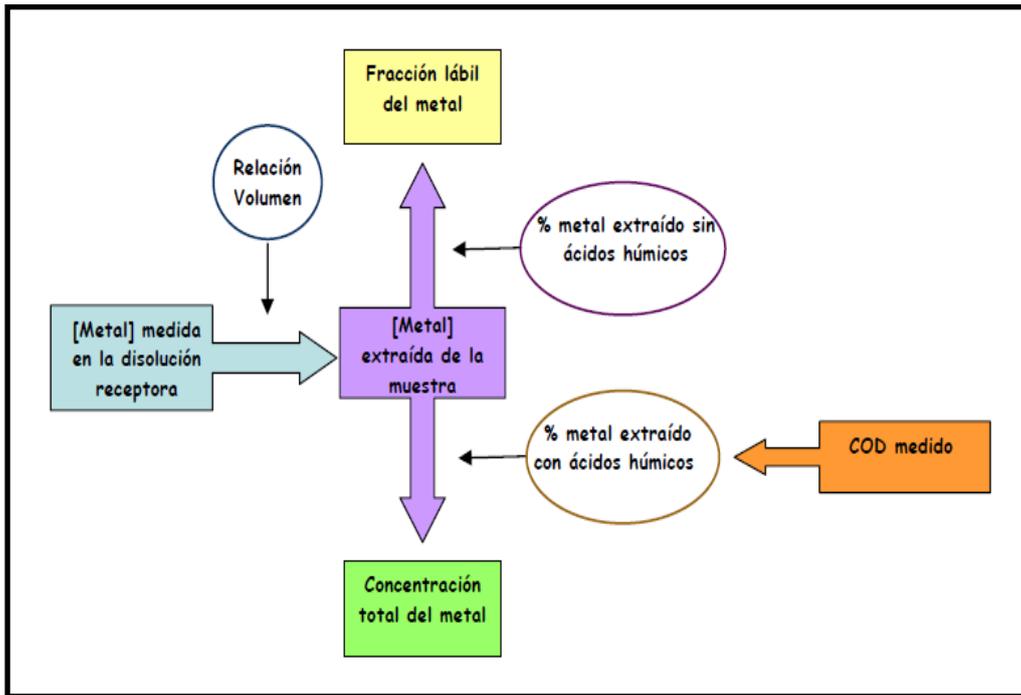


Figura IV.7. Determinación de las distintas especies de níquel en aguas naturales con el sistema de membrana líquida propuesto.

1. Obtención de la fracción lábil de níquel

Como se ha dicho anteriormente esta fracción corresponde a la que puede ser transportada a través de la membrana. Para poder calcular su concentración en la muestra a partir de la concentración medida en la disolución receptora, donde ha sido preconcentrada, es necesario tener en cuenta cuál es el porcentaje de extracción

obtenido en ausencia de ácidos húmicos para 9 horas (30,15%), ya que ese porcentaje se refiere al níquel que es lábil que puede ser transportado en ese tiempo puesto que no existen otros tipos de complejos. De este modo, con este valor y el factor de volúmenes de la celda (58,4) obtendremos el factor de preconcentración ($FP_{\text{lábil}}$) que tenemos que aplicar para determinar la fracción lábil de níquel como se recoge en la ecuación IV.2.

$$FP_{\text{lábil}} = FV \cdot \% E_{e(\text{sin ligandos})} \quad (\text{IV.2})$$

Esto supone un $FP_{\text{lábil}}$ de 17,61, es decir, el níquel lábil presente en la muestra se preconcentra 17,61 veces en la disolución receptora. Para calcular la concentración de níquel lábil presente en la muestra será necesario dividir la concentración de níquel medida en la disolución receptora entre este factor de preconcentración.

2. Obtención de la concentración de níquel total

Como se ha explicado anteriormente, es posible obtener la concentración de níquel total a partir de los porcentajes de extracción obtenidos en presencia de ácidos húmicos. Para conocer qué porcentaje de extracción es necesario aplicar (E_e^*), en primer lugar hay que analizar el contenido de COD en la muestra siguiendo el protocolo descrito en el Anexo A.4 y aplicar la relación lineal calculada anteriormente para ambas variables (ecuación IV.2). Una vez hecho esto, se calcula el factor de preconcentración para determinar el níquel total presente en la muestra a partir de la relación de volúmenes y de la E_e^* calculada de modo similar al descrito anteriormente para la fracción lábil, tal y como muestra la ecuación IV.3. Aplicando dicho factor a la concentración de níquel medido en la disolución receptora se calcula la concentración de níquel total en la muestra.

$$FP_{\text{total}} = FV \cdot \% E_e^* \quad (\text{IV.3})$$

3. Obtención de la fracción no lábil de níquel

Por último esta fracción es posible estimarla a partir de la diferencia entre el níquel total y la fracción lábil.

De este modo, como muestra la figura IV.7, es posible obtener la concentración de las distintas fracciones a partir de una única preconcentración con el sistema de membranas analizando previamente el COD.

Determinación de las distintas fracciones de níquel en muestras reales

Para cada una de las muestras reales se realizó por duplicado un experimento de preconcentración en sala blanca durante 9 horas, tras las cuales se tomó la disolución receptora y se analizó el níquel mediante GF-AAS, determinando las distintas fracciones mediante el procedimiento explicado anteriormente. Simultáneamente se realizaron análisis de la concentración de níquel total y de la fracción lábil en las muestras mediante las metodologías de referencia descritas anteriormente, para comprobar así nuestra hipótesis inicial sobre la aplicabilidad de las membranas líquidas como herramienta de especiación. Los resultados de ambas determinaciones se muestran en las tablas IV.6 y IV.7 para los contenidos totales y para la fracción lábil respectivamente.

A partir de los resultados que aparecen en las tablas se deduce que el sistema propuesto funciona adecuadamente para la determinación tanto del contenido de níquel total en la muestra como para la fracción lábil, obteniendo errores inferiores al 5% cuando se comparan los resultados con aquellos obtenidos a partir de los métodos de referencia. De hecho, al realizar una comparación entre el método propuesto y los de referencia con un test t de Student para la comparación de dos medias experimentales,

se estableció que no existían diferencias significativas entre los resultados calculados por ambos métodos para un nivel de confianza de 0,05.

Níquel total							
Muestra	Salinidad g·l ⁻¹	[COD], mg·l ⁻¹	Método de referencia μg·l ⁻¹ *	Membrana líquida μg·l ⁻¹	ε, %	t	Test t**
1	32,7	3,11	0,73 ± 0,01	0,73 ± 0,02	0,0	0,0	Aceptado
2	28,9	3,46	1,40 ± 0,05	1,39 ± 0,05	0,7	0,2	Aceptado
3	1,0	7,04	2,12 ± 0,16	2,04 ± 0,08	3,8	0,6	Aceptado

* Extracción APDC/DDDC y medida con ICP-MS; ** $t_3 = 3,18$ ($\alpha = 0,05$).

Tabla IV.6. Concentración de níquel total en las muestras reales. ε: error relativo.

Níquel lábil							
Muestra	Salinidad g·l ⁻¹	[COD], mg·l ⁻¹	Método de referencia μg·l ⁻¹ *	Membrana líquida μg·l ⁻¹	ε, %	t	Test t**
1	32,7	3,11	0,65 ± 0,05	0,66 ± 0,02	1,5	0,3	Aceptado
2	28,9	3,46	1,22 ± 0,08	1,25 ± 0,04	-2,5	0,5	Aceptado
3	1,0	7,04	1,58 ± 0,24	1,63 ± 0,07	3,2	0,3	Aceptado

* CLEM AdCSV ** $t_3 = 3,18$ ($\alpha = 0,05$).

Tabla IV.7. Concentración de níquel lábil en las muestras reales. ε: error relativo.

De este resultado se deduce que la fracción lábil medida con el sistema de membrana líquida se corresponde con la determinada con CLEM-AdCSV, la cual se relaciona con la fracción de níquel libre más la que se encuentra formando complejos metálicos inorgánicos y orgánicos débiles [15]. Como se ha dicho previamente, esta fracción representa aquella más disponible para los organismos vivos y por tanto posee un potencial de toxicidad mayor.

Comparación con modelos de especiación teóricos

Finalmente se compararon las concentraciones de las diferentes fracciones de níquel medidas con el sistema de membranas con los cálculos teóricos de las mismas a partir del programa de especiación química WinHumic V. Para ello, se introdujeron en el software el valor de concentración de níquel presente en las muestras medido con el sistema de membranas propuesto, así como los valores de cloruros y sodio determinados a partir de la salinidad de la muestra y el COD. Para calcular la clorinidad de la muestra se usó la ecuación IV.4 [16].

$$\text{Salinidad} = 1,80655 \cdot \text{Clorinidad} \quad (\text{IV.4})$$

En la tabla IV.8 se resumen los valores introducidos en el programa para obtener la especiación teórica del níquel en cada muestra.

Muestra	$[\text{Ni}^{2+}] \cdot 10^8, \text{ M}$	$[\text{Cl}^-], \text{ M}$	$[\text{Na}^+], \text{ M}$	pH	$[\text{COD}], \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$	$[\text{AH}], \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
1	1,25	0,51	0,51	8,06	3,11	10,7
2	2,37	0,45	0,45	7,68	3,37	11,49
3	3,48	0,016	0,02	7,58	7,04	22,83

Tabla IV.8. Datos usados en el programa WinHumic V para obtener la especiación teórica de las muestras reales.

Los cálculos realizados para las distintas fracciones de níquel medidas experimentalmente con el sistema de membrana líquida de volumen propuesto que aparecen en la tabla IV.6 y IV.7 se compararon con los datos teóricos de estas fracciones que se muestran en la tabla IV.9. Los datos completos de la especiación teórica se recogen en el anexo A.11.

Muestra	[COD], mg·l ⁻¹	[NiAH]·10 ⁹ , M	[Ni ²⁺]·10 ⁹ , M	[NiCl ⁺]·10 ⁹ , M
1	3,11	1,49	8,28	2,65
2	3,46	2,12	16,7	4,88
3	7,04	0,34	0,74	0,02

Tabla IV.9. Concentraciones teóricas de las especies mayoritarias en las muestras reales.

Las fracciones lábiles y no lábiles de níquel se calcularon a partir de los datos teóricos de la siguiente manera:

- Fración lábil teórica: determinada como la suma de las concentraciones teóricas de las especies Ni²⁺, NiCl⁺, NiOH⁺ y Ni(OH)₂.
- Fración no lábil teórica: determinada como la suma de las concentraciones del complejo NiAH y del Ni presente en la capa de difusión de la molécula de ácido húmico.

En la tabla IV.10 se recoge la comparación mediante la prueba t-student de los resultados obtenidos con la metodología de membranas líquidas propuesta junto con los obtenidos teóricamente con el programa de especiación WinHumic V.

	Muestra	MLV, μg·l ⁻¹	WinHumic V, μg·l ⁻¹	ε, %	t	Test t*
Lábil	1	0,66 ± 0,02	0,65	-1,5	0,7	Aceptado
	2	1,25 ± 0,04	1,27	1,6	0,7	Aceptado
	3	1,63 ± 0,07	0,04	100	32,1	Rechazado
No-lábil	1	0,07 ± 0,01	0,09	22,2	2,8	Aceptado
	2	0,14 ± 0,05	0,12	-16,7	0,6	Aceptado
	3	0,41 ± 0,02	2,00	79,5	112,4	Rechazado

* t₁=12,71 (α = 0,05)

Tabla IV.10. Comparación entre la especiación teórica y la obtenida con el sistema de MLV propuesto para las muestras reales.

Como se puede observar, los datos experimentales se corresponden con los teóricos predichos por el programa de especiación para las muestras salinas 1 y 2. Sin embargo para la muestra 3 que es de agua dulce los valores de las concentraciones de las distintas fracciones de níquel no coinciden. De hecho, al aplicar la prueba t de Student de contraste de una media experimental con un valor conocido se observa que no existen diferencias significativas entre los datos teóricos y los experimentales excepto en el caso de la muestra de agua dulce. Este comportamiento puede ser debido a la baja fuerza iónica de la muestra no salina, ya que en el modelo V utilizado por el programa WinHumic V, la compensación de las cargas electrostáticas del sistema se realiza a través de la denominada capa de difusión de la sustancia húmica que se encontraría alrededor de la molécula y donde van a residir los contraiones. De este modo, si la concentración de contraiones en la muestra no es suficiente para compensar dicha carga, este modelo tiende a sobreestimar la proporción de cationes níquel enlazados a las sustancias húmicas. De hecho, Chakraborty y col. detectaron esta limitación en el modelo VI al predecir la especiación de los metales Co, Ni, Cu y Zn en efluentes de minas diluidos, ya que los resultados obtenidos experimentalmente no se ajustaban correctamente con los datos predichos por el modelo, debido a un cambio en la conformación de la molécula de COD dejando más accesibles los sitios de enlace de la molécula húmica [17].

Posteriormente se estudió la posibilidad de realizar la diferenciación entre las especies mayoritarias del sistema, Ni^{2+} , NiCl^+ y NiAH a partir de los resultados obtenidos con la membrana líquida de volumen y los cálculos teóricos del programa de especiación. Para ello se realizaron las siguientes aproximaciones sólo para el caso de las muestras salinas, ya que para la no salina los cálculos teóricos no resultan adecuados.

- Especie NiCl^+ : esta especie se obtiene a partir de los datos teóricos de WinHumic V que nos indican la proporción de NiCl^+ en cada muestra.

- Especie Ni^{2+} : en este caso se calcula un nuevo factor de preconcentración para esta especie teniendo en cuenta la concentración de la especie NiCl^+ calculada anteriormente y los resultados cuando existen ácidos húmicos en el sistema. Para ello se calcula el E_e mediante la ecuación IV.5.

$$E_{e_{\text{Ni}^{2+}}} = \frac{m_t}{m_{c_0} - m_{\text{NiCl}^+}} \cdot 100 \quad (\text{IV.5})$$

Donde m_t es la masa transportada de níquel a través de la membrana a cada tiempo estudiado, m_{c_0} es la masa de níquel inicial en la disolución cargada, m_{NiCl^+} la masa de níquel calculada a través del valor de su proporción en la muestra con el programa WinHumic V.

- Especie NiAH : calculada como la fracción no lábil con la membrana líquida de volumen, que era calculada como la diferencia entre las fracciones total y lábil en cada caso.

Aplicando estos cálculos para cada una de las muestras salinas se obtienen los resultados que se muestra en la figura IV.8 junto con los valores estimados para cada especie con el programa WinHumic V.

Los valores de concentración de las distintas especies mayoritarias de níquel calculados para las muestras salinas se corresponden bastante bien con los calculados teóricamente, por lo que cabe pensar que bajo las condiciones de agua de mar este sistema permite diferenciar y cuantificar estas especies en este tipo de muestras. A pesar de ello esta técnica presenta algunos inconvenientes, como el consumo de altos volúmenes de disolventes y tiempos largos de extracción, por lo que se hace necesario el desarrollo de nuevas técnicas que mejoren estos aspectos. En este sentido se desarrollaron los trabajos que se recogen en los capítulos siguientes, en los que se describe el estudio y aplicación de dos nuevos sistemas de microextracción en fase

líquida con capilares de fibra hueca para la determinación de los contenidos totales y diferenciación de las especies de níquel en aguas naturales.

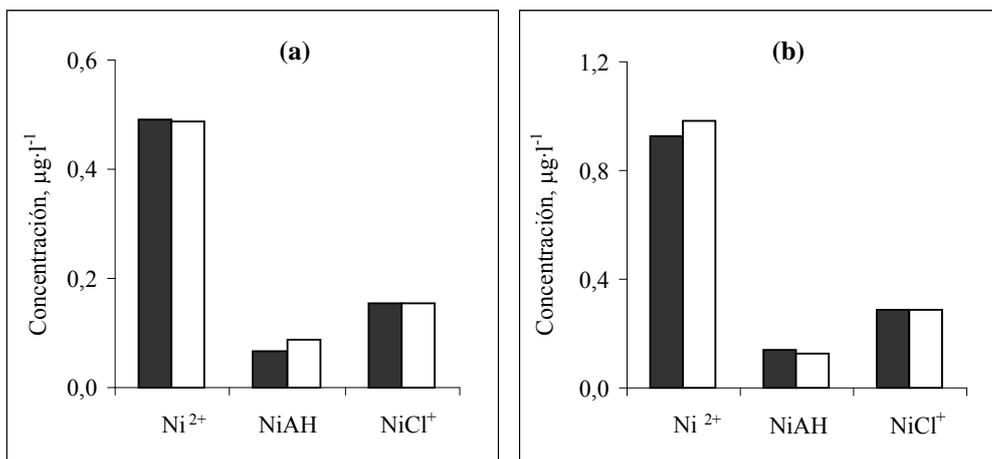


Figura IV.8. Concentración de las distintas fracciones de níquel en muestras reales salinas ■ Experimentales (MLV) y □ teóricos (WinHumic V). (a) Muestra 1, (b) Muestra 2.

IV.IV. BIBLIOGRAFÍA

1. Bartsch R.A., Way J.D., *Chemical separations with liquid membranes*, American Chemical Society, Washington DC, 1996.
2. Templeton D.M., Ariese F., Cornelis R., Danielsson L., Muntau H., Van Leuween, Lobinski R., *Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches* (IUPAC Recommendations 2000), *Pure Applied Chemistry*, 72, 1453-1470, 2000.
3. Twiss M.R., Moffett J.W., *Comparison of copper speciation in coastal marine waters measured using analytical voltammetry and diffusion gradient in thin film techniques*, *Environmental Science Technology*, 36, 1061-1068, 2002.
4. Ndungu K., Hurst M.P., Bruland K.W., *Comparison of copper speciation in estuarine water measured using analytical voltammetry and supported liquid membrane techniques*, *Environmental Science and Technology*, 39, 3166-3175, 2005.
5. Kinrade J.D., Van Loon J.C., *Solvent extraction for use with flame atomic absorption spectrometry*, *Analytical Chemistry*, 46, 1894-1898, 1974.
6. Martino M., Turner A., Nimmo M., *Distribution, speciation and particle-water interactions of nickel in the Mersey Estuary, UK*, *Marine Chemistry*, 88, 161-177, 2004.
7. Zhang H., Davison W., *In situ speciation measurements. Using diffusive gradients in thin films (DGT) to determine inorganically and organically complexed metals*, *Pure Applied Chemistry*, 73, 9-15, 2001.
8. Doig L.E., Liber K., *Nickel speciation in the presence of different sources and fractionations of dissolved organic matter*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66, 169-177, 2007.

9. WINHUMIC V for Win95/98/NT (<http://www.lwr.kth.se/english/OurSoftWare/WinhumicV/index.htm>).
10. Spendley W., Hext G.R., Himswoth F.R., *Sequential application of simplex design in optimization and evolutionary operation*, *Technometrics*, 4, 441, 1962.
11. Thurman E., *Organic geochemistry of natural waters*, Springer Science and Business, Dordrecht, The Netherlands, 1985
12. *Metrohm Application notes*, VA Application Note No. V-69.
13. Walther J.V., *Essentials of geochemistry*, Jones & Bartlett Learning, Budsury, Massachusetts, 2005.
14. Bayen S., Wilkinson K.J., Buffle J., *The permeation liquid membrane as a sensor for free nickel in aqueous samples*, *Analyst*, 132, 262-267, 2007.
15. Turner A., Nimmo M., Thuresson K.A., *Speciation and sorptive behaviour of nickel in an organic-rich estuary (Beaulieu, UK)*, *Marine Chemistry*, 63, 105-118, 1998.
16. Harrison R.M., de Mora S.J., *Introductory chemistry for environmental sciences*, 2ª Edición, Cambridge Environmental Chemistry Series, Cambridge University Press, UK, 1996.
17. Chakraborty P., Chakrabarti C.L., *Chemical speciation of Co, Ni, Cu, and Zn in mine effluents and effects of dilution of the effluent on release of the above metals from their metal-dissolved organic carbon (DOC) complexes*, *Analytica Chimica Acta*, 571, 260-269, 2006.

CAPÍTULO V

**DETERMINACIÓN DE NÍQUEL EN AGUAS
NATURALES MEDIANTE UN SISTEMA DE
MICROEXTRACCIÓN EN FASE LÍQUIDA
CON CAPILARES DE FIBRA HUECA**

V.I. INTRODUCCIÓN

Los resultados mostrados y discutidos en los capítulos anteriores nos permiten extraer una primera conclusión de gran importancia, asociada a la capacidad demostrada por la conjunción de los sistemas químicos de transporte optimizados y las membranas líquidas como herramienta para separar y preconcentrar especies de níquel en aguas naturales. Avanzando en los objetivos propuestos, y con el fin de mejorar la aplicabilidad de los sistemas de transporte estudiados al análisis de concentraciones de níquel a niveles de sub-ppb en muestras reales, se hace necesario aumentar los factores de preconcentración reduciendo los volúmenes de disolución utilizados con el sistema de membrana líquida de volumen. Para ello se plantea aquí la utilización de la técnica separativa denominada microextracción en fase líquida (LPME), y más concretamente la modalidad basada en el uso de capilares de fibra hueca, en nuestro caso fabricados en polipropileno poroso, que surgió a finales de los 90 [1]. Dicha técnica surgió a partir de técnicas como la microextracción en fase líquida de gota colgante y la idea de la técnica de extracción a través de membranas líquidas soportadas de Jönsson y col., las cuales permitían reducir de las cantidades de disolventes utilizadas y conseguir altos

factores de preconcentración [2-5]. Su antecesora, la técnica basada en gota colgante (SDME), fue desarrollada en 1996 como alternativa a la extracción líquido-líquido convencional con dos objetivos principales [2]:

- Reducir las cantidades de disolventes utilizados por estos sistemas y con ello ajustarse a los métodos denominados “solvent-less” que cumplen con los principios de la “Química Analítica Verde” [6].
- Aumentar los factores de preconcentración conseguidos durante la extracción, debido a la gran relación entre las fases donadora-receptora en estos sistemas.

Esta técnica se basa en el uso de una gota de disolvente orgánico sujeta en el extremo de una microjeringa que se introduce en la muestra acuosa y sobre ella se va a producir la extracción del analito de interés, siendo posteriormente introducida en la microjeringa e inyectada en un instrumento de análisis, como por ejemplo un cromatógrafo de gases (CG). Esta técnica ha sufrido bastantes variaciones con el objetivo de ampliar su aplicación al análisis de diferentes tipos de analitos, entre ellas podemos nombrar la microextracción líquido-líquido-líquido (LLLME) donde una gota de disolución acuosa es sumergida en un disolvente orgánico de baja densidad que se encuentra sobre la muestra acuosa y la técnica de microextracción de gota colgante en espacio de cabeza (HS-SDME), en la que la gota de disolución orgánica o acuosa se encuentra en el espacio de aire que queda sobre la muestra [7-9]. Esta última técnica permite el análisis de compuestos volátiles o semi-volátiles utilizando una gota de disolvente orgánico. Con ella es posible desarrollar métodos más “verdes” utilizando líquidos iónicos [10], o analizar compuestos volátiles o semi-volátiles ionizables utilizando una gota de disolución acuosa [11].

A pesar de conseguir altos factores de preconcentración, la técnica SDME presenta problemas de inestabilidad por pérdidas de la gota durante el proceso de extracción debido en muchos casos a la alta velocidad de agitación necesaria para agilizar el proceso de extracción [12]. El sistema basado en capilares intenta resolver

estos problemas de inestabilidad al encontrarse la disolución receptora dentro de un soporte rígido polimérico, de este modo el sistema puede ser agitado vigorosamente reduciendo los problemas de pérdidas de muestra [13,14].

Existen diferentes tipos de sistemas de microextracción en fase líquida basados en capilares de fibra hueca (HF-LPME), que pueden usarse en modo de dos o tres fases. En el primero de ellos, ideal para compuestos orgánicos, el capilar se llena de la disolución orgánica extractante y se sumerge en la muestra, de modo que se produce una extracción de los analitos desde la muestra hacia la disolución orgánica a través de los poros de la fibra, que se encuentran igualmente impregnados de fase orgánica [15]. En el sistema de tres fases, objeto de este capítulo y el siguiente, la disolución orgánica o membrana se encuentra retenida mediante fuerzas capilares en los poros de una fibra hueca de polipropileno. Las fases donadora y receptora se encuentran separadas por dicha membrana, estando esta última en el interior de la fibra hueca, como puede apreciarse en la figura V.1.

Aunque el uso de capilares mejora enormemente la estabilidad de la disolución orgánica aún pueden existir pérdidas de la fase orgánica retenida en los poros durante el proceso de extracción. Sin embargo, una forma de poder disminuir esta inestabilidad es elegir un soporte polimérico con tamaño de poro adecuado, además de un disolvente orgánico que presente buenas características, como por ejemplo alta tensión superficial, baja viscosidad y volatilidad. En este sentido Xia y col. encontraron que el cloroformo mejoraba el factor de enriquecimiento obtenido para varios metales con este tipo de sistemas frente a otros disolventes como el tolueno y el octanol [16].

La aplicación de este tipo de sistemas de HF-LPME se ha desarrollado principalmente para el análisis de compuestos orgánicos, aunque cada vez son más los trabajos enfocados al análisis de metales en concentraciones traza, como se recoge en varias revisiones publicadas sobre el tema [13,14,17,18].

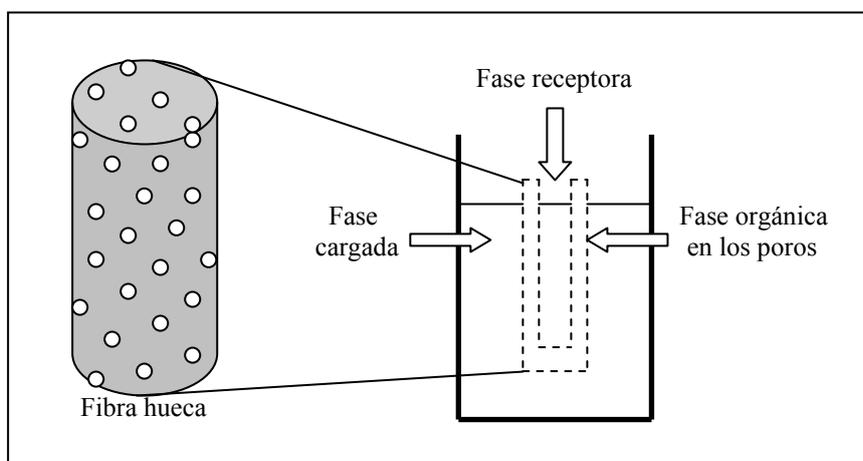


Figura V.1. Sistema de microextracción en fase líquida con capilares de fibra hueca (HF-LPME).

Aunque la aplicación de estos sistemas al análisis de metales en aguas naturales así como para su especiación es aún escasa, sí se pueden encontrar varios ejemplos tanto utilizando los sistemas de dos fases como los de tres [18]. En este sentido Xia y col. consiguieron determinar varios metales (Cu, Zn, Pd, Cd, Hg, Pb y Bi) en aguas naturales con factores de enriquecimiento entre 20 para el mercurio y 305 para el cobre [16]. Otros autores han desarrollado métodos de análisis para Cd, Ni o Pb en este mismo tipo de muestras basado en sistemas de microextracción similares y posterior determinación por espectrometría de absorción atómica con horno de grafito [19,20].

En este capítulo, se expone el desarrollo del sistema de HF-LPME para la determinación de níquel total mediante el sistema Ni-DEHPA tomando como base los resultados de los estudios de extracción líquido-líquido expuesto anteriormente en el capítulo II, así como de otros trabajos anteriores en membranas líquidas de volumen [21].

En primer lugar se realizó el diseño de los experimentos con capilares de fibra hueca y se optimizaron las variables químicas e hidrodinámicas más influyentes en el

sistema de extracción. Al utilizar un volumen de disolución orgánica tan reducido en comparación con las metodologías usadas en los capítulos anteriores la relación molar Ni:extractante se va a ver reducida, lo que se va a traducir en la necesidad de aumentar de manera significativa la concentración de extractante utilizado en la disolución orgánica por lo que esta fue una de las variables a optimizar. Otra de las variables estudiadas fue la concentración de ácido en la disolución receptora, ya que al igual que para la variable anterior, el pequeño volumen utilizado en esta metodología puede influir en el transporte del metal. Finalmente, la última variable a tener en cuenta fue la velocidad de agitación de la muestra.

Para realizar los estudios mencionados se eligió una optimización univariante del sistema, para de este modo detectar fácilmente la influencia de cada parámetro por separado.

La aplicación a muestras reales se ha realizado como en el capítulo anterior en condiciones de extrema limpieza y con reactivos de alta calidad (suprapur), para eliminar posibles problemas de contaminación durante los análisis. La validación del sistema propuesto en este capítulo se realizó, al igual que para la membrana líquida de volumen, aplicando el sistema optimizado a muestras reales y comparando los resultados con los obtenidos con la metodología de referencia basada en la extracción con mezcla de carbamatos (APDC/DDDC) [22].

V.II. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Como se comentó en el capítulo anterior el sistema estudiado en extracción líquido-líquido para la determinación de los contenidos totales de níquel ha sido trasladado directamente a un sistema de membrana soportada, debido a que ya se ha demostrado su viabilidad para extraer níquel en un sistema de membranas de volumen [21]. No obstante, ese sistema enfocado al análisis multielemental presentó bajas recuperaciones y alta irreproducibilidad para este metal, lo que lo hacía poco adecuado

para el análisis cuantitativo de níquel en muestras reales de aguas naturales. Por lo que el objetivo principal de trasladar el sistema a uno de membrana líquida soportada con capilares de fibra hueca es la obtención de una nueva metodología que aporte factores de preconcentración más elevados que los encontrados con membranas de volumen junto con la reducción de los volúmenes de reactivos usados para el análisis.

Descripción del sistema de microextracción

En este primer sistema se utilizó como soporte polimérico la fibra Accurel PP Q 3/2, con un tamaño de poro de $0,2 \mu\text{m}$, un diámetro interno de $600 \mu\text{m}$ y un espesor de pared de $200 \mu\text{m}$. El sistema que se utilizó fue de uno de tres fases utilizando el diseño mostrado en la figura V.2.

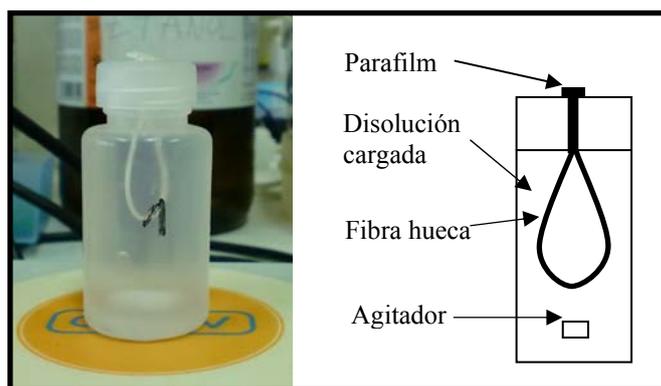


Figura V.2. Sistema de membrana de fibra hueca (HF-LPME) utilizado para el análisis de contenidos totales de níquel.

Para el montaje de este sistema se siguió el protocolo que se expone a continuación:

1. Se corta un trozo de fibra hueca Accurel PP Q 3/2 de 9 centímetros como el que se muestra en la figura V.3 y se limpia su interior, utilizando una jeringa farmacéutica para hacer pasar unos $400 \mu\text{l}$ de disolución ácida receptora.

2. Con el extremo de la jeringa aún introducido en la fibra, y con el lumen lleno de disolución receptora, se procede a la impregnación de la misma durante 1 minuto. Para ello se sumerge en la disolución orgánica como se observa en la figura V.3. Este tiempo es suficiente para que la disolución orgánica se introduzca en los poros de la fibra.

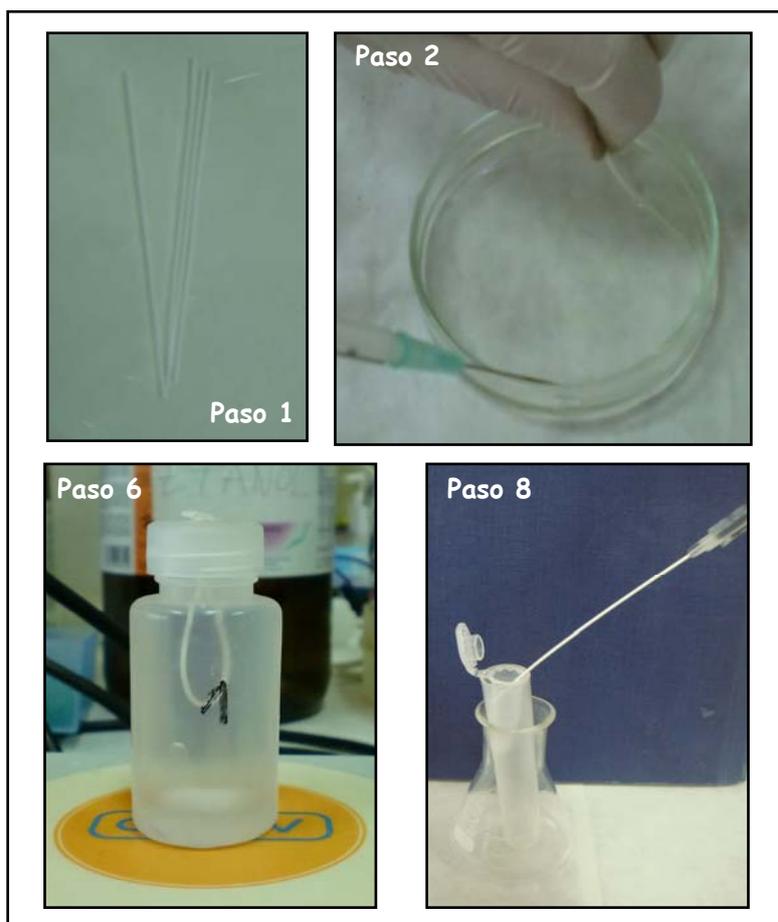


Figura V.3. Etapas 1, 2, 6 y 8 del montaje del sistema de microextracción en fase líquida con capilares de fibra hueca.

3. Luego, utilizando la jeringa, se inyectan unos 100 μl más de disolución receptora para eliminar los posibles restos de la orgánica, evitando introducir

aire y dejando la fibra llena con unos pocos microlitros de disolución receptora limpia (22,6 μ l).

4. La fibra impregnada se sumerge durante unos segundos en un vaso con agua milli-Q para eliminar el exceso de disolución orgánica que pueda quedar en el exterior de la misma.
5. Los extremos de la fibra se cierran mediante un trozo de Parafilm[®], el cual se introduce en el tapón agujereado de un bote de polipropileno de baja densidad.
6. La fibra se sumerge completamente en la disolución cargada que se encuentra llenando un bote de polipropileno de baja densidad de 30 ml y se cierra herméticamente el sistema utilizando el tapón en el que se encuentra la fibra sujeta, tal y como se ve en la figura V.3.
7. Por último se realiza la agitación del sistema para de este modo renovar la interfase entre las disoluciones cargada y orgánica constantemente y mejorar la extracción del metal.
8. Una vez transcurrido el tiempo de extracción se para la agitación, se corta el extremo del Parafilm[®] y se extrae la gota de disolución receptora del interior de la fibra con la ayuda de la jeringa, impulsando aire y recolectando la muestra en un Eppendorf para su posterior análisis, como muestra la figura V.3.

Optimización del sistema

Los experimentos de optimización del sistema Ni-DEHPA se realizaron siguiendo una estrategia univariante, variando una variable cada vez y fijando las demás a un valor determinado. La variable respuesta seleccionada para optimizar el sistema fue el factor de enriquecimiento (FE), que viene definido por la ecuación V.1 [23].

$$FE = \frac{[Ni]_r}{[Ni]_c} \quad (V.1)$$

donde $[Ni]_r$ representa la concentración de níquel presente en la disolución receptora al final del experimento y $[Ni]_c$ la concentración inicial de níquel en la disolución cargada.

Para realizar la optimización se utilizó una disolución cargada con $100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de níquel ajustando el pH a un valor de 5 mediante una disolución tampón acético/acetato hasta una concentración final de 0,1 M y la cantidad necesaria de disolución de hidróxido sódico 2 M. En este estudio se optimizaron las variables químicas de concentración de agente extractante en la disolución orgánica y concentración de ácido en la disolución receptora. Todos estos experimentos se realizaron a tres tiempos diferentes de extracción 30, 60 y 90 minutos.

Por otro lado, se estudió el efecto de las condiciones hidrodinámicas del sistema sobre el factor de enriquecimiento variando la velocidad de agitación.

Cada experimento se realizó por triplicado y las gotas de disolución ácida se recogieron en Eppendorfs de 2 ml, diluyéndolas con 1000 μl de agua milli-Q para contar con un volumen suficiente para su determinación con espectrometría de absorción atómica con llama (F-AAS).

Aplicabilidad del sistema al análisis de concentraciones traza

Para poder realizar la aplicación del sistema estudiado a muestras reales que suelen contener concentraciones de níquel menores de $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ se realizó previamente el estudio de los blancos del sistema. De este modo se determinó la posible contaminación introducida durante el proceso tanto por el propio montaje del sistema como por los reactivos utilizados para preparar las disoluciones.

El primer experimento fue realizado en las condiciones optimizadas previamente utilizando reactivos de alta pureza y usando agua milli-Q como disolución cargada ajustando su pH a 5 con el tampón acético/acetato hasta una concentración final de 0,1 M y una disolución de NaOH 2 M.

Posteriormente, con el objeto de minimizar aún más la contaminación debido al proceso de extracción, se repitió el estudio de los blancos utilizando reactivos de mayor calidad (suprapur) y se realizó el montaje de las fibras en una campana de flujo laminar con filtro tipo HEPA. Además se limpiaron tanto la disolución orgánica como la disolución tampón, utilizando los protocolos que se recogen de forma detallada en el anexo A.9.

Por último, se procedió a estudiar la influencia de la concentración inicial de níquel en la disolución cargada en un rango de 5-100 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ utilizando las condiciones optimizadas en el apartado anterior.

En todos los casos se realizaron los experimentos por triplicado y las gotas obtenidas se diluyeron con 200 μl de agua milli-Q y se analizaron por GF-AAS siguiendo el programa de temperaturas mostrado en la tabla V.1.

Etapas	T, °C	Tiempo, s	Rampa, s	Flujo argón, $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
Secado	100	30	10	0,2
Secado	130	20	30	0,2
Calcinación	1000	20	150	0,2
Atomización	2400	3	0	0
Limpieza	2600	3	0	0,2

Tabla V.1. Programa de temperaturas utilizado para analizar níquel con GF-AAS. $\lambda=232,0$ nm y corrección con efecto Zeeman.

Análisis de muestras reales

Para realizar la aplicación a muestras reales se tomaron y analizaron nueve muestras diferentes con distintas salinidades, en un rango de 1 a 32,7 g·l⁻¹. En el Anexo A.6 se recogen en detalle las características de cada muestra, correspondiéndose con las muestras que aparecen en la tabla recogida en el anexo (numeradas como 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10), así como los procedimientos utilizados en la toma de las mismas.

Cálculo del factor de enriquecimiento

En este estudio primero se aplicó el sistema a seis muestras que aparecen en el anexo A.6 enumeradas como 4, 5, 6, 7, 8 y 9, para determinar el factor de enriquecimiento cuando se analizan muestras reales, ya que estudios anteriores con este sistema químico han mostrado una disminución de la eficiencia de la extracción debido a la matriz de estas muestras [24]. Como se ha comentado anteriormente, el reactivo DEHPA es un agente extractante no selectivo y durante el proceso de extracción con membranas líquidas se puede producir un co-transporte de otros iones mayoritarios en las aguas naturales, como Na⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺, que disminuyen la eficiencia del transporte del metal analizado. Una manera de reducir este efecto producido por la matriz de la muestra real es el uso de complejantes, como el ácido cítrico, que retengan a estos iones en la muestra formando complejos. Por ello, se realizó una prueba de extracción con una de las muestras con una concentración de ácido cítrico de 0,1M.

Con este estudio se obtuvo un factor de enriquecimiento medio que se utilizó posteriormente para realizar la determinación de las concentraciones de níquel totales en muestras reales. Dicho factor de enriquecimiento se calculó como se describe en la ecuación V.1 a partir de las concentraciones de níquel medidas en las muestras mediante la extracción con APDC/DDDC y determinación con ICP-MS.

Aplicación del sistema al análisis de níquel en muestras reales

Una vez calculado el valor del factor de enriquecimiento para matrices de aguas reales, éste se utilizó para analizar las muestras 1, 3, 9 y 10 descritas en el anexo A.6 y que abarcan distintos valores de salinidad. Los experimentos se llevaron a cabo del mismo modo que los anteriores, siguiendo protocolos de ultralimpieza y con las condiciones optimizadas.

La validación del método propuesto se realizó comparando los resultados obtenidos para la concentración total de níquel usando el sistema de microextracción con los determinados con la técnica de referencia. Para ello se utilizó el test t-Student de comparación de dos medias experimentales para un $\alpha = 0,05$ (Anexo A.8).

V.III. RESULTADOS

A continuación se muestran los resultados obtenidos en el desarrollo y aplicación de la metodología propuesta.

Optimización del sistema

En primer lugar se estudió el efecto del agente extractante presente en la disolución orgánica, variando la concentración de DEHPA disuelto en keroseno entre 0,3 y 0,9 M, y manteniendo en la disolución receptora una concentración de HNO₃ de 1,5 M. La longitud de fibra utilizada fue de 9 cm, y la velocidad de agitación del sistema se mantuvo a 500 rpm. Adicionalmente se estudió el efecto del tiempo de extracción, como se observa en los resultados obtenidos que aparecen en la figura V.4.

En esta figura se aprecia que la extracción se ve favorecida con el aumento de la concentración de DEHPA en la disolución orgánica independientemente del tiempo de extracción. Este hecho se relaciona con el aumento de la relación DEHPA:Ni al aumentar la concentración del extractante en la disolución orgánica que favorece un aumento en el flujo de metal a través de la membrana como ha sido observado en otros

sistemas [25,26]. No obstante, Mendiguchía y col. encontraron que para concentraciones de extractante mayores a 0,5 M la permeabilidad del sistema para el transporte de cobre en un sistema de membrana líquida de volumen disminuía, debido al aumento de la viscosidad de la disolución dificultando la difusión de la especie en la fase orgánica [27]. Otros autores han observado el mismo efecto para concentraciones altas de extractante en sistemas de membrana líquida soportadas [28], por lo que no se aumentó más la concentración de DEHPA en la disolución orgánica.

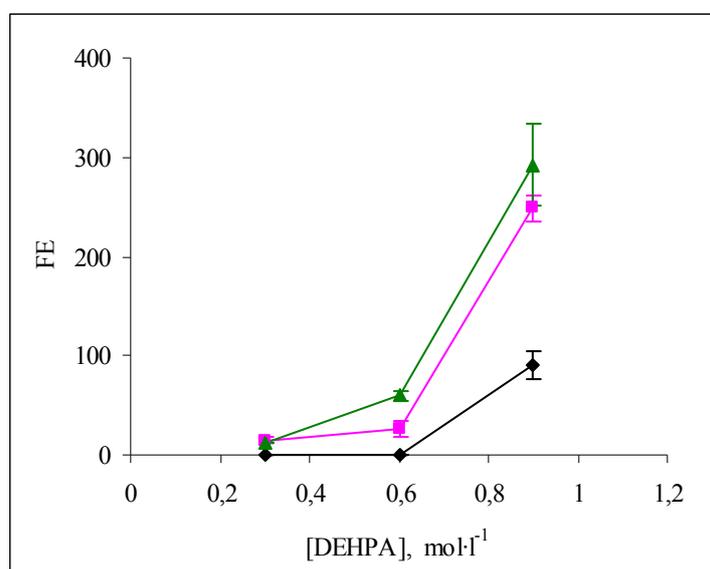


Figura V.4. Efecto de la concentración de DEHPA en el factor de enriquecimiento. Disolución cargada: 100 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Ni; 0,1 M AcH/Ac⁻; Disolución receptora: 1,5 M HNO₃; Velocidad de agitación: 500 rpm; L = 9 cm. \blacklozenge : 30 minutos \blacksquare : 60 minutos, \blacktriangle : 90 minutos.

Otro aspecto importante que se observa en la figura V.4 es que al aumentar el tiempo de extracción de 30 a 60 minutos se produce un aumento muy significativo de la extracción del metal, especialmente para altas concentraciones de DEHPA. Sin embargo, cuando la extracción se realiza en 90 minutos no se observa un aumento significativo en el factor de enriquecimiento en comparación con el obtenido a los 60

minutos, pudiendo relacionarse con la llegada al equilibrio del sistema en el cual el factor de enriquecimiento se mantiene invariable.

Li y Hu observaron un comportamiento similar en un sistema de HF-LPME para especiación de vanadio en el que el factor de enriquecimiento aumentaba con el tiempo de extracción durante los primeros siete minutos manteniéndose después constante y disminuyendo ligeramente para tiempos superiores a 12 minutos [29]. El mismo efecto ha sido observado también para la extracción de níquel y plomo con este tipo de sistemas [19], aunque en otros casos no se observa que el sistema alcance el equilibrio tras 20 minutos de extracción [30]. En vista de los resultados, se eligió para los siguientes experimentos una concentración de DEHPA de 0,9 M en keroseno.

La siguiente variable estudiada para determinar su influencia en el factor de enriquecimiento fue la concentración de ácido nítrico en la disolución receptora, en un rango entre 0,5 y 2 M para 30, 60 y 90 minutos de extracción. Los resultados obtenidos se muestran en la figura V.5.

Como se observa en la figura, es posible distinguir dos tendencias ligeramente diferentes para los distintos tiempos de extracción. Para el tiempo de extracción menor el valor del coeficiente de enriquecimiento disminuye progresivamente con el aumento en la concentración de ácido en la disolución receptora, siendo esta disminución más marcada entre 1 y 1,5 M. Para los tiempos mayores, la tendencia se mantiene prácticamente igual independientemente del tiempo con un incremento del factor de enriquecimiento al aumentar la concentración de ácido hasta 1 M, disminuyendo para concentraciones de ácido nítrico más elevadas. Esta disminución de los valores del factor de enriquecimiento con el aumento de la concentración de ácido utilizada en la disolución receptora puede ser debida a pérdidas del reactivo extractante en esta disolución, como observaron Peng y col. en un trabajo con un sistema similar de membrana para la determinación de Cd [20]. En vista de estos resultados se eligió una concentración de ácido nítrico de 1 M para los experimentos posteriores.

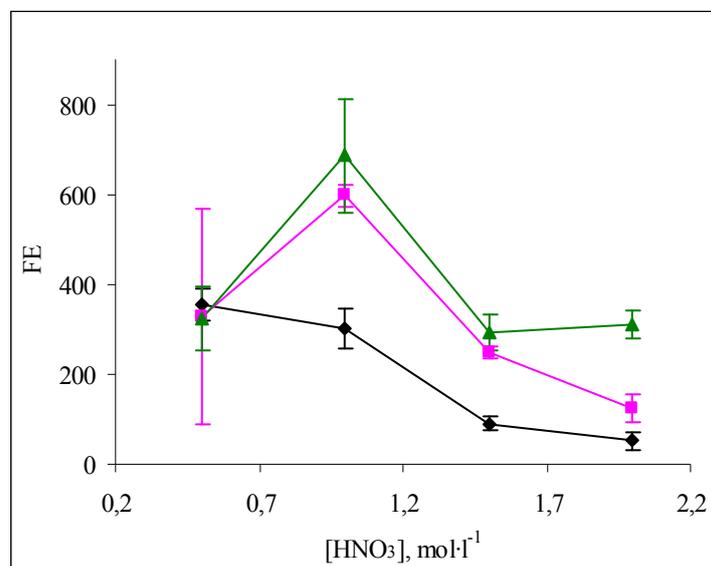


Figura V.5. Efecto de la concentración de HNO₃ en el factor de enriquecimiento. Disolución cargada: 100 μg·l⁻¹ Ni; 0,1 M AcH/Ac; Disolución orgánica: 0,9 M DEHPA; Velocidad de agitación: 500 rpm; L = 9 cm. ♦: 30 minutos, ■: 60 minutos, ▲: 90 minutos.

Aunque el mayor factor de enriquecimiento se observa para 90 minutos de extracción, este aumento no es muy significativo probablemente porque, como se ha comentado anteriormente el sistema haya alcanzado el equilibrio, y aumentó además la irreproducibilidad del sistema, como se aprecia en la figura V.5. El aumento de la irreproducibilidad puede ser debido a la baja estabilidad de la disolución orgánica en los poros que pueden presentar estos sistemas de fibra hueca y que se hace más marcada para mayores tiempos de agitación del sistema [31]. La disolución orgánica se encuentra retenida en los poros debido a fuerzas capilares, por lo que durante el proceso de extracción es posible que parte de la disolución orgánica y agente extractante sean extraídos de los poros de la membrana, observándose una disminución del flujo de níquel a través de ella y por tanto una disminución del factor de enriquecimiento. De hecho, aunque los mayores factores de enriquecimiento se consiguen cuando el sistema alcanza el equilibrio, es habitual utilizar tiempos de

extracción más bajos, aunque no se haya llegado al equilibrio, y se evitan los posibles problemas de pérdida de disolvente [16,30]. Por todo ello, se decidió que el tiempo de extracción más adecuado para realizar los siguientes experimentos era de 60 minutos, ya que la estabilidad de la disolución orgánica era suficiente para conseguir resultados reproducibles y el factor de enriquecimiento aumentaba notablemente.

Posteriormente se estudiaron las condiciones hidrodinámicas bajo las que se realizaban los análisis de extracción con este sistema, variando la velocidad de agitación entre 250 y 1400 rpm, obteniendo los resultados que se muestran en la figura V.6.

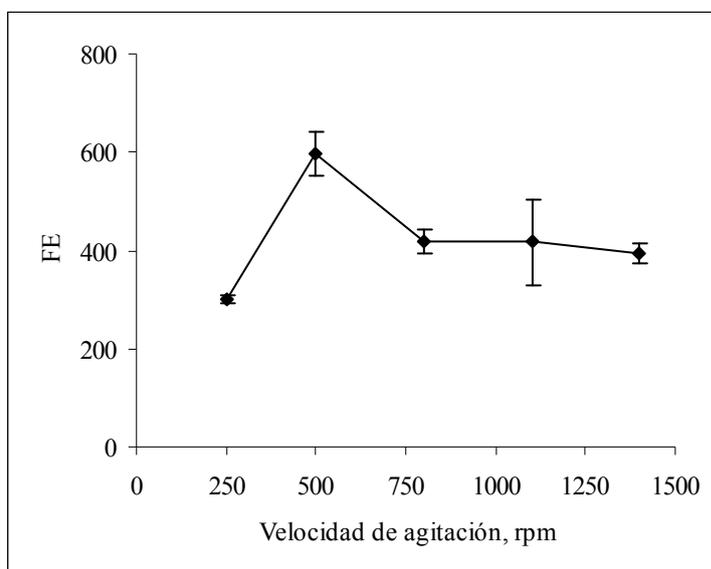


Figura V.6. Efecto de la velocidad de agitación en el factor de enriquecimiento. Disolución cargada: $100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Ni, $0,1 \text{ M}$ AcH/Ac⁻; Disolución orgánica: $0,9 \text{ M}$ DEHPA; Disolución receptora: 1 M HNO₃; L = 9 cm. Tiempo: 60 minutos.

Para velocidades de agitación bajas (250-500 rpm) el sistema presenta un incremento progresivo del factor de enriquecimiento al aumentar la velocidad debido a que mejora los procesos de difusión del sistema. Sin embargo, para velocidades de

agitación mayores se observa una ligera disminución del factor de enriquecimiento para permanecer después prácticamente invariable. Este comportamiento de disminución del factor de enriquecimiento a altas velocidades de agitación ha sido descrito anteriormente en otros sistemas similares y puede relacionarse con dos factores. Por un lado podría ser debido a pérdidas de parte de la disolución orgánica y/o agente extractante procedente de los poros de la fibra por el aumento de la velocidad de agitación y por otro, a la creación de burbujas que pueden quedar retenidas en la superficie externa de la fibra. Ambos fenómenos reducen el contacto entre las fases acuosas a través de la membrana líquida y por tanto la difusión de níquel a través de la membrana [19,32]. A partir de los resultados obtenidos se seleccionó una velocidad de agitación de 500 rpm para realizar los siguientes experimentos.

De este modo las condiciones químicas y físicas del sistema de microextracción en fase líquida con capilares de fibra hueca para la determinación de contenidos de níquel total en aguas naturales se resumen en la tabla V.2. En estas condiciones se obtiene un factor de enriquecimiento de 598.

Disolución orgánica	0,9 M DEHPA en keroseno
Disolución receptora	1 M HNO ₃
Velocidad de Agitación	500 rpm
Tiempo de extracción	60 minutos
Longitud de fibra	9 cm

Tabla V.2. Condiciones de funcionamiento del sistema de HF-LPME.

Aplicabilidad del sistema al análisis de concentraciones traza

Una vez se optimizó el sistema de membrana soportada de fibra hueca para el análisis de níquel total en aguas naturales, se estudió la aplicabilidad del mismo al análisis de níquel en aguas naturales a bajas concentraciones. Para ello primero se

realizaron los blancos del sistema Ni-DEHPA en las condiciones optimizadas anteriormente, para determinar la potencial contaminación procedente de la manipulación de las fibras y de los reactivos utilizados y que podría interferir en la determinación de muestras reales cuyas concentraciones pueden llegar a ser menores a $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de níquel. Con este fin, se realizaron extracciones de muestras cargadas a las que no se les adicionó níquel pero sí el tampón acético/acetato en las condiciones optimizadas anteriormente, obteniendo una concentración de níquel en la disolución receptora de $0,51 \pm 0,08 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Este valor muestra que los reactivos utilizados, así como el propio montaje del sistema, aportaban una cantidad considerable de níquel, por lo que se intentó disminuir estos blancos mediante una limpieza de las disoluciones utilizadas y de las fibras, así como la realización de las extracciones y del montaje del sistema en el interior de una campana de flujo laminar con filtro HEPA (clase 100). De este modo la disolución tampón se limpió mediante una extracción con mezcla de carbamatos. Para limpiar la disolución orgánica se utilizó una extracción utilizando el ácido de la disolución receptora como extractante. Todos los procedimientos de limpieza se realizaron en una sala blanca clase 10.000 y se detallan en los anexos A.9 y A.10. Para limpiar las fibras se dejaron en ácido nítrico 2 M durante varias horas.

Los resultados obtenidos tras estas modificaciones mostraron una reducción significativa de la concentración de níquel en la disolución receptora hasta un valor de $0,15 \pm 0,07 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Por este motivo el análisis de níquel en las muestras reales se realizó siguiendo los procedimientos de limpieza descritos y en el interior de una campana de flujo laminar clase 100.

Posteriormente se realizó el estudio del efecto de la concentración de níquel inicial en el factor de enriquecimiento. De este modo, se realizaron varios experimentos disminuyendo la concentración de níquel presente en la disolución cargada a 20 y $5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Los resultados pueden verse en la figura V.7., en la que se aprecia una ligera disminución del valor del factor de enriquecimiento obtenido para las concentraciones más bajas de níquel. Sin embargo en este rango el factor de

enriquecimiento prácticamente permanece invariable pudiendo calcular un valor medio del factor de 536 ± 51 para el sistema de membrana líquida estudiado.

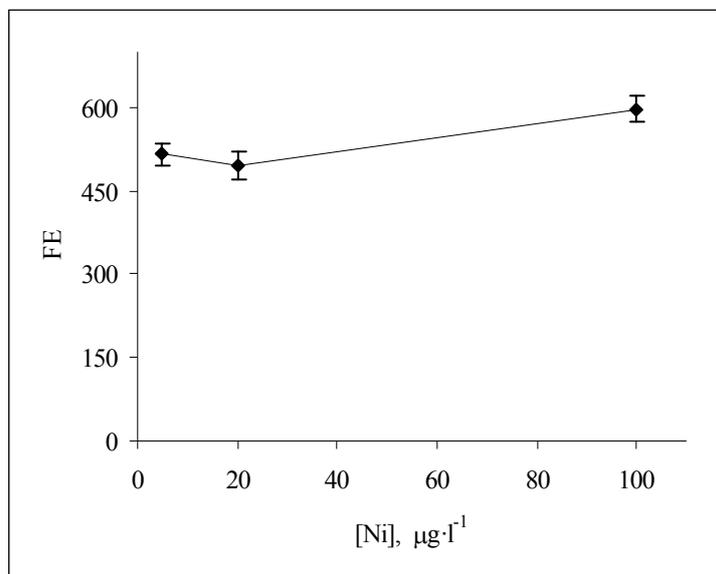


Figura V.7. Efecto de la concentración de níquel inicial en el factor de enriquecimiento. Disolución cargada: 0,1 M AcH/Ac⁻; pH 5; Disolución orgánica: 0,9 M DEHPA; Disolución receptora: 1M HNO₃; Velocidad de agitación: 500 rpm; L = 9 cm; Tiempo: 60 min.

Análisis de muestras reales

Tal como se ha comentado en el desarrollo experimental, en primer lugar es necesario calcular el factor de enriquecimiento del sistema para las muestras reales, ya que la ausencia de selectividad del DEHPA puede hacer que exista transporte de otros cationes presentes en las muestras reales que disminuya la capacidad del sistema para transportar el analito de interés [24].

Para ello se analizaron seis muestras reales de distinta salinidad (muestras 4 a 9 del anexo A.6) procedentes del río Guadalquivir cuya concentración de níquel total había sido determinada previamente mediante extracción líquido-líquido con

APDC/DDDC en sala blanca y posterior cuantificación mediante ICP-MS. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado utilizando el sistema de microextracción optimizado y se obtuvo un factor de enriquecimiento medio de $29,7 \pm 1,2$. La alta reproducibilidad del sistema indica que la salinidad de la muestra no afecta de manera significativa al proceso de extracción, lo que permite la aplicación del sistema a muestras de aguas de diferente salinidad.

Como se puede observar, el valor del factor de enriquecimiento obtenido con el sistema optimizado para las muestras reales es mucho menor que el calculado anteriormente para las muestras sintéticas, confirmando el efecto comentado anteriormente. Para intentar reducir este efecto se probó la adición de un agente enmascarante, el ácido cítrico, que ha demostrado su utilidad en un sistema de membrana líquida de volumen para análisis de Cd en agua de mar [24]. Sin embargo, los factores de enriquecimiento en el sistema optimizado para níquel no mejoraron con la adición de este reactivo e incluso mostraron peores resultados, probablemente debido a que las constantes de formación del complejo del ácido cítrico con níquel son del mismo orden e incluso superiores a las constantes de formación de los complejos de Ca y Mg, por lo que además de complejar a los iones calcio y magnesio se puede producir la complejación del níquel presente en la muestra que no podría ser transportado por el DEHPA [33-35] .

De este modo se utilizó el factor de enriquecimiento calculado previamente (29,7) para la determinación de níquel total en cuatro muestras reales de diferente salinidad, dos procedentes del río Guadalquivir (muestras 9 y 10 del anexo A.6), otra del río Guadalete y una tomada en el río San Pedro (muestras 3 y 1 del anexo A.6). De este modo, los resultados obtenidos al aplicar el método optimizado para analizar estas cuatro muestras, junto con la concentración de níquel obtenida usando el método de referencia se pueden ver en la tabla V.3. El error medio calculado respecto a las medidas realizadas con el método de referencia fue de un 7,9%. Asimismo, la tabla recoge los resultados obtenidos en la prueba t-Student para la comparación de las

concentraciones obtenidas con el sistema de microextracción en fase líquida con capilares de fibra hueca optimizado y el método de referencia, mostrando que no existen diferencias significativas entre ambos resultados.

Muestra	Salinidad	Método de referencia, $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	HF-LPME, $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	ϵ , %	t-Student	Test t*
9	31,5	0,73	$0,71 \pm 0,12$	2,7	-0,3	Aceptado
10	0,4	1,95	$2,05 \pm 0,23$	-5,1	0,8	Aceptado
1	32,7	0,73	$0,82 \pm 0,06$	12,3	2,6	Aceptado
3	1,0	2,12	$1,88 \pm 0,14$	11,3	-3,0	Aceptado

* $t_c=4,30$, con 2 grados de libertad y $\alpha=0,05$.

Tabla V.3. Comparación entre los valores de concentración de las muestras obtenidos con el método optimizado y los medidos con el método de referencia.

De los resultados expuestos anteriormente se desprende la aplicabilidad del sistema de microextracción desarrollado para el análisis de concentraciones de níquel totales en aguas naturales de diferente salinidad. Como se ha comentado varias veces este tipo de sistemas cumplen con los principios de la Química Verde, por lo que la posibilidad de que sustituyan a otros procedimientos potencialmente más contaminantes es uno de sus principales atractivos.

V.IV. BIBLIOGRAFÍA

1. Pedersen-Bjergaard S., Rasmussen K.E., *Liquid–liquid–liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis*, Analytical Chemistry, 71, 2650-2656, 1999.
2. Jeannot M.A., Cantwell F., *Solvent microextraction into a single drop*, Analytical Chemistry, 68, 2236-2240, 1996.
3. Pálmarsdóttir S., Lindergard B., Deininger P., Edholm L.E., Mathiasson L., Jönsson J.A., *Supported liquid membrane technique for selective sample workup of basic drugs in plasma prior to capillary zone electrophoresis*, Journal of Capillary Electrophoresis, 2, 185-189, 1995.
4. Pálmarsdóttir S., Thordarson E., Edholm L.E., Jönsson J.A., Mathiasson L., *Miniaturized supported liquid membrane device for selective on-line enrichment of basic drugs in plasma combined with capillary zone electrophoresis*, Analytical Chemistry, 69, 1732-1737, 1997.
5. Jönsson J.Å., Mathiasson L., Lindergard B., Trocewicz J., Olsson A., *Automated system for the trace analysis of organic compounds with supported liquid membranes for sample enrichment*, Journal of Chromatography A, 665, 259-268, 1994.
6. Armenta S., Garrigues S., De la Guardia M., *Green analytical chemistry*, Trends in Analytical Chemistry, 27, 497-511, 2008.
7. Pena-Pereira F., Lavilla I., Bendicho C., *Liquid-phase microextraction techniques within the framework of green chemistry*, Trends in Analytical Chemistry, 29, 617-628, 2010.
8. Alcudia-León M.C., Lucena R., Cárdenas S., Valcárcel M., *Determination of phenols in waters by stir membrane liquid-liquid-liquid microextraction coupled to liquid chromatography with ultraviolet detection*, Journal of Chromatography

- A, 1218, 2176-2181, 2011.
9. Tankeviciute A., Kazlauskaz R., Vickackaite V., *Headspace extraction of alcohols into a single drop*, *Analyst*, 126, 1674-1677, 2001.
 10. Ye C-L., Zhoua Q-X., Wang X-M., *Headspace liquid-phase microextraction using ionic liquid as extractant for the preconcentration of dichlorodiphenyltrichloroethane and its metabolites at trace levels in water samples*, *Analytica Chimica Acta*, 572, 165–17, 2006.
 11. Zhang J., Su T., Lee H.K., *Headspace water-based liquid-phase microextraction*, *Analytical Chemistry*, 77, 1988-1992, 2005.
 12. Kramer K.E., Andrews A.R.J., *Screening method for 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in urine using hollow fiber membrane solvent microextraction with in-tube derivatization*, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 760, 27-36, 2001.
 13. Rasmussen K.E., Pedersen-Bjergaard S., *Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction*, *Trends in Analytical Chemistry*, 23, 1-10, 2004.
 14. Pena-Pereira F., Lavilla I., Bendicho C., *Miniaturized preconcentration methods based on liquid-liquid extraction and their application inorganic ultratrace analysis and speciation: a review.*, *Spectrochimica Acta Part B*, 64, 1-15, 2009.
 15. Ho T.S., Pedersen-Bjergaard S., Rasmussen K.E., *Recovery, enrichment and selectivity in liquid-phase microextraction. Comparison with conventional liquid-liquid extraction*, *Journal of Chromatography A*, 963, 3-17, 2002.
 16. Xia L., Wu Y., Hu B., *Hollow-fiber liquid phase microextraction prior to low-temperature electrothermal vaporization ICP-MS for trace element analysis in environmental and biological samples*, *Journal of Mass Spectrometry*, 42, 803-810, 2007.
 17. Psillakis E., Kalogerakis N., *Developments in liquid phase microextraction*, *Trends in Analytical Chemistry*, 22, 565-574, 2010.

18. Dadfarnia S., Shabani A., *Recent developments in liquid phase microextraction for determination of trace level concentration of metals-A review*, Analytical Chimica Acta, 658, 107-119, 2010.
19. Abulhassani J., Manzoori J.L., Amjadi M., *Hollow-fiber based liquid microextraction using ionic liquid solvent for preconcentration of lead and nickel from environmental and biological samples prior to determination by electrothermal atomic absorption spectrometry*, Journal of Hazardous Material, 176, 481-486, 2010.
20. Peng J., Liu R., Liu J., He B., Hu X., Jiang G. *Ultrasensitive determination of cadmium in seawater by hollow fiber supported liquid membrane extraction coupled with graphite furnace atomic absorption spectrometry*. Spectrochimica Acta Part B, 62, 499-503, 2007.
21. Mendiguchía C., García-Vargas M., Moreno C., *Screening of dissolved heavy metals (Cu, Zn, Mn, Al, Cd, Ni, Pb) in seawater by a liquid-membrane-ICP-MS approach*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 391, 773-778, 2008.
22. Kinrade J.D., Van Loon J.C., *Solvent extraction for use with flame atomic absorption spectrometry*. Analytical Chemistry, 46, 1894-1898, 1974.
23. Romero R., Liu J., Jönsson J.A., *Equilibrium sampling through membranes of freely dissolved copper concentrations with selective hollow fiber membranes and the spectrophotometric detection of a metal stripping agent*, Analytical Chemistry, 77, 7605-7611, 2005.
24. Irigoyen L., Moreno C., Mendiguchía C., García-Vargas M., *Application of liquid membranes to sample preconcentration for the spectrometric determination of cadmium in seawater*, Journal of Membrane Science, 274, 169-172, 2006.
25. Arslan G., Tor A., Cengelolua Y., Ersoza M., *Facilitated transport of Cr(III) through activated composite membrane containing di-(2-ethylhexyl)phosphoric*

- acid (DEHPA) as carrier agent*, Journal of Hazardous Materials, 165, 729-735, 2009.
26. Venkateswaran P., Gopalakrishnan A.N., Palanivelu K., *Di(2-ethylhexyl) phosphoric acid - coconut oil supported liquid membrane for the separation of copper ions from copper plating wastewater*, Journal of Environmental Sciences, 19, 1446-1453, 2007.
 27. Mendiguchía C., Moreno C., García-Vargas M., *Separation of heavy metals in seawater by liquid membranes: Preconcentration of copper*, Separation Science and Technology, 37, 2337-2351, 2002
 28. Djane N., Ndung'u K., Johnsson C., Sartz H., Tornstrom T., Mathiasson L., *Chromium speciation in natural waters using serially connected supported liquid membranes*, Talanta, 48, 1121-1132, 1999.
 29. Li L., Hu B., *Hollow-fibre liquid phase microextraction for separation and preconcentration of vanadium species in natural waters and their determination by electrothermal vaporization-ICP-OES*, Talanta, 72, 472-479, 2007.
 30. Jiang G., Hu B., Xia L., *Hollow fiber liquid phase microextraction combined with electrothermal atomic absorption spectrometry for the speciation of arsenic (III) and arsenic (V) in fresh waters and human hair extracts*, Analytica Chimica Acta, 634, 15-21, 2009.
 31. Kislik V.S., *Liquid membranes*, Dzygiel P., Wiczorek P.P., En: *Supported liquid membranes and their modifications: definition, classification, theory, stability, application and perspectives*, Amsterdam, The Netherlands, 2010.
 32. Xia L., Hu B., Jiang Z., Wu Y., Chen R., Li L., *Hollow fiber liquid phase microextraction combined with electrothermal vaporization ICP-MS for the speciation of inorganic selenium in natural waters*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 21, 362-365, 2006.
 33. Li N.C., Lindenbaum A., White J.M., *Some metal complexes of citric and*

- tricarballic acids*, Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry, 12, 122-128, 1959.
34. Davies C.W., Hoyle B.E., *The interaction of calcium ions with some phosphate and citrate buffers*, Journal of the Chemical Society, 4134-4136, 1953.
35. Bates R.G., Pinching G.D., *Resolution of the dissociation constants of citric acid at 0 to 50°, and determination of certain related thermodynamic functions*, Journal of the American Chemical Society, 71, 1274-1283, 1949.

CAPÍTULO VI

**DETERMINACIÓN DE DISTINTAS
FRACCIONES DE NÍQUEL EN AGUAS
NATURALES MEDIANTE
MICROEXTRACCIÓN EN FASE LÍQUIDA
CON CAPILARES DE FIBRA HUECA**

VI.I. INTRODUCCIÓN

En este sexto y último capítulo se describen los trabajos experimentales realizados para la implementación del sistema de separación química previamente descrito en el capítulo IV en un sistema de microextracción en fase líquida con capilares de fibra hueca (HF-LPME). El sistema anteriormente desarrollado permitió llevar a cabo la diferenciación de las distintas fracciones de níquel presentes en aguas naturales mediante su separación selectiva en sistemas de membrana líquida de volumen, por lo que ahora el objetivo principal será aprovechar las ventajas de la miniaturización que permiten los nuevos sistemas de microextracción en fase líquida.

De este modo, se podrán conseguir mayores factores de preconcentración que con las membranas líquidas de volumen y se reduce el volumen de las disoluciones utilizadas. Además, al aumentar considerablemente la relación de volúmenes entre las dos muestras acuosas es posible conseguir una alta preconcentración en la disolución receptora sin afectar a la concentración de níquel en la disolución cargada lo que permitiría mantener el equilibrio químico entre las especies presentes en la misma y

por tanto no modificar la especiación de níquel en la disolución cargada durante el proceso de extracción. De este modo, en este capítulo se presenta el desarrollo de una nueva metodología para la separación y cuantificación de las distintas fracciones de níquel presentes en las aguas naturales.

Recientemente, los sistemas de HF-LPME se han aplicado en el campo de la especiación principalmente al análisis de metales en distinto estado de oxidación, como Se(IV) y Se(VI), As(III) y As(V), V(IV) y V(V) o bien de compuestos organometálicos [1-5]. Sin embargo aún son escasos los trabajos enfocados al análisis de distintas fracciones de metales en aguas naturales, pudiendo citar la separación de las distintas especies de plomo en presencia de distintos ligandos tanto inorgánicos como orgánicos realizada por Bautista-Flores [6].

En este capítulo se recogen, en primer lugar, los estudios de optimización del sistema, que se realizaron de un modo similar al del Ni-DEHPA, aunque después de optimizar las condiciones químicas e hidrodinámicas más influyentes del sistema se estudió el efecto producido por la longitud de fibra en la extracción de níquel. Posteriormente, se evaluó la influencia de los ligandos inorgánicos y orgánicos disueltos en la disolución cargada en el transporte de níquel.

La aplicación a muestras reales así como los estudios previos de aplicabilidad del sistema optimizado se realizaron como en el capítulo anterior, comparando los resultados determinados para las distintas muestras analizadas con los obtenidos con las metodologías de referencia.

Por último, se realizó la comparación de los resultados experimentales con los calculados teóricamente con el programa de equilibrio químico WinHumic V y se realizó la diferenciación de las especies mayoritarias presentes en las muestras como Ni^{2+} , NiCl^+ y NiAH .

VI.II. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Como se ha dicho anteriormente, el sistema químico Ni-CHBBH se trasladó a un sistema de membrana líquida soportada con fibra hueca con el objetivo de aumentar los factores de preconcentración y disminuir los volúmenes de los disolventes utilizados.

Descripción del sistema de microextracción

En este caso se realizaron estudios con dos fibras de características diferentes, la Accurel PP Q 3/2 utilizada anteriormente y la Accurel PP S 6/2 con mayores dimensiones, como puede observarse en la figura VI.1.

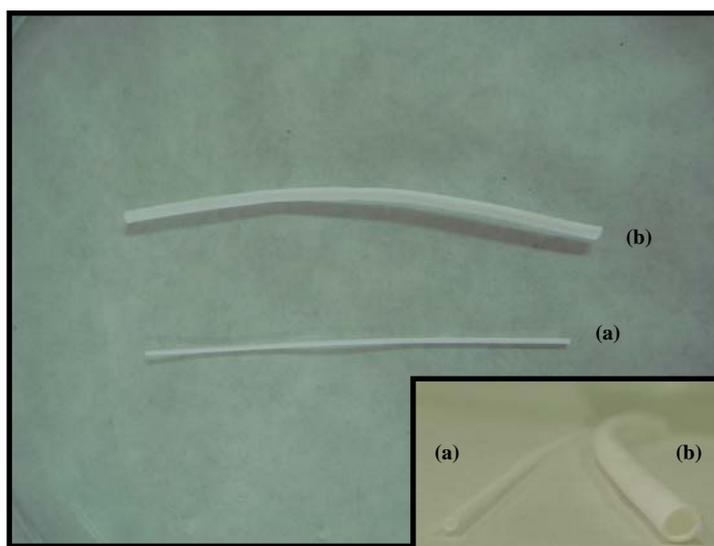


Figura VI.1. Capilares de fibra hueca utilizados. (a) Accurel PP Q 3/2, (b) Accurel PP S 6/2.

Como se aprecia en la tabla VI.1, donde aparecen las características físicas de estas membranas, se puede comprobar que el tamaño de poro de la fibra Accurel PP Q

3/2 es menor que el de la fibra Accurel PP S 6/2, efecto similar al observado para el espesor del capilar, por lo que el volumen de disolución orgánica retenido en ellos será menor y con ello, los moles de extractante efectivos para llevar a cabo la extracción. Sin embargo, el menor espesor de pared de la fibra Accurel PP Q 3/2, a pesar de disminuir el volumen de fase orgánica, debe conllevar que el transporte del metal a través de la membrana se realice con mayor rapidez, al recorrer una distancia menor en su difusión desde la interfase cargada-orgánica a la interfase orgánica-receptora. Por último, el diámetro interno también es menor con lo que, en principio, al tener mayor relación de volúmenes disolución cargada/receptora, se podrían mejorar los factores de preconcentración obtenidos experimentalmente.

Fibra	Tamaño de poro, μm	Porosidad, %	Espesor de pared, μm	Diámetro interno, μm	Área efectiva, cm^2 *	Volumen de orgánica, ml **
Accurel PP Q 3/2	0,20	75	200 ± 35	600 ± 90	1,89	0,038
Accurel PP S 6/2	0,55	72	450 ± 50	1800 ± 150	5,089	0,229

*Teniendo en cuenta la porosidad de la fibra; ** L = 10 cm de fibra

Tabla VI.1. Características físicas de las fibras utilizadas.

A continuación se explica el protocolo de montaje con cada una de estas fibras.

Fibra Accurel PP Q 3/2

Montaje 1

Como primera aproximación al sistema se siguió el mismo protocolo de montaje previamente descrito para el sistema Ni-DEHPA. Adicionalmente se modificó el paso en el que la fibra se cierra con el Parafilm© realizando el mismo con la fibra aún sumergida en la disolución de limpieza para minimizar la evaporación de la disolución orgánica debido a la mayor volatilidad del tolueno en comparación con el keroseno.

Montaje 2

Posteriormente, y con el fin de reducir en lo posible la pérdida de disolución orgánica durante la manipulación de las fibras se intentó automatizar en la medida de lo posible el montaje del sistema evitando al máximo la manipulación manual de la fibra. Para ello se insertaron en el tapón del bote donde se coloca la muestra 6 trozos de tubo rígido en el que se colocan las fibras en forma de U. De este modo pueden llenarse las fibras conectando a estos tubos rígidos otros tubos flexibles que permiten el llenado de la fibra mediante una bomba peristáltica. Para realizar este montaje se siguió el procedimiento descrito a continuación:

1. En primer lugar, tres fragmentos de fibra hueca Accurel PP Q 3/2, de 10 centímetros de longitud se mantuvieron sumergidos en tolueno durante 12 horas (ver figura VI.2), para que los poros de su estructura se expandan y estabilicen, favoreciendo así la posterior impregnación con la disolución orgánica. Al día siguiente las fibras se extraen del tolueno y se dejan secar para eliminar completamente el disolvente antes de comenzar el montaje del sistema.
2. Una vez secas, las tres fibras se colocan en los extremos de los tubos insertados en el tapón como se observa en la figura VI.2, repartidas de forma homogénea, manteniéndolas separadas y evitando la obstrucción de los poros.
3. Como se ve en la figura VI.2, por el otro extremo de los tubos se conectan los tubos flexibles que van a la bomba peristáltica y se procede a la limpieza del interior de las fibras pasando por el lumen la disolución receptora durante 2 minutos a la mínima velocidad posible.
4. Posteriormente las fibras llenas de disolución receptora se sumergen en la disolución orgánica durante 1 minuto para realizar su impregnación, tal y como se muestra en la figura VI.2.

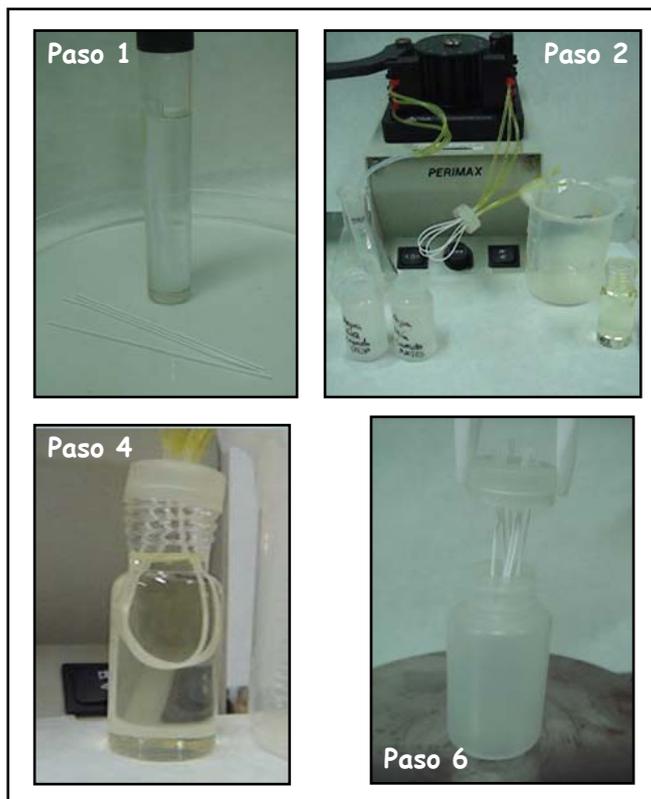


Figura VI.2. Etapas 1, 2, 3, 4 y 6 del montaje del sistema de HF-LPME.

5. El siguiente paso consiste en sumergir las fibras en agua milliQ para eliminar el exceso de disolución orgánica del exterior, y mientras tanto hacer pasar disolución receptora por el interior de la fibra para eliminar la disolución orgánica y el aire que se haya introducido durante la impregnación. De este modo se evita la evaporación del disolvente y se llena la fibra con disolución receptora nueva.
6. Posteriormente se para la bomba, se desconectan los tubos y se pasa el tapón con las fibras al bote de 30 ml de polipropileno de baja densidad que contiene la disolución cargada, como se ve en la figura VI.2, cerrándolo herméticamente.

7. Se ajusta la velocidad de agitación y se deja agitando el tiempo necesario para completar el experimento.
8. Una vez transcurrido el tiempo de extracción elegido se para la agitación y se extrae la gota de disolución receptora del interior de la fibra con la ayuda de una jeringa impulsando aire a través del tubo rígido de plástico colocado en el tapón y recolectando la muestra en un Eppendorf.

Fibra Accurel PP S 6/2

El montaje utilizado para esta fibra de mayores dimensiones, fue similar al anterior, utilizado para la fibra más pequeña, aunque en este caso se utilizaron frascos de muestra de 250 ml de modo que la modificación de la muestra durante la extracción se reduce permitiendo minimizar los cambios en la especiación de níquel durante el proceso. A continuación, se detallan los pasos seguidos para montar el sistema:

1. Se cortan hasta cinco segmentos de fibra hueca Accurel PP S 6/2, de longitud variable según la aplicación, y se sumergen en tolueno durante la noche para su acondicionamiento. Al día siguiente se extraen del tolueno y se dejan secar al aire.
2. En el tapón de un bote de 250 mililitros de plástico se practican 10 orificios y a través de ellos se insertan las 5 fibras en forma de U, utilizando los extremos de puntas de micropipeta (ver figura VI.3), para realizar la conexión con los tubos de la bomba peristáltica.
3. Las fibras se limpian pasando durante unos minutos disolución receptora por el interior de la fibra a la mínima velocidad de la bomba peristáltica. Posteriormente se limpian por dentro y fuera con agua milliQ, dejándolas vacías.
4. Con las fibras vacías se procede a la impregnación de las mismas introduciéndolas en la disolución orgánica durante 15 minutos, como se

observa en la figura VI.3. De este modo la disolución orgánica se introduce en los poros y en el interior de la fibra.

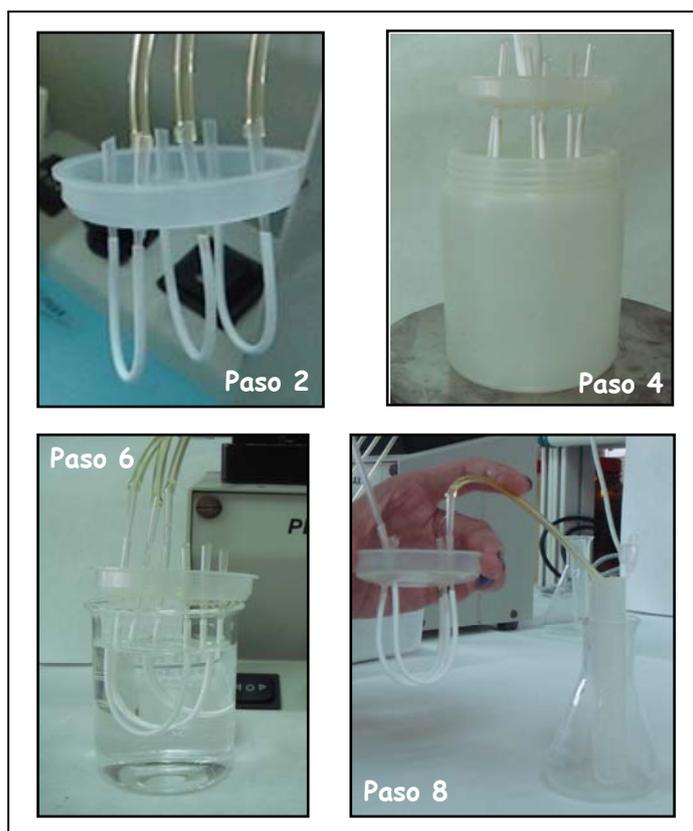


Figura VI.3. Etapas 2, 4, 6 y 8 del montaje del sistema de microextracción HF-LPME para la fibra Accurel PP S 6/2.

5. Luego se sumergen las fibras en agua milliQ para eliminar el exceso de disolución orgánica del exterior de la fibra y mientras tanto se hace pasar disolución receptora por el interior de las mismas durante dos minutos, con el objeto de extraer la disolución orgánica del interior de la fibra, limpiarla y llenarla con disolución receptora nueva.

6. Posteriormente se para la bomba y se desconectan las fibras de la misma, pasando el tapón con las fibras al frasco de 250 mililitros que contiene la disolución cargada, tal como se observa en la figura VI.3, tapándola herméticamente, de forma que las fibras queden totalmente sumergidas.
7. Se ajusta la velocidad de agitación a la correspondiente en cada caso y se deja funcionando durante el tiempo necesario para la extracción.
8. Una vez transcurrido el tiempo de extracción elegido se detiene la agitación y se extrae la gota de disolución receptora del interior de la fibra con la ayuda de la jeringa impulsando aire y recolectando la muestra en un Eppendorf, tal como se muestra en la figura VI.3.

Como se aprecia en el esquema de la figura VI.4, independientemente del tipo de fibra utilizada, una vez que contiene la disolución receptora en su interior y los poros se han impregnado con la disolución orgánica, la fibra se sumerge en la disolución cargada, formándose el sistema de 3 fases (cargada-orgánica-receptora).

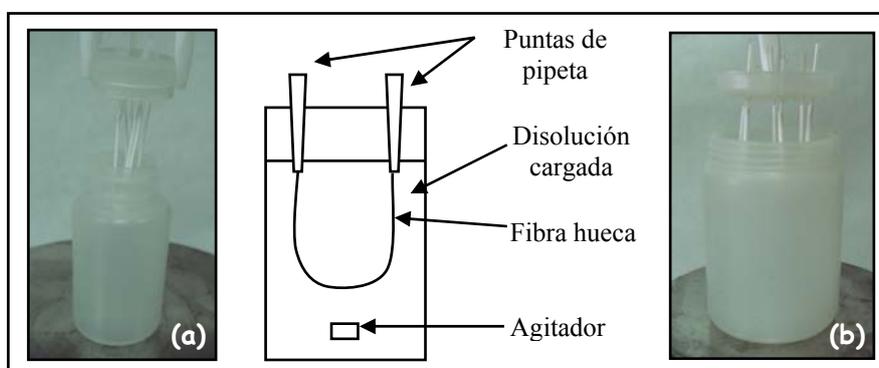


Figura VI.4. Esquema de los sistemas de HF-LPME. (a) Accurel PP Q 3/2, (b) Accurel PP S 6/2.

Estudios Preliminares

Fibra Accurel PP Q 3/2

En primer lugar se realizó el estudio de microextracción de níquel con el sistema Ni-CHBBH utilizando el mismo montaje ya descrito y utilizado previamente para el sistema Ni-DEHPA, y con las condiciones químicas optimizadas en el sistema de membrana de volumen: una concentración de níquel de $5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ en la disolución cargada, añadiendo una disolución de tampón HEPES para una concentración final de 0,1 M y la cantidad necesaria de una disolución 2 M de hidróxido sódico para ajustar el pH a 8, una concentración de 1,2-CHBBH de 0,89 mM disuelto en tolueno (2% DMF) y como disolución receptora ácido clorhídrico 1,3 M. Se probaron tres tiempos diferentes de extracción del sistema de 30, 60 y 90 minutos, manteniendo una agitación de 500 rpm.

Para establecer la eficiencia de la extracción se utilizó el factor de enriquecimiento descrito anteriormente (ecuación V.1).

En este sistema los análisis de las gotas extraídas del interior de las fibras fueron realizados con un equipo de espectrometría de absorción atómica con horno de grafito (GF-AAS) usando las condiciones expuestas en la tabla VI.2 y diluyéndolas previamente con 200 μl de agua milli-Q.

Etapas	Temperatura, °C	Tiempo, s	Rampa, s	Flujo argón, $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
Secado	100	30	10	0,2
Secado	130	20	30	0,2
Calcinación	1000	20	150	0,2
Atomización	2400	3	0	0
Limpieza	2600	3	0	0,2

Tabla VI.2. Programa de temperaturas utilizado para analizar níquel con GF-AAS. $\lambda=232,0 \text{ nm}$ y corrección de fondo con efecto Zeeman.

Como se ha comentado, posteriormente se estudió el efecto de distintos cambios en el montaje del sistema para conseguir el mejor funcionamiento del mismo antes de realizar la optimización de las variables químicas e hidrodinámicas. Entre estos estudios se evaluó el cambio del disolvente y modificador utilizados comprobando la viabilidad del sistema de extracción mediante un estudio de extracción líquido-líquido.

Fibra Accurel PP S 6/2

La utilización de una segunda fibra con características diferentes permite evaluar el efecto producido por dicho soporte. Así, la fibra Accurel PP S 6/2, como se puede apreciar en la tabla VI.1, posee tamaño de poro mayor y con ello aumenta tanto el volumen de la disolución orgánica como el área efectiva de contacto para la extracción de níquel. En este caso la disolución orgánica utilizada fue de 3mM de 1,2-CHBBH disuelto en tolueno al 2% DMF.

Una vez finalizados los estudios preliminares se realizó la optimización del sistema y el estudio del efecto de los ligandos orgánicos e inorgánicos utilizando como veremos la fibra Accurel PP S 6/2.

Optimización del sistema

La optimización del sistema Ni-CHBBH para la separación de las distintas especies de níquel en las aguas naturales se realizó siguiendo una estrategia de tipo univariante. La variable respuesta cuyo valor ha sido optimizado fue el factor de enriquecimiento, definido anteriormente (ecuación V.1). Las variables químicas estudiadas han sido en este caso la concentración de 1,2-CHBBH y la concentración de ácido clorhídrico en la disolución receptora. Posteriormente se realizó el estudio del efecto producido por la longitud de fibra utilizada y la velocidad de agitación. Como se ha comentado, estos experimentos y los realizados posteriormente fueron llevados a

cabo con el montaje descrito para la fibra Accurel PP S 6/2 y para un tiempo de extracción de 15 minutos. Las gotas extraídas fueron analizadas por GF-AAS, utilizando las condiciones descritas anteriormente en la tabla VI.2. De este modo se obtuvo el valor del factor de enriquecimiento bajo las condiciones optimizadas.

Aplicabilidad del sistema al análisis de concentraciones traza

Al igual que en el sistema Ni-DEHPA, antes de realizar la aplicación del sistema Ni-CHBBH estudiado a muestra reales se realizaron blancos para evaluar la contaminación procedente tanto del montaje de los experimentos como de los reactivos utilizados para preparar las disoluciones y, en su caso, intentar reducir la misma antes de la aplicación.

En este caso no fue posible realizar una limpieza de la disolución orgánica mediante una extracción líquido-líquido con la disolución ácida utilizada como disolución receptora, debido a la dificultad de separar las fases probablemente por el modificador de fase que contenía la disolución. Como para la membrana líquida de volumen, como disolución cargada se utilizó agua milli-Q sin añadir ninguna disolución reguladora debido a que cuando se realice la aplicación a las muestras reales éstas ya poseerán su propio sistema tampón carbonato/bicarbonato, y se utilizaron reactivos de alta pureza. En las condiciones optimizadas previamente, se realizaron dos réplicas de cada experimento, cada una montando cinco fibras. Las gotas obtenidas se analizaron directamente por GF-AAS y calibrado externo.

Una vez evaluados los blancos del sistema y utilizando las mismas condiciones, se bajó la concentración inicial de níquel en la disolución cargada a $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ para una mejor aproximación a la situación real.

Efecto de los ligandos

Ya que este sistema será aplicado a la determinación de las distintas especies de níquel presentes en aguas naturales, se hace necesario un estudio del efecto de los ligandos tanto inorgánicos como orgánicos sobre el factor de enriquecimiento.

Ligandos inorgánicos

Al igual que para los estudios anteriormente realizados con extracción líquido-líquido y membranas líquidas de volumen, se ha elegido como ejemplo más representativo de ligando inorgánico el cloruro. Los experimentos se llevaron a cabo del mismo modo que los anteriores, utilizando reactivos de alta pureza, y preparando las disoluciones cargadas con las correspondientes cantidades de cloruro sódico y una concentración de níquel de $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ en la disolución cargada. Las gotas se analizaron directamente por horno de grafito con las condiciones ya comentadas y calibrado externo.

Ligandos orgánicos

Del mismo modo, como ligando orgánico representativo se utilizaron los ácidos húmicos (AH). Las concentraciones de materia orgánica estudiadas para realizar los experimentos en el sistema optimizado cubrieron el rango de COD de las aguas naturales (2 a $31,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de COD). Para ello, se prepararon las disoluciones cargadas con las distintas concentraciones de COD a partir de una disolución concentrada de $300 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de ácidos húmicos preparada con su sal sódica y determinando la concentración exacta de COD en cada una a través de la metodología descrita en el anexo A.4.

El procedimiento de análisis fue el mismo que el descrito para el estudio de los cloruros, aunque en este caso se observaron interferencias de matriz en las medidas realizadas con el equipo de espectrometría de absorción atómica con horno de grafito,

por lo que para realizar adecuadamente el análisis de las muestras se decidió realizar un calibrado por adiciones estándar.

Análisis de distintas fracciones de níquel en aguas naturales

La aplicación de este sistema a muestras reales de aguas naturales se realizó para las mismas muestras analizadas con la membrana líquida de volumen del capítulo anterior (Muestras 1, 2 y 3 en el Anexo A.6). En cada caso, una porción de muestra se utilizó para la determinación de los contenidos totales mediante el sistema de extracción con APDC/DDDC, una segunda porción se utilizó para determinar las especies lábiles mediante AdCSV y una tercera porción se usó para su análisis mediante el sistema de membranas propuesto determinando las fracciones lábiles y no lábiles.

Posteriormente se compararon los resultados obtenidos con el nuevo sistema con los procedentes de las metodologías de referencia utilizando la prueba estadística t-Student de comparación de dos medias experimentales. Así mismo se compararon con los calculados teóricamente con el programa WinHumic V, y se estudió su aplicación para determinar las especies de Ni^{2+} , NiCl^+ y NiAH .

VI.III. RESULTADOS

Estudios preliminares

Pruebas de extracción con la fibra Accurel PP Q 3/2

Como se explica en el desarrollo experimental en primer lugar se utilizó el mismo montaje del sistema de fibra hueca que para el sistema Ni-DEHPA, y se trasladaron directamente las condiciones químicas optimizadas para la membrana líquida de volumen en el capítulo IV. Los experimentos se realizaron para una concentración de níquel en la disolución cargada de $5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ y para 3 tiempos de extracción. Como se puede observar en la figura VI.5, se obtuvo una alta

irreproducibilidad independientemente del tiempo de extracción utilizado. Además, al contrario que lo observado para el sistema de Ni-DEHPA, el factor de enriquecimiento disminuía drásticamente al aumentar el tiempo de extracción. Este comportamiento puede estar relacionado con la inestabilidad que presentan en general este tipo de membranas por pérdidas de disolución orgánica y/o agente extractante y que en este caso podrían estar produciéndose debido a la mayor volatilidad del tolueno en comparación con el keroseno utilizado en el sistema Ni-DEHPA. De hecho, durante el montaje del sistema se observa que tras la impregnación de la fibra se producía la evaporación del disolvente durante el proceso de cierre de los extremos, que se efectúa al aire, lo que podría además provocar la precipitación del reactivo en los poros de la membrana.

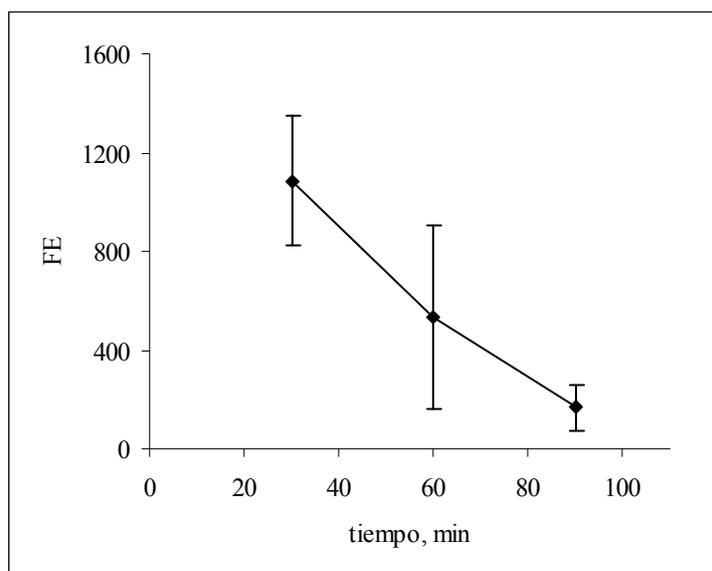


Figura VI.5. Variación del factor de enriquecimiento del sistema de HF-LPME para distintos tiempos de extracción. Disolución cargada: $5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Ni; 0,1 M HEPES; $35 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; Disolución orgánica: 0,89 mM 1,2-CHBBH; Disolución receptora: 1,3 M HCl; Velocidad de agitación: 500 rpm; L = 9 cm, Fibra Accurel PP Q 3/2.

Por esta razón, en primer lugar, se optó por repetir los experimentos cerrando las fibras con Parafilm© mientras éstas se encontraban aún sumergidas en la disolución de limpieza, reduciendo así la evaporación del disolvente. Esta prueba se realizó sólo para un tiempo de extracción de 60 minutos obteniendo un factor de enriquecimiento de $209,5 \pm 69,11$ muy bajo en comparación con el $530,8 \pm 372,1$ obtenido antes de la modificación, aunque algo más reproducible. Estos resultados indican que el propio montaje del sistema introduce una gran variabilidad en los resultados, por lo que se realizaron algunos cambios que minimizaran la manipulación de las fibras y la pérdida de disolvente orgánico durante el montaje.

Para ello se recurrió a montar las fibras en el tapón de un recipiente de polietileno de baja densidad y se acoplaron a una bomba peristáltica, tal y como se describió anteriormente, para introducir la disolución receptora en el interior de la fibra. Además se aumentó la concentración de reactivo en la disolución orgánica hasta 3 mM, la máxima concentración estable disuelta en tolueno al 2% de DMF, para aumentar la relación molar CHBBH:Ni. Sin embargo, el valor obtenido del factor de enriquecimiento disminuyó drásticamente y la irreproducibilidad fue aún mayor con una RSD del 64%. Probablemente esta irreproducibilidad estaría producida por la inestabilidad de la disolución orgánica en los poros o la todavía baja concentración de reactivo orgánico en la disolución, ya que la relación CHBBH:Ni en el sistema era de 0,03, por lo que existe un déficit de extractante en comparación con el níquel en la muestra.

De este modo que se realizaron nuevos estudios en dos sentidos. Por un lado se estudió la posibilidad de usar keroseno como disolución orgánica en la membrana, ya que había demostrado su viabilidad en los sistemas de fibra hueca para el sistema Ni-DEHPA. Por otro lado, se estudió el uso de otro tipo de fibras que permitiera mejorar la estabilidad de la disolución orgánica en los poros, así como aumentar el volumen de extractante y por tanto la relación molar CHBBH:Ni.

Una vez decidida la mejor opción se realizaron pruebas aumentando la concentración de reactivo en la disolución orgánica como inicio de optimización del sistema.

Viabilidad de la mezcla de TBP/Keroseno como disolvente en la fase orgánica

Debido a la baja solubilidad del 1,2-CHBBH en keroseno se optó por adicionar a este disolvente, una cierta cantidad de TBP, el cual actuaría como modificador de matriz.

Antes de utilizar esta disolución orgánica en el sistema de membranas de fibra hueca se realizó un estudio de extracción líquido-líquido para verificar su capacidad para extraer níquel bajo las condiciones estudiadas. Estos experimentos se llevaron a cabo del mismo modo que los expuestos en el capítulo I, utilizando una relación de volúmenes acuosa:orgánica de 1:1, con una concentración de metal de $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $35 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl y pH 8 en la disolución cargada. Se prepararon disoluciones orgánicas de concentraciones 3 y 4 mM de 1,2-CHBBH con distintas proporciones de TBP. En el caso del 35% de TBP, no fue posible aumentar la concentración de 1,2-CHBBH hasta 4 mM, debido a su precipitación. Los resultados obtenidos para las distintas disoluciones probadas se pueden ver en la figura VI.6.

Como se observa en la figura, la extracción disminuye con la proporción de TBP presente en la disolución orgánica, variando desde el 90% para un 35% de TBP hasta un 25% para un 100% de TBP. Esto puede estar relacionado con la capacidad del 1,2-CHBBH de formar aductos por puentes de hidrógeno con el TBP, de forma similar a lo observado para el DEHPA [7]. Como consecuencia de la formación de dichos aductos, se reducen las moléculas del extractante que son capaces de extraer níquel de la disolución acuosa y disminuye el porcentaje de extracción observado. Este efecto fue independiente de la concentración de 1,2-CHBBH, aunque como era de esperar, al

aumentar la concentración de agente extractante aumenta ligeramente la extracción de níquel.

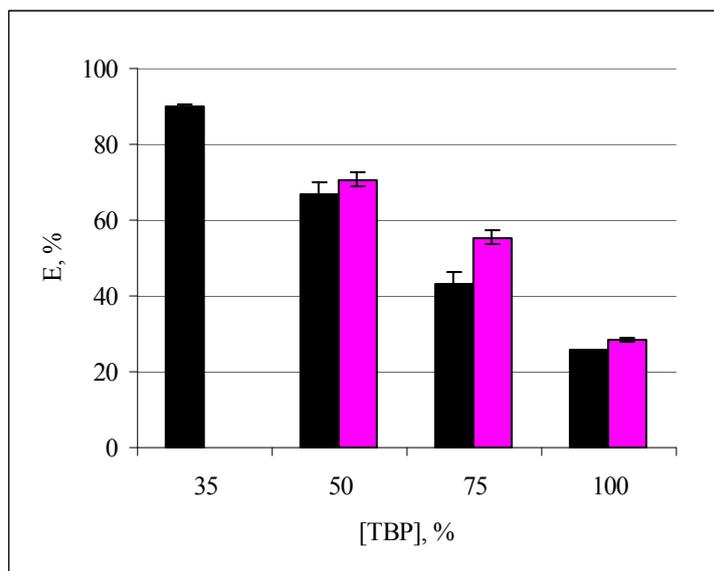


Figura VI.6. Efecto de la concentración de TBP en la extracción de níquel. Disolución cargada: $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Ni; $0,1 \text{ M}$ HEPES; $35 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; Disolución orgánica: 1,2-CHBBH en keroseno ■ 3 mM , ■ 4 mM .

Para cada una de las disoluciones orgánicas probadas se estudió la reextracción utilizando HCl $1,3 \text{ M}$. En la figura VI.7 se puede observar que la reextracción de níquel fue prácticamente cuantitativa para las tres mezclas TBP:keroseno.

Sin embargo para la disolución de 1,2-CHBBH en TBP se obtuvieron valores superiores al 100% de reextracción, debido probablemente a interferencias en la medida ya que la separación de las fases para esta disolución orgánica no se realizaba adecuadamente. Este fenómeno, aunque menos pronunciado, ya ocurre para concentraciones de TBP altas (75%) como se observa de los porcentajes de reextracción observados.

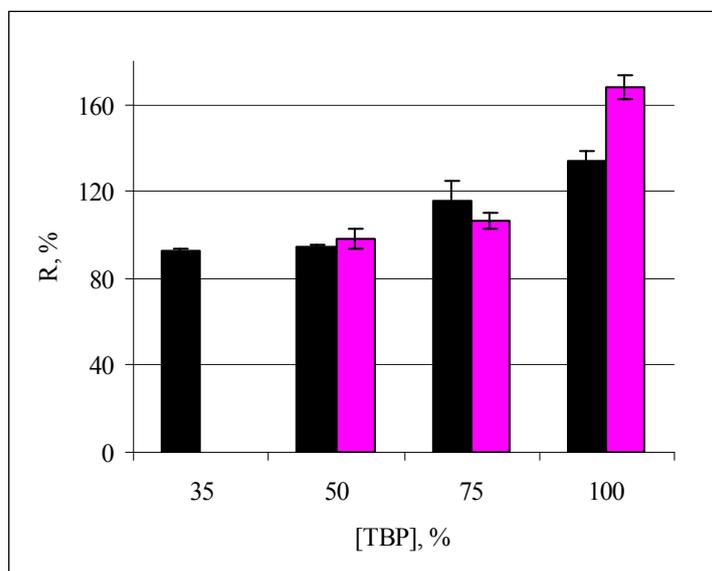


Figura VI.7. Efecto de la concentración de TBP en la reextracción de níquel. Disolución cargada: $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Ni; $0,1 \text{ M}$ HEPES; $35 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; Disolución orgánica: 1,2-CHBBH en keroseno ■ 3 mM 1,2-CHBBH ■ 4 mM 1,2-CHBBH.

A la vista de estos resultados se implementó en el sistema de membranas la disolución de TBP:keroseno 1:1 con 3 mM de 1,2-CHBBH utilizando el montaje anterior con bomba peristáltica, obteniendo para un tiempo de extracción de 60 minutos un factor de extracción de $0,69 \pm 0,16$. Como se puede observar el factor de enriquecimiento obtenido fue mucho menor que para la disolución de tolueno, posiblemente por la formación de aductos entre el TBP y el 1,2-CHBBH. Aunque la desviación estándar disminuyó ligeramente, probablemente por la mejor impregnación obtenida con el nuevo disolvente.

Pruebas de extracción con la fibra Accurel PP S 6/2

Como ya se ha comentado, la fibra Accurel PP S 6/2 posee un tamaño de poro mayor, aumentando tanto el volumen de la disolución orgánica utilizada y con ello la cantidad de extractante, así como el área efectiva de contacto para la extracción de

níquel, pudiendo por tanto mejorar el factor de enriquecimiento. Este efecto fue ya observado por Saleh y col. para un sistema de membrana de fibra hueca para determinar Se en muestras medioambientales [8].

Debido al cambio de fibra fue necesario realizar ciertas modificaciones al montaje de la membrana mediante el uso de una bomba peristáltica, las cuales se han detallado ya en el desarrollo experimental.

En primer lugar, con vistas a comparar los resultados con la nueva fibra y los obtenidos anteriormente, se utilizó la disolución orgánica con una concentración de 1,2-CHBBH de 3 mM disuelto en tolueno al 2% DMF. En estas condiciones el factor de enriquecimiento conseguido fue de $1,59 \pm 0,38$, algo mayor que el obtenido con la mezcla TBP:keroseno, sin modificar la reproducibilidad del sistema. Por esta razón se procedió a la optimización del nuevo sistema obtenido con la fibra Accurel PP S 6/2 para intentar aumentar los factores de enriquecimiento con vistas a su aplicación a muestras reales.

Optimización del sistema

Como se ha dicho anteriormente es importante aumentar la concentración de 1,2-CHBBH para que el reactivo se encuentre en exceso, por lo que ésta fue la primera variable a optimizar. No obstante, la concentración de 1,2-CHBBH más alta que pueda disolverse en tolueno al 2% DMF es de 4 mM, y a dicha concentración la relación molar Ni:CHBBH es aún insuficiente para conseguir una buena extracción. Por este motivo al mismo tiempo que se aumentó la concentración de extractante en la disolución orgánica fue necesario incrementar proporcionalmente la concentración de DMF. De este modo el rango de concentración de 1,2-CHBBH estudiado varió entre 3-30 mM y el porcentaje de DMF entre 2-38%. Los factores de enriquecimiento obtenidos para cada una de las disoluciones estudiadas se muestran en la figura VI.8.

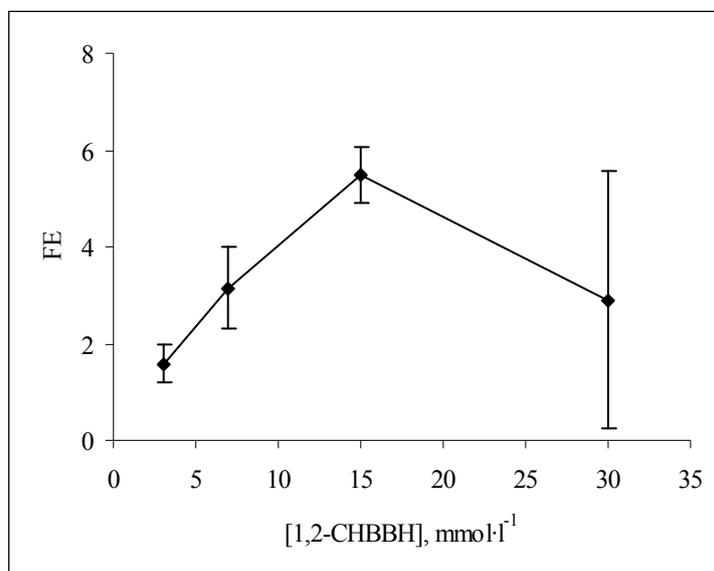


Figura VI.8. Efecto de la concentración de 1,2-CHBBH en el factor de enriquecimiento. Disolución cargada: $5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Ni; 0,1 M HEPES; pH = 8, $35 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; Disolución receptora: 1,3 M HCl; Velocidad de agitación: 500 rpm; L = 10 cm.

Como cabría esperar, en un primer momento se observa un incremento del factor de enriquecimiento con el aumento de la concentración del agente extractante, tal y como ocurría en el sistema Ni-DEHPA. Además se mantuvo una buena reproducibilidad hasta una concentración de 1,2-CHBBH de 15 mM a pesar de haber aumentado la proporción de modificador de matriz hasta el 16%. Sin embargo al aumentar aún más la concentración de 1,2-CHBBH se observa un aumento importante de la irreproducibilidad probablemente debido a que el porcentaje de DMF en este caso (38%) es demasiado alto, aumentando la polaridad de la disolución orgánica y por tanto su solubilidad en la disolución acuosa. Esto se traduce en una pérdida de la disolución orgánica, lo cual provoca una disminución en el transporte de níquel y por tanto en el factor de enriquecimiento, tal y como se observa en la figura VI.8. Por ello, se decidió utilizar como disolución orgánica en los siguientes experimentos la de 15 mM de 1,2-CHBBH disuelto en tolueno al 16% de DMF.

La siguiente variable química estudiada fue la concentración de ácido clorhídrico utilizada en la disolución receptora. En estos experimentos se varió la concentración de ácido en un rango desde 0,5 a 2 M. Como se observa en la figura VI.9 en el rango de concentraciones de ácido clorhídrico estudiado no existe un cambio significativo del factor de enriquecimiento, aunque para la concentración de 2 M el resultado obtenido mostró una mayor irreproducibilidad, que podría estar producida por la descomposición del reactivo a concentraciones tan altas de ácido o por disolución del reactivo extractante en la disolución receptora [3,9]. Por ello, se decidió mantener una concentración de ácido clorhídrico de 1,3 M para realizar los siguientes experimentos.

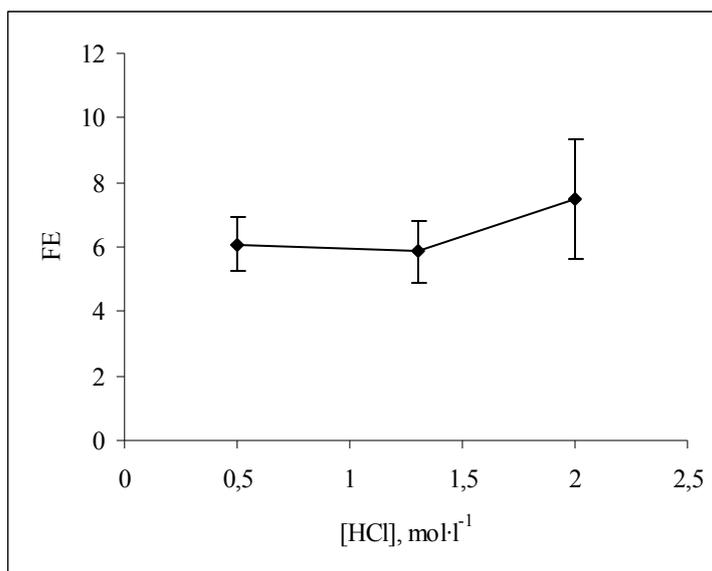


Figura VI.9. Efecto de la concentración de HCl en el factor de enriquecimiento. Disolución cargada: $5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Ni; 0,1 M HEPES; pH=8, $35 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; Disolución orgánica: 15 mM 1,2-CHBBH disuelto en tolueno (16% DMF); Velocidad de agitación 500 rpm; L = 10 cm.

Una vez estudiadas las variables químicas con mayor influencia en el sistema de extracción se estudiaron la longitud de fibra usada y la velocidad de agitación. En

primer lugar, la longitud de la fibra se aumentó hasta 13 y 16 centímetros, máxima longitud permitida con el sistema utilizado, obteniéndose los resultados mostrados en la figura VI.10, en la que se observa que el factor de enriquecimiento obtenido fue independiente de la longitud de la fibra en el rango de estudio.

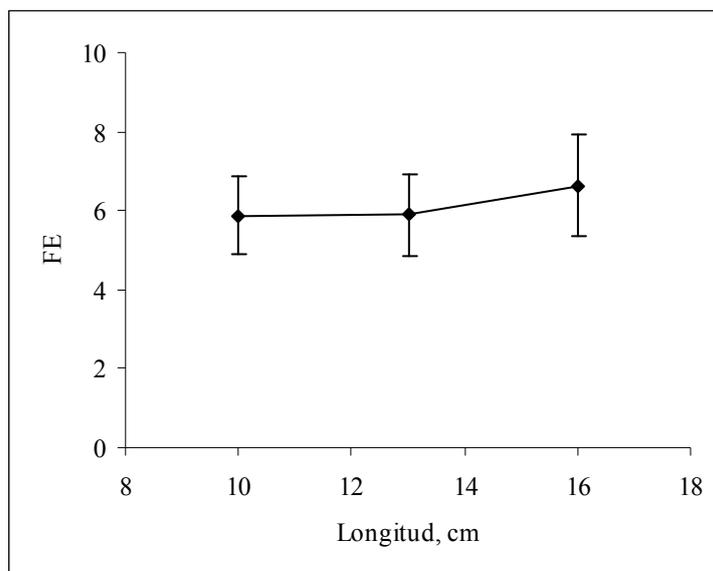


Figura VI.10. Efecto de la longitud de la fibra en el factor de enriquecimiento. Disolución cargada: $5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Ni; 0,1 M HEPES; pH=8; $35 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; Disolución orgánica: 15 mM 1,2-CHBBH disuelto en tolueno (16% DMF); Disolución receptora: 1,3 M HCl; Velocidad de agitación: 500 rpm.

Aunque al aumentar la longitud de la fibra se consigue un área efectiva de contacto para producir la extracción mayor, así como mayor volumen de disolución orgánica y por tanto mejor extracción, también aumenta el volumen de disolución receptora presente en el interior de la fibra, y por tanto aumenta la dilución del níquel transportado disminuyendo su concentración en esta disolución [10], por lo que pueden compensarse ambos efectos y el factor de enriquecimiento permanece invariable. En vista de los resultados obtenidos se decidió utilizar una longitud de fibra de 10 cm para los estudios posteriores.

Finalmente se realizó el estudio de las condiciones hidrodinámicas del sistema, variando la agitación entre 500 y 1100 rpm, mostrándose los resultados obtenidos en la figura VI.11. Para las velocidades más bajas probadas el factor de enriquecimiento no varía con la velocidad de agitación. Sin embargo para velocidades de agitación altas se produce una disminución del factor de enriquecimiento al aumentar la velocidad. Este efecto ya fue observado en el sistema Ni-DEHPA y se relaciona tanto por la pérdida de disolución orgánica de los poros como por las burbujas de aire producidos durante la agitación que se adhieren a la fibra disminuyendo el área efectiva para el transporte de níquel [2,11].

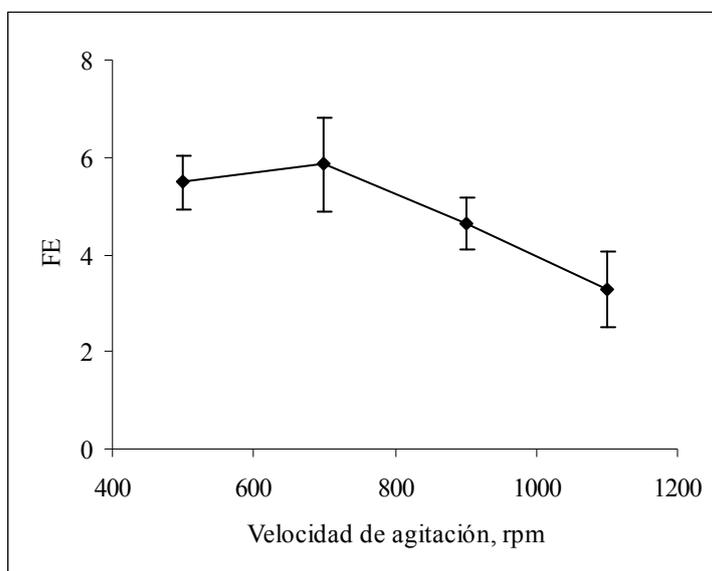


Figura VI.11. Efecto de la velocidad de agitación en el factor de enriquecimiento. Disolución cargada: $5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Ni; 0,1 M HEPES; $35 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; pH=8; Disolución orgánica: 15 mM 1,2-CHBBH disuelto en tolueno (16% DMF); Disolución receptora: 1,3 M HCl; L = 10 cm.

Bajo las condiciones optimizadas resumidas en la tabla VI.4, se consiguió un factor de enriquecimiento de 5,5, que aunque bajo, resulta suficiente para la aplicación del sistema al análisis de níquel en aguas naturales, y abre la puerta a su especiación.

Disolución orgánica	15 mM de 1,2-CHBBH en tolueno (16% DMF)
Disolución receptora	1,3 M HCl
Velocidad de agitación	500 rpm
Longitud de fibra	10 cm
Tiempo de extracción	15 minutos

Tabla VI.4. Condiciones de funcionamiento del sistema de HF-LPME para la especiación de níquel en aguas naturales.

Aplicabilidad del sistema al análisis de concentraciones traza

En este caso los blancos del sistema se realizaron con reactivos de alta pureza, pero no fue posible la limpieza de las disoluciones utilizadas debido a que no era posible separar las fases durante la extracción probablemente a la alta polaridad que presentaba la disolución orgánica al haber aumentado la cantidad de DMF utilizada. Por este motivo los valores obtenidos fueron mayores que los observados en el sistema Ni-DEHPA, con una concentración de níquel media en la disolución receptora de $1,84 \pm 0,98 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

En las condiciones optimizadas anteriormente y teniendo en cuenta los blancos obtenidos se estudió el efecto de bajar la concentración de níquel presente en la disolución cargada, para aproximarla aun más a las concentraciones reales de níquel en aguas naturales. Para ello se disminuyó la concentración en la disolución cargada hasta $1\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ obteniendo un factor de enriquecimiento de $5,5 \pm 1,2$. Como se puede observar la disminución de la concentración no ha afectado al factor de enriquecimiento, ya que con $5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ se había obtenido un valor de $5,5 \pm 1,0$. Esta independencia del factor de enriquecimiento con la concentración de níquel inicial ya ha sido observada anteriormente en sistemas similares [12]. A continuación se estudió el efecto de los ligandos utilizando en la disolución cargada una concentración de níquel de $1\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Efecto de los ligandos

Como se ha comprobado en los sistemas anteriores, la presencia en las aguas naturales de ligandos tanto inorgánicos como orgánicos influye en las distintas especies de níquel que pueden encontrarse, cada una de ellas con una determinada fuerza de enlace, de modo que pueden afectar a la extracción de níquel de diferente modo.

Ligandos inorgánicos

Al igual que para la membrana líquida de volumen se ha estudiado el efecto de los cloruros como ejemplo representativo de los ligandos inorgánicos en las aguas naturales. El rango de concentraciones estudiado fue de 0 a 21,25 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Cl^- , obteniendo los resultados que se observan en la figura VI.12.

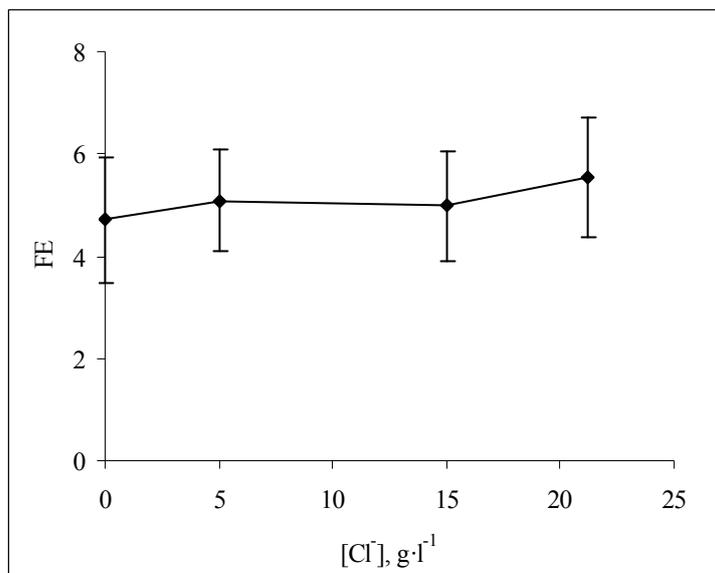


Figura VI.12. Influencia de la concentración de cloruros en el factor de enriquecimiento. Disolución cargada: 5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Ni; 0,1 M HEPES; pH=8; Disolución orgánica: 15 mM 1,2-CHBBH en tolueno (16% DMF); Disolución receptora: 1,3 M HCl; Velocidad agitación 500 rpm; L = 10 cm.

Observando la figura se puede concluir que el factor de enriquecimiento fue independiente de la concentración de cloruro, como ocurría en la membrana líquida de volumen para la eficiencia de la extracción, probablemente debido a la concurrencia de dos fenómenos: por un lado los complejos clorurados de níquel que se forman presentan constantes de formación lo suficientemente bajas para favorecer la formación del complejo del níquel con el agente extractante presente en la membrana líquida [13]. Por otro lado, al tratarse de un sistema de microextracción aunque se produzca la extracción de la especie Ni^{2+} siempre hay suficiente cantidad de esta especie en el seno de la disolución cargada para ser extraída, sin tener que recurrir al níquel que se encuentra formando complejos con los ligandos presentes, en este caso los cloruros.

Este comportamiento ha sido descrito anteriormente en sistemas similares. En este sentido, Saleh y col. realizaron el estudio de las posibles interferencias de los principales aniones presentes en las aguas naturales en la extracción de selenio con un sistema de fibra hueca, comprobando que no existían interferencias de los Cl^- a concentraciones por encima de $15 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ni de otros aniones como F^- , PO_4^{-3} y CO_3^{-2} a concentraciones de $0,050 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ [8]. Por otro lado, el estudio elaborado por Zeng y col. para realizar la especiación de Sb (III) y Sb (V) muestra el mismo efecto en presencia de los mismos aniones, no afectando al factor de enriquecimiento encontrado para Sb (III) [14].

Ligandos orgánicos

En cuanto a los ligandos orgánicos, se utilizaron como ejemplo representativo nuevamente los ácidos húmicos. El rango de concentraciones estudiado fue desde 6 a $90 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de ácidos húmicos (AH), que supone un rango de 2 a $31,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de COD. El efecto producido en el sistema optimizado se observa en la figura VI.13, donde se aprecia una disminución del factor de enriquecimiento del sistema optimizado con el

aumento de la concentración de AH en la disolución cargada, mostrando una relación lineal negativa entre ambas variables como ocurría con el sistema de membranas líquidas de volumen.

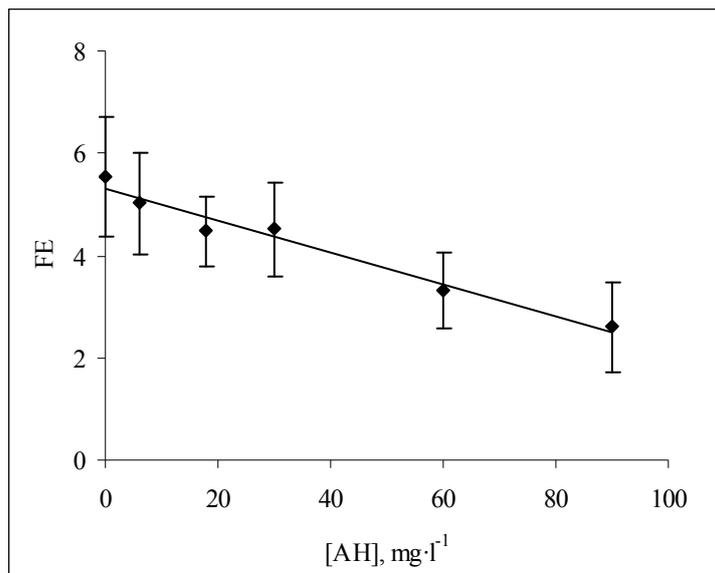


Figura VI.13. Influencia de la concentración de ácidos húmicos en el factor de enriquecimiento. Disolución cargada: 5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Ni; 0,1 M HEPES; pH=8; 35 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; disolución orgánica: 15 mM 1,2-CHBBH en tolueno (16% DMF); disolución receptora: 1,3 M HCl; velocidad de agitación 500 rpm; L = 10 cm.

De hecho, los cálculos de especiación realizados con el programa WinHumic V, que aparecen en la tabla VI.5, muestran un aumento de la formación de complejos orgánicos al incrementar la concentración de ácidos húmicos en la disolución cargada. De hecho, al igual que ocurría en la membrana de volumen para los porcentajes de extracción, se observó una correlación lineal negativa con un coeficiente de correlación de Spearman de -0,995 entre la concentración de los complejos orgánicos de níquel y los factores de enriquecimiento obtenidos.

Esta relación negativa existente entre la concentración de complejos orgánicos y el factor de enriquecimiento puede ser debida, como se comentó en un capítulo

anterior, a que los complejos orgánicos con los ácidos húmicos tienen constantes de formación altas, $K_{\text{HA-Ni}} = 10^{6,0}-10^{6,5} \text{ M}^{-1}$ [15], las cuales no permitirían que el metal pudiera ser transportado a través de la membrana como se ha observado en otros sistemas de membrana soportada con fibra hueca [6].

[AH], mg·l ⁻¹	[COD], mg·l ⁻¹	[Ni ²⁺]·10 ⁸ , M	[NiCl ⁺]·10 ⁹ , M	[NiAH]·10 ⁹ , M
0	0	1,25	4,42	0
6	2	1,20	4,23	0,74
18	6	1,10	3,90	2,04
30	10,5	1,02	3,60	3,15
60	21	8,60	3,04	5,32
90	31,5	7,43	2,63	6,90

Tabla VI.5. Datos teóricos de especiación de níquel para distintas concentraciones de ácidos húmicos.

Al igual que se hizo para la MLV con la eficiencia de extracción, este comportamiento permite obtener una relación lineal entre la concentración de COD en las muestras y los factores de enriquecimiento en presencia de materia orgánica (FE_{AH}) obtenidos para cada una de ellas, con un coeficiente de regresión lineal de 0,9675, que se muestra en ecuación VI.4.

$$FE_{\text{AH}} = -0,1058 \cdot [\text{COD}] + 5,2855 \quad (\text{VI.4})$$

Así pues, de forma similar al sistema de membrana líquida de volumen a partir de la medida de COD de una muestra real es posible obtener el factor de enriquecimiento correspondiente que permita calcular el contenido total de níquel en la muestra a partir de la medida de níquel en la disolución receptora.

Análisis de distintas fracciones de níquel en aguas naturales

Una vez conocido el comportamiento del sistema Ni-CHBBH elegido, así como los efectos producidos por los ligandos más habitualmente presentes en las muestras reales, se realizó la aplicación del sistema a la determinación de las fracciones metálicas presentes en las aguas naturales, utilizándose para ello las mismas muestras analizadas en el capítulo IV con el sistema de membrana líquida de volumen.

En primer lugar se realizó la determinación de níquel en la disolución receptora tras la extracción, utilizando la muestra directamente como disolución cargada a pH natural una vez filtrada. Para obtener las distintas fracciones se siguió un sistema similar al utilizado con el sistema de membrana líquida de volumen que se recoge en la figura VI.14 a modo de esquema.

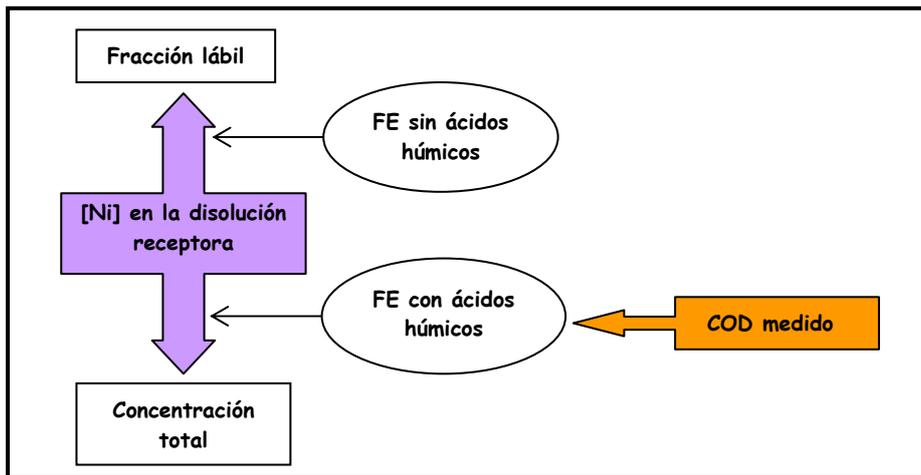


Figura VI.14. Determinación de las distintas especies de níquel en aguas naturales con el sistema de HF-LPME.

Para realizar la determinación de las distintas fracciones, además de realizar el análisis de níquel con el sistema optimizado, fue necesaria la determinación de la concentración de COD presente en las muestras analizadas. Así, con la ecuación VI.4

obtenida en el estudio de los ligandos orgánicos, se determina el factor de enriquecimiento para calcular la concentración de níquel total.

Al igual que en el capítulo anterior el procedimiento realizado para calcular las distintas fracciones de níquel fue el que se describe a continuación.

1. Obtención de la fracción lábil de níquel

Esta fracción se corresponde con el níquel libre y aquellos complejos cuyas constantes de formación son lo suficientemente bajas para ser transportadas a través de la membrana. Como se observa en la figura VI.14, para calcular su concentración en la muestra utilizaremos el valor de concentración medida en la disolución receptora y el factor de enriquecimiento obtenido en ausencia de ácidos húmicos (5,5), ya que este factor sólo tiene en cuenta las especies de níquel lábiles al calcularse en ausencia de agentes complejantes fuertes. Así, el cálculo se realizará con la ecuación VI.5:

$$[\text{Ni}]_{\text{lábil}} = \frac{[\text{Ni}]_{\text{m}}}{5,5} \quad (\text{VI.5})$$

donde $[\text{Ni}]_{\text{m}}$ representa a la concentración de níquel medida en la disolución receptora con GF-AAS.

2. Obtención de la concentración de níquel total

Como se comentó anteriormente, es posible obtener la concentración de níquel total a partir de los factores de extracción obtenidos en presencia de ácidos húmicos (FE_{AH}). Para conocer el valor del factor de extracción a utilizar en ese caso se hace necesario analizar el contenido de COD en la muestra y aplicar la relación lineal calculada anteriormente para ambas variables (ecuación IV.4). Con este valor, tal como muestra la figura VI.14, y a partir de la concentración de níquel determinada en la

disolución receptora, es posible obtener la concentración de níquel total mediante la ecuación VI.6.

$$[\text{Ni}]_{\text{total}} = \frac{[\text{Ni}]_{\text{m}}}{\text{FE}_{\text{AH}}} \quad (\text{VI.6})$$

3. Obtención de la fracción no lábil de níquel

Por último, la fracción no lábil se puede calcular utilizando la diferencia entre los valores calculados de níquel total y la fracción lábil, tal como se hizo para el sistema de MLV.

De este modo, podemos realizar la separación de las concentración de las distintas fracciones de níquel a partir de una única preconcentración de la muestra y analizando previamente el COD. Así, en nuestro caso se analizaron las muestras reales realizando para cada una de ellas un experimento con cinco capilares de fibra hueca sumergidos en la muestra durante 15 minutos, tras las cuales se analizó la disolución receptora del interior de las fibras mediante GF-AAS utilizando adiciones estándar. A partir de estas concentraciones y siguiendo el esquema de la figura VI.14 se realizó la estimación de las concentraciones de las distintas fracciones de níquel presentes en la muestra. Los resultados obtenidos para cada muestra se recogen en la tabla VI.6 junto con los obtenidos utilizando la membrana líquida de volumen y las metodologías de referencia.

Como se observa en la tabla los resultados obtenidos con la nueva metodología de capilares de fibra hueca fueron similares a los obtenidos tanto con la membrana líquida de volumen como con los métodos de referencia para las diferentes fracciones. De este modo, al igual que se observó para la membrana líquida de volumen, la fracción lábil obtenida con el sistema optimizado correspondería con la

suma de las especies metálicas inorgánicas presentes en la muestra más la especie libre del metal, ya que se corresponde con la obtenida con la metodología de AdCSV [16].

Muestra	Níquel total, $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$			Níquel lábil, $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$		
	Método de referencia*	MLV	HF-LPME	Método de referencia**	MLV	HF-LPME
1	$0,73 \pm 0,01$	$0,73 \pm 0,02$	$0,77 \pm 0,10$	$0,65 \pm 0,05$	$0,66 \pm 0,02$	$0,67 \pm 0,09$
2	$1,40 \pm 0,05$	$1,39 \pm 0,05$	$1,47 \pm 0,17$	$1,22 \pm 0,08$	$1,25 \pm 0,04$	$1,28 \pm 0,15$
3	$2,12 \pm 0,16$	$2,04 \pm 0,08$	$2,09 \pm 0,14$	$1,58 \pm 0,24$	$1,63 \pm 0,07$	$1,69 \pm 0,11$

* Extracción APDC/DDDC y medida con ICP-MS; ** CLEM AdCSV.

Tabla VI.6. Comparación de las fracciones de níquel analizadas con el sistema de HF-LPME, MLV y el método de referencia.

Para confirmar los resultados obtenidos se realizó el test t de comparación de dos medidas experimentales entre los resultados obtenidos con el sistema de capilares y los métodos de referencia (Anexos A.7 y A.8) [17]. Los resultados de la comparación se muestran en las tablas VI.7 y VI.8 para la fracción total y lábil, respectivamente.

Níquel total							
Muestra	Salinidad, $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	[COD], $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	Método de referencia, $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ *	HF-LPME, $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	ε , %	t Student	Test t
1	32,70	3,11	$0,73 \pm 0,01$	$0,77 \pm 0,10$	5,5	8,9	Aceptado**
2	28,90	3,46	$1,40 \pm 0,05$	$1,47 \pm 0,17$	-5,0	-0,7	Aceptado***
3	1,00	7,04	$2,12 \pm 0,16$	$2,09 \pm 0,14$	1,4	0,3	Aceptado***

* Extracción APDC/DDDC y medida con ICP-MS; ** $t_1 = 12,71$, *** $t_4 = 2,78$ ($\alpha = 0,05$)

Tabla VI.7. Comparación entre las concentraciones de níquel total obtenidas con el sistema de HF-LPME y el método de referencia.

Níquel lábil							
Muestra	Salinidad, g·l ⁻¹	[COD] mg·l ⁻¹	Método de referencia, μg·l ⁻¹ *	HF-LPME, μg·l ⁻¹	ε, %	t Student	Test t**
1	32,70	3,11	0,65 ± 0,05	0,67 ± 0,09	3,1	0,3	Aceptado
2	28,90	3,46	1,22 ± 0,08	1,27 ± 0,15	-4,1	0,5	Aceptado
3	1,00	7,04	1,58 ± 0,24	1,68 ± 0,11	6,3	0,8	Aceptado

* CLEM AdCSV ; ** $t_{\alpha} = 2,78$ ($\alpha = 0,05$)

Tabla VI.8. Comparación entre las concentraciones de níquel lábil obtenidas con el sistema de HF-LPME y el método de referencia.

Como se observa en las tablas VI.7 y VI.8 los resultados obtenidos con el método de HF-LPME no difieren significativamente de los obtenidos con la metodología de referencia elegida para un nivel de significación de 0,05, verificando la exactitud de los resultados obtenidos mediante el nuevo sistema, y por tanto su aplicabilidad para realizar el fraccionamiento de níquel en muestras reales tanto de agua dulce como salinas.

Una vez obtenidas las concentraciones de níquel de las distintas fracciones en las muestras analizadas, se realizaron los cálculos de las concentraciones teóricas de dichas fracciones con el programa de especiación WinHumic V. Para ello, se introdujeron en el programa los valores de concentración de los iones mayoritarios (Ni^{2+} , Na^+ , Cl^-), pH y materia orgánica que aparecen en la tabla VI.9 para cada muestra.

Muestra	[Cl ⁻], M	[Ni ²⁺]·10 ⁸ , M	[Na ⁺], M	pH	[COD], mg·l ⁻¹	[AH], mg·l ⁻¹
1	0,51	1,31	0,51	8,06	3,11	10,70
2	0,45	2,50	0,45	7,68	3,37	11,49
3	0,02	3,70	0,02	7,58	7,04	22,83

Tabla VI.9. Datos de entrada en el programa WinHumic V para el cálculo de las distintas fracciones de níquel en las muestras reales.

Una vez obtenidas las concentraciones de las diferentes especies de níquel, cuyos valores se recogen en detalle en el anexo A.11, la fracción lábil teórica se calculó como la suma de las concentraciones de las especies Ni^{2+} , NiCl^+ , $\text{Ni}(\text{OH})_2$ y NiOH^+ . La comparación de los valores teóricos obtenidos con los analizados con el sistema de HF-LPME propuesto se realizó con el uso de una prueba t-Student de comparación de una media experimental con un valor conocido para las fracciones lábiles y no-lábil [17]. Los resultados se muestran en las tablas VI.10 junto con los valores de concentración teóricos y experimentales para la fracción lábil y no lábil.

	Muestra	Teórica, $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	Experimental, $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	ε , %	t-Student	Test-t*
Lábil	1	0,68	$0,67 \pm 0,09$	1,5	-0,2	Aceptado
	2	1,34	$1,27 \pm 0,15$	5,2	-1,0	Aceptado
	3	0,05	$1,68 \pm 0,11$	100,0	33,1	Rechazado
No lábil	1	0,09	$0,08 \pm 0,01$	11,1	-2,2	Aceptado
	2	0,13	$0,16 \pm 0,03$	-23,1	2,2	Aceptado
	3	2,11	$0,37 \pm 0,02$	82,5	-194,5	Rechazado

* $t_4=2,78$ ($\alpha=0,05$)

Tabla VI.10. Comparación de las concentraciones de las distintas fracciones de níquel obtenidas teóricamente con el WinHumic V y las obtenidas experimentalmente con el sistema de HF-LPME.

En la tabla VI.10 se observa el mismo comportamiento que con el sistema de membrana líquida de volumen estudiado anteriormente, obteniendo resultados que concuerdan con los datos teóricos predichos por el programa de especiación para las muestras salinas 1 y 2, mientras que para la muestra 3 de agua dulce los valores no coinciden. Como ya se explicó esta falta de concordancia en los resultados con muestras de agua dulce se debe a la disminución de la fuerza iónica para esta muestra, ya que en el WinHumic V tiende a sobreestimar la proporción de cationes metálicos enlazados a las sustancias húmicas a bajas concentraciones de contraiones [18]. Así

pues las predicciones realizadas con el modelo V utilizado con el programa WinHumic V son válidas para muestras con alta salinidad, pero no para muestras no salinas.

En vista de los resultados obtenidos podemos concluir que es posible la aplicación de la metodología de microextracción desarrollada para la especiación de níquel en aguas naturales pudiendo determinar la fracción lábil y no lábil. No obstante, con la ayuda de los datos de especiación del WinHumic V se aplicó esta metodología para el cálculo de la concentración de la especie Ni^{2+} en las muestras salinas, partiendo de la hipótesis de que prácticamente todo el níquel presente en la muestra se encuentra como Ni^{2+} , NiCl^+ y NiAH . Para ello se considera la concentración de la especie NiAH como la correspondiente a la fracción no lábil determinada anteriormente con el sistema de HF-LPME. Para el cálculo de Ni^{2+} se tiene en cuenta el valor teórico de especiación obtenido con el WinHumic V para las especies de NiCl^+ , el cual nos daría la proporción de esta especie en la disolución cargada. De este modo podemos calcular un factor de enriquecimiento en ausencia de ácidos húmicos para la especie Ni^{2+} , teniendo en cuenta que en este caso las únicas especies presentes serían el Ni^{2+} y el NiCl^+ , mediante la ecuación IV.7.

$$FE_{\text{Ni}^{2+}} = \frac{[\text{Ni}]_r}{[\text{Ni}]_c - [\text{Ni}]_{\text{NiCl}^+}} \quad (\text{VI.7})$$

donde $[\text{Ni}]_r$ es la concentración de la gota medida por GF-AAS, $[\text{Ni}]_c$ es la concentración de níquel total en la disolución cargada y $[\text{Ni}]_{\text{NiCl}^+}$ se obtiene a partir de los datos teóricos de especiación calculados con el programa WinHumicV.

De este modo, aplicándole el factor de enriquecimiento calculados con la ecuación VI.7 y la concentración medida en cada muestra, podemos calcular la concentración de Ni^{2+} presente en las mismas.

En la figura VI.15 se muestran los resultados obtenidos mediante estos cálculos para las especies Ni^{2+} , NiCl^+ y NiAH . Como puede observarse el valor de Ni^{2+}

obtenido coincide con el predicho por el programa de especiación, por lo que la nueva metodología propuesta sería aplicable tanto para la separación de la fracción lábil y no lábil de la muestra como para el cálculo de la concentración de níquel libre (Ni^{2+}). Esto resulta especialmente interesante teniendo en cuenta que la mayoría de los métodos de especiación para metales en concentraciones traza no son capaces de diferenciar especies dentro de la fracción lábil, excepto algunos sistemas similares al propuesto [19-21].

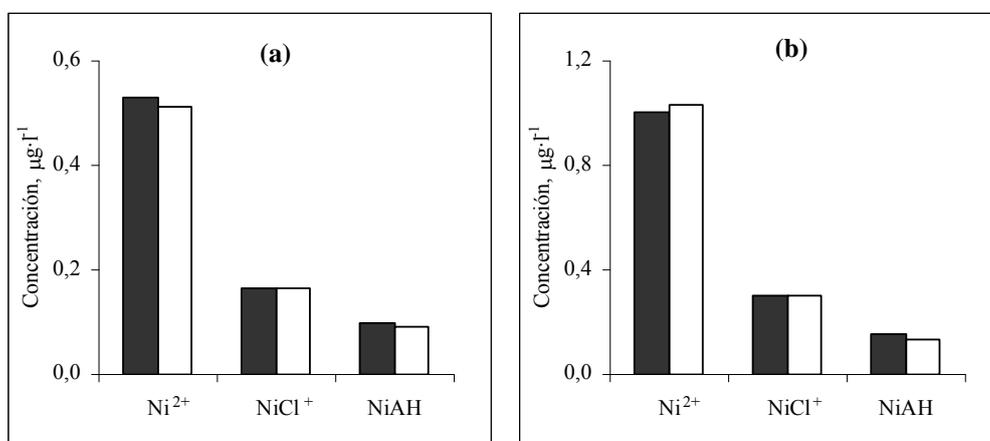


Figura VI.15. Concentración de las distintas fracciones de níquel en muestras reales salinas ■ Experimentales (MLV) y □ teóricos (WinHumic V). (a) Muestra 1, (b) Muestra 2.

Como se ha comentado antes, una de las ventajas que presentan estos sistemas es el pequeño volumen de disolvente utilizado. Si se compara esta metodología de capilares de fibra hueca con la de membrana de volumen expuesta en el capítulo anterior se observa una disminución del volumen de disolución orgánica de 100 ml a 0,229 ml, y de receptora de 12,5 ml a aproximadamente unos 0,2 ml. Además se consigue realizar la extracción sin cambios en la especiación de la muestra durante el proceso obteniendo una aproximación mucho más realista. Finalmente se reduce el tiempo de extracción de 9 horas a 15 minutos por lo cual, a pesar de que para el sistema Ni-CHBBH se obtienen valores bajos de factores de enriquecimiento, la

metodología con capilares de fibra hueca resulta la más adecuada para realizar la especiación de níquel en aguas naturales.

VI.IV. BIBLIOGRAFÍA

1. Pena-Pereira F., Lavilla I., Bendicho C., *Miniaturized preconcentration methods based on liquid-liquid extraction and their application in inorganic ultratrace analysis and speciation: A review*, *Spectrochimica Acta Part B*, 64, 1-15, 2009.
2. Xia L., Hu B., Jiang Z., Wu Y., Chen R., Li L., *Hollow fiber liquid phase microextraction combined with electrothermal vaporization ICP-MS for the speciation of inorganic selenium in natural waters*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 21, 362-365, 2006.
3. Jiang G., Hu B., Xia L., *Hollow fiber liquid phase microextraction combined with electrothermal atomic absorption spectrometry for the speciation of arsenic (III) and arsenic (V) in fresh waters and human hair extracts*, *Analytica Chimica Acta*, 634, 15-21, 2009.
4. Li L., Hu B., *Hollow-fibre liquid phase microextraction for separation and preconcentration of vanadium species in natural waters and their determination by electrothermal vaporization-ICP-OES*, *Talanta*, 72, 472-479, 2007.
5. Xia I.L., Hu B., Wu Y., *Hollow fiber-based liquid-liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography for the speciation of organomercury*, *Journal of Chromatography A*, 1173, 44-51, 2007.
6. Bautista-Flores A.N., Rodríguez de San Miguel E., De Gyves J., Jönsson J.A., *Optimization, evaluation, and characterization of a hollow fiber supported liquid membrane for sampling and speciation from aqueous solutions*, *Journal of Membrane Science*, 363, 180-187, 2010.
7. Gajda B., Bogacki M.B., *The effect of tributylphosphate on the extraction of nickel(II) and cobalt(II) ions with di(2-ethylhexyl)phosphoric acid*, *Physicochemical Problems of Mineral Processing*, 41, 145-152, 2007.
8. Saleh A., Yaminia Y., Faraji M., Shariati S., Rezaee M., *Hollow fiber liquid phase microextraction followed by high performance liquid chromatography for*

- determination of ultra-trace levels of Se(IV) after derivatization in urine, plasma and natural water samples*, Journal of Chromatography B, 877, 1758–1764, 2009.
9. García-Vargas M., Trevilla S., Milla M., *Synthesis and characterization of 1,2-cyclohexanedione bis-benzoyl-hydrazone and its application to the determination of Ti in minerals and rocks*, Talanta, 33, 209-214, 1986.
 10. Luciano R.M., Bedendo G.C., Carletto J.S., Carasek E., *Isolation and preconcentration of Cd(II) from environmental samples using polypropylene porous membrane in a hollow fiber renewal liquid membrane extraction procedure and determination by FAAS*, Journal of Hazardous Materials, 177, 567-572, 2010
 11. Abulhassani J., Manzoori J.L., Amjadi M., *Hollow-fiber based liquid microextraction using ionic liquid solvent for preconcentration of lead and nickel from environmental and biological samples prior to determination by electrothermal atomic absorption spectrometry*, Journal of Hazardous Material, 176, 481-486, 2010.
 12. Parthasarathy N., Pelletier M., Buffle J., *Hollow fiber based supported liquid membrane: a novel analytical system for trace metal analysis*, Analytica Chimica Acta, 350, 183-195, 1997.
 13. Motekaitis R.J., Martell A.E., *Speciation of metals in the oceans: I. Inorganic complexes in seawater, and influence of added chelating agents*, Marine Chemistry, 21, 101-116, 1987.
 14. Zeng C., Yang F., Zhou N., *Hollow fiber supported liquid membrane extraction coupled with thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry for the speciation of Sb(III) and Sb(V) in environmental and biological samples*, Microchemical Journal, 98, 307-311, 2011.
 15. Achterberg E.P., Van Den Berg C.M.G., Boussemart I.M., Davison W.,

- Speciation and cycling of trace metals in Esthwaite Water: A productive English lake with seasonal deep-water anoxia*, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 61, 24, 5233-5253, 1997.
16. Martino M., Turner A., Nimmo M., *Distribution, speciation and particle-water interactions of nickel in the Mersey Estuary, UK*, *Marine Chemistry*, 88, 161-177, 2004.
17. Miller J.N., Miller J.C., *Estadística y quimiometría para química analítica*, Pearson Education S.A. Madrid, 2002.
18. Chakraborty P., Chakrabarti C.L., *Chemical speciation of Co, Ni, Cu, and Zn in mine effluents and effects of dilution of the effluent on release of the above metals from their metal-dissolved organic carbon (DOC) complexes*, *Analytica Chimica Acta*, 571, 260-269, 2006.
19. Romero R., Jönsson J.A., *Determination of free copper concentration in natural waters by using supported liquid membrane extraction under equilibrium conditions*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381, 1452-1459, 2005.
20. Parthasarathy N., Buffle J., *Capabilities of supported liquid membranes for metal speciation in natural waters: application to copper speciation*, *Analytica Chimica Acta*, 284, 649-659, 1994.
21. Parthasarathy N., Pelletier M., Buffle J., *Transport of lipophilic metal complexes through permeation liquid membrane, in relation to natural water analysis: Cu(II)-8-hydroxyquinoline complex as a model compound*, *Journal of Membrane Science*, 355, 78-84, 2010.

CONCLUSIONES

1. De los tres sistemas químicos estudiados para la extracción de níquel (DEHPA, 1,2-CHBBH y TBP), sólo el basado en el uso del 1,2-CHBBH permite su aplicación para la separación de distintas fracciones de níquel en aguas naturales, mientras que el basado en el uso del DEHPA podría ser aplicado a la determinación de los contenidos totales.
2. La presencia de ligandos inorgánicos como el cloruro no afecta al sistema de extracción líquido-líquido Ni-CHBBH. Sin embargo, la presencia de ácidos húmicos produce una disminución en el porcentaje de níquel extraído proporcional a la cantidad de complejos orgánicos que se forman en la muestra.
3. Los complejos orgánicos débiles pueden ser extraídos mediante el sistema de extracción Ni-CHBBH, constituyendo aproximadamente el 50% de los complejos orgánicos presentes en las muestras.

4. Se ha optimizado un sistema de membrana líquida de volumen (MLV) para la separación y preconcentración de especies de níquel en aguas naturales, utilizando el sistema químico Ni-CHBBH, consiguiendo un factor de preconcentración de 35,1 en las condiciones optimizadas para nueve horas de funcionamiento del sistema.
5. Para el sistema de MLV desarrollado se ha encontrado que existe una disminución en la permeabilidad en presencia de ligandos orgánicos e inorgánicos. En el caso de los cloruros dicho descenso coincidía con el porcentaje de la especie NiCl^+ presente en agua de mar.
6. Para el sistema de MLV desarrollado se ha encontrado que existe una relación lineal negativa entre la eficiencia de la extracción de níquel bajo las condiciones optimizadas y la concentración de carbono orgánico disuelto (COD), en el rango de concentración estudiado.
7. Se ha demostrado la validez del sistema de MLV propuesto utilizando el sistema químico Ni-CHBBH para determinar las fracciones de níquel lábil, no lábil y total en muestras reales, a partir de su comparación con las correspondientes metodologías de referencia.
8. Se ha realizado con éxito la diferenciación y cuantificación de las distintas fracciones de níquel presentes en muestras de aguas naturales de diferente salinidad mediante el sistema de MLV desarrollado, así como el cálculo de las especies mayoritarias de níquel (NiCl^+ , Ni^{2+} , NiAH).

9. Se ha comprobado que las predicciones teóricas de especiación orgánica obtenidas con el modelo V usando el programa Winhumic V no son válidas para muestras no salinas.
10. Se ha optimizado un sistema de microextracción en fase líquida con capilares de fibra hueca para la separación y preconcentración de contenidos totales de níquel en aguas naturales, utilizando el extractante DEHPA, consiguiendo unos factores de enriquecimiento para muestras reales de distinta salinidad de 29,7 tras una hora de funcionamiento.
11. Se ha optimizado un sistema de microextracción en fase líquida con capilares de fibra hueca para la separación y preconcentración de las distintas fracciones de níquel en aguas naturales, utilizando el agente extractante 1,2-CHBBH, consiguiendo un factor de enriquecimiento para muestras reales de distinta salinidad de 5,5 tras quince minutos de funcionamiento.
12. Los factores de enriquecimiento obtenidos en los sistemas de microextracción en fase líquida con capilares de fibra hueca fueron independientes de la concentración de níquel inicial en las muestras.
13. Los sistemas de microextracción en fase líquida con capilares de fibra hueca consiguieron mejorar los tiempos de extracción y disminuir los volúmenes de reactivos utilizados en comparación con los otros sistemas de extracción, pudiendo englobarse esta metodología dentro de la Química Analítica Verde.
14. Para el sistema de microextracción en fase líquida utilizando 1,2-CHBBH como agente extractante se ha encontrado una relación lineal negativa entre el

factor de enriquecimiento de níquel bajo las condiciones optimizadas y la concentración de COD en el rango de concentración estudiado.

15. Se ha demostrado la validez de los sistemas de microextracción en fase líquida con capilares de fibra hueca propuestos para la determinación de los contenidos de níquel totales y su especiación a partir de su comparación con las correspondientes metodologías de referencia.
16. Se ha realizado con éxito la diferenciación y cuantificación de las distintas fracciones de níquel presentes en muestras de aguas naturales de diferente salinidad mediante el sistema de microextracción con el agente extractante 1,2-CHBBH, así como el cálculo de las especies mayoritarias de níquel (NiCl^+ , Ni^{2+} , NiAH).
17. Se ha demostrado que los sistemas de microextracción en fase líquida con capilares de fibra hueca son los más adecuados para realizar la determinación de las distintas fracciones de níquel en aguas naturales de distinta salinidad gracias a su menor tiempo de extracción, menor gasto de reactivos y por tanto menor generación de residuos, y a sus adecuados factores de preconcentración.

ANEXOS

A.1. LISTA DE REACTIVOS Y APARATOS

Reactivos

- Acetato amónico ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$): P.A., Merck (Alemania)
- Acetona: P.A., Merck (Alemania)
- Ácido acético (CH_3COOH): P.A., Merck (Alemania)
- Ácido clorhídrico 37% (HCl): P.A., Merck (Alemania)
- Ácido clorhídrico 30% (HCl): Suprapur, Merck (Alemania)
- Ácido di-2-etilhexilfosfórico 97% ($\text{C}_{16}\text{H}_{35}\text{O}_4\text{P}$): Sigma-Aldrich (Alemania)
- Ácido etilendiamintetraacético, EDTA, sal disódica, dihidrato ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$): P.A., Scharlab (España)
- Ácidos húmicos, sal sódica, 98%: Across, (Bélgica)
- Ácido nítrico 65% (HNO_3): P.A., Scharlab (España)
- Ácido nítrico 65% (HNO_3): Suprapur, Scharlab (España)
- Ácido perclórico 60% (H_2ClO_4): P.A., Merck (Alemania)
- Ácido sulfúrico 97% (H_2SO_4): P.A., Merck (Alemania)
- Ácido 4-(2-hidroxietil)piperacina-1-etanosulfónico (HEPES): P.A., Biochemical, BDH (Gran Bretaña)
- Benzoílhidrácida 98% ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CONH}_2$): Ega-Chemie (Alemania)
- Bicarbonato sódico (NaHCO_3): P.A., Merck (Alemania)
- Carbonato Sódico (CaCO_3): P.A., Merck (Alemania)
- Cloroformo (CHCl_3): P.A., Merck (Alemania)
- Cloruro amónico (NH_4Cl): P.A., Merck (Alemania)
- Cloruro sódico (NaCl): P.A., Merck (Alemania)
- Citrato de trisodio ($\text{C}_6\text{O}_7\text{H}_5\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$): P.A., Merck (Alemania)
- Dietilamonio dietilditiocarbamato (DDDC) ($\text{C}_9\text{H}_{22}\text{N}_2\text{S}_2$): P.A., Scharlab (España)
- Dihexileter 97% ($\text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{O}$): Purum, Fluka (Japón)

- Disolución patrón de níquel: $1,000 \pm 0,002 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ en 2,5% HNO_3 , ICP-MS, Panreac (España)
- Dodecano 95% ($\text{C}_{12}\text{H}_{26}$): P.A., Fluka, (Suiza)
- Dodecanol 97% ($\text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{O}$): P.A., Fluka (Suiza)
- Dimetilformamida (DMF): P.A., Sigma-Aldrich (Alemania)
- Etanol 96% ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$): P.A., Merck (Alemania)
- Hexano (C_6H_{14}): HPLC, Scharlab (España)
- Hidróxido sódico (NaOH): P.A., Merck (Alemania)
- Keroseno: Purum, Fluka (Alemania)
- Metanol (CH_3OH): P.A., Merck (Alemania)
- Tolueno (C_7H_8): Purísimo, Scharlab (España)
- 1-pirrolidinditiocarbamato de amonio (APDC) ($\text{C}_5\text{H}_8\text{NS}_2\text{NH}_4$): Fluka (Alemania)
- 1,2-Ciclohexanodiona ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_2$): P. Síntesis, Merck, (Alemania)

Disoluciones

A continuación se detallan las disoluciones preparadas para llevar a cabo los análisis de níquel total y lábil con las metodologías de referencia.

Contenidos totales

Estas disoluciones fueron preparadas en una sala blanca clase 10.000 equipada con una campana de flujo laminar con filtro HEPA (clase 100).

Disolución APDC/DDDC

1. En un embudo de decantación se pesan 1,5 g de APDC junto con 1,5 g de DDDC llevándolos a 100 ml con agua milli-Q.

2. Se añade 1 ml de NH_3 para estabilizar el ligando en la disolución.
3. Se añaden 5 ml de cloroformo y se agita 2 minutos y posteriormente se deja reposar 5 minutos desechando la disolución orgánica. Este paso se repite dos veces más con 3 ml de cloroformo.
4. La disolución limpia se trasvasa a un bote de teflón limpio enjuagándolo antes con la misma y se añaden 500 μl de cloroformo.

Esta disolución será estable durante 3 días a temperatura ambiente.

Disolución de cloroformo

1. Se llena un bote de teflón limpio dejando un hueco para añadir un poco de agua milli-Q.
2. Se agita el cloroformo con el agua unos minutos y se elimina el agua presionando las paredes del bote para que de este modo el agua rebose por la apertura del bote. Este paso se repite 3 veces más con porciones nuevas de agua milli-Q.

Disolución tampón acético/acetato

1. En una botella de 1 litro de polietileno se prepara una disolución saturada de acetato amónico usando agua milli-Q.
2. Se limpia la disolución mediante extracción con cloroformo y APDC/DDDC.
 - Se toman 250 ml de la disolución en un embudo de decantación y se añade 1 ml APDC/DDDC y 8 ml de cloroformo. Se agita 2 min y se deja separar 5 min desechando la disolución orgánica. Se repite la operación 2 veces usando 6 ml de cloroformo.
 - Se almacena la disolución limpia en una botella de polietileno.

Aparatos

- Agitador magnético modelo Agimatic S, Selecta (España)
- Agitador de balanceo Heidolph Promax 2020 (Alemania)
- Analizador de carbono, multi N/C 3100, Analytic Jena, (Alemania)
- Balanza AA-160, Denver Instrument Company (EE.UU.)
- Bomba peristáltica Masterflex, Cole Parmer (EE.UU.)
- Campana de flujo laminar con filtro absoluto HEPA, Crumair 9005-FL, Cruma (España)
- Campana de flujo laminar con filtro ULPA, Series CSB (Clase II según EN12469): EuroAire, TDI S.A. (España)
- Conductímetro-pHmetro 4330, Jenway (Reino Unido)
- Digestor UV, modelo 705, Metrohm (Suiza)
- Electrodo de pH 211 Microprocessor pH-meter, Hanna (EE.UU.)
- Espectrofotómetro UV-VIS, Lambda XLS, Perkin Elmer (EE.UU.)
- Espectrofotómetro de absorción atómica, SolaarM, Thermo (Reino Unido)
- Espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente, Series X-7, Thermo (Reino Unido)
- Estufa Contern Cod. 2000209, Selecta (España)
- Micropipetas de volumen variable, Eppendorf (Alemania)
- Micropipetas de volumen fijo, Pipetman F, Gilson (Francia)
- Sonda multiparamétrica portátil (pH, T^a, Conductividad, oxígeno disuelto), Sension156, Hach (EE.UU.)

Materiales

- Botes de polietileno de baja densidad, diferentes volúmenes, Azlon Bibby (Reino Unido)

- Botes de vidrio ámbar 250 mL, Scharlab (España)
- Fibra hueca capilar, Q3/2 Accurel PP, Membrana (Alemania)
- Fibra hueca capilar, S6/2 Accurel PP, Membrana (Alemania)
- Cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz, Starna Ltd. (EE.UU.)
- Embudos de separación de Teflón, Nalgen Nunc. International, Cole-Parmer (EE.UU.)
- Filtros de nylon de 0,5 μm , Millipore (EE.UU.)
- Jeringa de plástico de 1 mL BD-Micro-Fine (Beckton and Dickinson, EE.UU.)
- Matraces aforados de vidrio, diferentes volúmenes, Afora (España)
- Pipetas de vidrio, diferentes volúmenes, Afora (España)
- Tubos de Tygon para bomba peristáltica de d.i. = 1,14 y 1,42 mm, Elkay (EE.UU.)

A.2. SÍNTESIS DEL REACTIVO 1,2-CHBBH

Los pasos que se siguieron para llevar a cabo la síntesis de la 1,2-ciclohexanodiona bisbenzoilhidrazona son los que aparecen a continuación.

1. En un vaso de precipitados se pesan 0,168 gramos de 1,2-ciclohexanodiona y en otro vaso 0,409 gramos de benzoilhidracida y se disuelven en 15 mililitros de etanol cada uno.
2. Se vierten las disoluciones anteriores en un matraz de fondo redondo y se añaden tres gotas de ácido clorhídrico concentrado.
3. La mezcla de reacción se pone a reflujo durante 30 minutos sumergida parcialmente en un baño caliente.
4. Luego se deja enfriar y se vierte el contenido del matraz en un vaso de precipitados. Se vierten 90 mililitros de agua milli-Q en el matraz de fondo redondo poco a poco intentando recoger los precipitados que se han podido formar en la mezcla de reacción.
5. El vaso de precipitados se tapa con un trozo de Parafilm© y se introduce en el frigorífico durante toda la noche.
6. Al día siguiente se filtra para recoger el precipitado de color amarillo formado y con un poco de agua milli-Q se recogen los restos del precipitado que queden en el vaso.
7. El precipitado filtrado se introduce en la estufa a 80°C hasta que esté completamente seco.
8. Para recristalizar el reactivo sintetizado, se disuelve de nuevo en la mínima cantidad de etanol posible calentándolo (incluso evaporando un poco de etanol).
9. Una vez disuelto se añade agua milli-Q guardando la relación 1:3 etanol/agua y se introduce en el frigorífico hasta el día siguiente.

10. Al igual que antes, se realizan los pasos 6 y 7, obteniendo un precipitado mucho más limpio y de un color amarillo más claro que el anterior.

A.3. TRATAMIENTO UV DE LAS MUESTRAS

Para destruir los complejos orgánicos formados en las muestras, con la materia orgánica natural en las muestras reales o la añadida en las muestras sintéticas, se realizó una digestión UV de las mismas con un digestor UV. Para ello, se realizó el siguiente procedimiento:

1. Un volumen de unos 12 ml de las muestras se colocan en los tubos de cuarzo del digestor.
2. Se añaden 100 µl de H₂O₂ para catalizar la reacción de digestión.
3. Se irradian las muestras con la radiación UV durante 90 minutos.

A.4. ANÁLISIS DE CARBONO ORGÁNICO DISUELTO (COD)

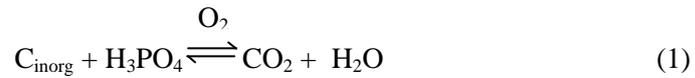
El análisis de las concentraciones de COD de las muestras tanto sintéticas como reales se realizó utilizando un analizador de carbono. El analizador utiliza el método diferencial, en el que el contenido de COD es obtenido por diferencia del contenido de carbono total y el contenido de carbono inorgánico, siendo el procedimiento seguido para analizar ambas concentraciones de carbono en las muestras el que aparece a continuación:

Análisis del contenido de carbono total

1. Primero la muestra se coloca en el automuestreador y el equipo toma unos 500 µl de muestra para inyectarlos en el horno vertical de cuarzo que contiene un catalizador de platino en su relleno.
2. Al encontrarse el horno a una temperatura de 800 °C el carbono procedente de la materia orgánica, tanto orgánico como inorgánico, es transformado en CO₂ más vapor de agua.
3. El CO₂ producido en el paso anterior se transporta a través de un flujo continuo de gas O₂ a un detector de infrarrojos donde se determina la concentración de carbono total a partir de un calibrado realizado con una mezcla de carbonato/bicarbonato.

Análisis del contenido de carbono inorgánico

1. Posteriormente otra porción de 500 µl de muestra se inyecta en una cámara de acidificación que se encuentra a 10°C de temperatura y con ácido ortofosfórico (H₃PO₄) en la que burbujea continuamente gas O₂.
2. Al llegar la muestra a esta cámara, el carbono inorgánico presente en la muestra reacciona con el ácido ortofosfórico a través de la ecuación 1.



3. El CO₂ producido en el paso anterior se determina a través del mismo detector que el carbono total.

El análisis completo de las dos fracciones de carbono se realiza por triplicado, devolviendo una concentración media de ambas con sus desviaciones estándar, que se utiliza para realizar la medida de COD a través de su diferencia.

Con el objetivo de determinar el contenido en carbono de las muestras utilizadas con distintas concentraciones de ácidos húmicos se realizó el análisis de distintas concentraciones en un rango desde 10 a 200 mg·l⁻¹ de AH con este equipo encontrando una regresión lineal como la que aparece en la ecuación 2.

$$[COD] = 0,3234 [AH] - 0,3465, \quad r^2 = 0,999 \quad (2)$$

De este modo, fue posible determinar los contenidos de COD de las muestras y establecer una relación AH:COD de 3:1.

A.5. OPTIMIZACIÓN MULTIVARIANTE: SIMPLEX MODIFICADO

La optimización del sistema de MLV para su aplicación a muestras reales se realizó a través de una optimización multivariante Simplex. En este método se utiliza una figura geométrica denominada simplex que consta de $k+1$ vértices, siendo k las dimensiones de las que consta el espacio considerado y que representan las variables de estudio. A cada uno de los vértices seleccionados para formar el simplex inicial le va a corresponder una respuesta analítica, que va a ser el parámetro a optimizar con esta metodología. Por ello, el simplex inicial va a ir avanzando en el espacio eliminando los vértices que posean valores de respuesta peor y reemplazándolos por otro vértice nuevo calculado a través de las normas que se explican a continuación [1]:

1. El nuevo vértice se calcula mediante una reflexión eliminando el vértice con peor respuesta a través de la ecuación 1:

$$R = C + (C - P) \quad (1)$$

donde R representa al nuevo vértice, C el centroide entre los vértices que se mantienen y P el vértice con peor respuesta.

2. Si el nuevo vértice calculado presenta la peor respuesta éste se calcula rechazando el segundo vértice con peor respuesta.

3. Si uno de los vértices del simplex se repite después de un número de simplex $K+1$ sin haber sido eliminado anteriormente debe ser reevaluado experimentalmente antes de continuar.

Sin embargo, con el objetivo de agilizar el proceso de optimización en esta tesis se ha aplicado el Método simplex Modificado desarrollado por Nelder y Mead en 1965, que permite el cálculo del nuevo vértice utilizando expansiones (E) y

1. Bayne C.K., Rubin I.B., *Practical experiments design and optimization methods for chemist*. VCH Publishers, Inc., Florida, 1986.

contracciones (C), además de la reflexión (R) [2]. Para establecer cuál de ellos debe calcularse en cada momento y obtener su valor se siguen las normas que se exponen a continuación:

1. El nuevo vértice se calculará a través de una expansión (E), si se cumple que la respuesta del vértice reflejado (R) es mejor que la mejor obtenida con el simplex anterior. El cálculo de la expansión se realiza a través de la ecuación 2.

$$E = C + n(C - P) \quad (2)$$

donde n representa a una constante fijada de antemano a un valor mayor que 1, normalmente 2.

2. Se calcula el nuevo vértice a través de una reflexión si la respuesta del vértice reflejado (R) se encuentra entre el mejor y el segundo peor valor.

3. Se calcula una contracción si la respuesta del vértice reflejado es peor que el segundo peor valor obtenido en el simplex anterior. Además este vértice puede ser una contracción positiva (C^+), si la respuesta del vértice reflejado es mayor que la del vértice rechazado (P) y una contracción negativa (C^-) si es menor, calculándose cada una de ellas mediante las ecuaciones 3 y 4, respectivamente.

$$C^+ = C + m(C - P) \quad (3)$$

$$C^- = C - m(C - P) \quad (4)$$

donde m es al igual que n un valor prefijado, en este caso entre los valores 0 y 1, siendo normalmente de 0,5.

Entre los distintos criterios utilizados para establecer el final del simplex se ha elegido el criterio de la comparación de las varianzas del sistema experimental (s_{ML}^2)

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

para tres réplicas con la del simplex formado por los tres vértices en cada caso (s_s^2). De manera que si el valor del estadístico F calculado con la ecuación 5 es menor al valor de F teórico, obtenido a través de la tabla del estadístico F para una cola y con los grados de libertad de ambas varianzas, se para el simplex, ya que esto significa que las variaciones del simplex se deben únicamente a errores aleatorios y se habría encontrado el óptimo. El valor de F se elige de forma que $p = \Pr (s_s^2/s_{ML}^2 < F) = 0,67$, es decir, existe una probabilidad del 33% de seguir realizando la optimización del sistema cuando debería haberse parado.

$$F = \frac{s_s^2}{s_{ML}^2} \quad (5)$$

A.6. TOMA DE MUESTRAS

Las muestras reales tomadas para realizar la aplicación de la metodología de membranas líquidas de volumen (MLV) y microextracción en fase líquida (LPME) fueron recogidas en los puntos de la provincia de Cádiz que se muestran en la figura 1. Las muestras 1 y 2 se tomaron en un caño de marea, el río San Pedro, situado en el municipio de Puerto Real, y la muestra 3 se tomó en la desembocadura del río Guadalete en el Puerto de Santa María. El resto de las muestras que aparecen en la tabla 1 fueron tomadas en distintos puntos del río Guadalquivir (Sevilla), como puede observarse en la figura 1.



Figura 1. Puntos de toma de muestras en las cuencas del río Guadalquivir (A) y Guadalete (B). http://discomap.eea.europa.eu/map/WISE/?configfile=http://discomap.eea.europa.eu/map/WISE/config_rbdinfo.xml

Para las muestras de la cuenca del río Guadalete (muestras 1 a 3) en cada punto se tomaron 10 litros de muestra que fueron filtrados en el laboratorio utilizando filtros de nylon de $0,45\ \mu\text{m}$ de tamaño de poro. Posteriormente, parte de la muestra se congeló para la determinación de las distintas especies mediante el sistema de

membrana líquida de volumen y el método de referencia. Otra parte se acidificó con 6 ml de ácido nítrico concentrado por litro de muestra para el análisis de la concentración de níquel total con el método de referencia. Por otro lado las muestras tomadas en la cuenca del río Guadalquivir fueron filtradas in situ utilizando cartuchos de filtración de nylon con tamaño de poro de 0,45 μm . Posteriormente, estas muestras se acidificaron de igual modo que las muestras anteriores (6 ml de ácido nítrico por litro de muestra).

En la tabla 1 se recogen los parámetros físico-químicos analizados en cada una de las muestras tomadas.

Muestra	Salinidad, $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	pH	COD, $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
1	32,7	8,06	3,11
2	28,9	7,68	3,37
3	1,0	7,58	7,04
4	0,4	7,60	1,93
5	0,6	7,41	3,77
6	0,7	7,87	3,14
7	0,6	7,38	4,22
8	0,8	7,25	2,57
9	31,5	8,29	4,64
10	0,4	7,10	4,15

Tabla 1. Parámetros físico-químicos determinados en las muestras.

A.7. METODOLOGÍAS DE REFERENCIA

Análisis de la concentración total

Una porción de un litro de muestra filtrada se acidificó con ácido nítrico suprapur, añadiendo 6 ml de ácido por cada litro de muestra, y se guardó en botes de polietileno de baja densidad en el frigorífico hasta su posterior análisis.

La determinación de la concentración de níquel se realizó a través de una preconcentración previa en una sala blanca con APDC/DDDC y posterior determinación por ICP-MS.

El protocolo seguido para la extracción y preconcentración de los metales presentes en las muestras fue el que se describe a continuación:

1. Se pesan unos 100 ml de muestra en un embudo de teflón
2. Se añaden 1-2 ml de acetato amónico hasta obtener un pH de 4-4,5.
3. Se adiciona 1 ml de la disolución de APDC/DDDC al 1% y 8 ml de cloroformo agitando las dos fases durante 2 minutos y dejándolas separar durante 5 minutos.
4. Se trasvasa la fase orgánica inferior a un bote de polietileno de baja densidad previamente tarado.
5. Se añade 6 ml de cloroformo al embudo de decantación y se extrae de igual modo que en el paso 3, recogiendo la fase orgánica en el mismo bote del paso 4.
6. Se vierte 0,1 ml de ácido nítrico concentrado a la fase orgánica anteriormente recogida y se dejan en la campana de extracción hasta que se evapore todo el cloroformo.
7. El residuo se disuelve con 5 ml de ácido nítrico 1 M y se pesa para poder calcular los factores de preconcentración conseguidos durante el proceso de extracción.

8. Los botes se guardan en el frigorífico hasta su posterior análisis por ICP-MS.

Todo el material utilizado fue limpiado bajo condiciones de extrema limpieza en campana de flujo laminar, utilizando un protocolo de limpieza de material de plástico que se detalla en el Anexo A.10.

Análisis de la fracción lábil

La determinación del contenido de la fracción lábil de níquel presente en la muestra se realizó por un análisis de Voltametría de Redisolución Catódica Adsorptiva (AdCSV) con gota de mercurio colgante (HMDE), sin realizar una previa digestión ultravioleta a la muestra, según el método de Metrohm V-69.

El procedimiento seguido para el análisis de la fracción lábil de níquel con esta técnica es el que se detalla a continuación:

1. Se toman 10 ml de muestra en la celda del equipo de voltametría, sin realizarle ningún tipo de pretratamiento.
2. Se añaden 0,5 ml de tampón amoniaco/cloruro amónico (0,1 M/0,2 M) y 0,1 ml de una disolución etanólica de DMG (0,05 M).
3. Se coloca la celda en el equipo de voltamperometría, se pone en agitación la muestra y se realiza la deposición en la gota de mercurio a -0,7 V.
4. Posteriormente para producir la reducción del metal, se realiza el barrido de potencial desde -0,8 a 1,3 V, de este modo se redisuelve el níquel depositado en la gota en el seno de la disolución para detectar la corriente que se registra como intensidad de corriente.
5. La determinación de la concentración de la fracción lábil de la muestra se realiza a través de una calibración por adiciones externas, añadiendo cada vez un volumen de 50 μl de una disolución de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de níquel.

A.8. TEST ESTADÍSTICOS UTILIZADOS PARA TRATAR LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Para realizar la validación de los resultados obtenidos con la metodología estudiada se realizó la comparación de los mismos con los obtenidos con la metodología de referencia correspondiente a través del test de comparación de dos medias experimentales [1]. Para compararlos con el valor teórico obtenido con el programa WinHumic V se utilizó el test t de comparación de una media experimental con un valor conocido. Ambos test se exponen a continuación junto con el test F de comparación de varianzas.

Contraste F para la comparación de desviaciones estándar

Este test se ha utilizado para la comparación de desviaciones estándar de dos métodos. La hipótesis nula tomada como referencia en este test se define como $H_0: s_1^2 = s_2^2$, mientras que la hipótesis alternativa será $H_1: s_1^2 \neq s_2^2$, tomando un nivel de significación de 0,05, es decir, la hipótesis nula se rechaza (y se aceptaría la alternativa) cuando la probabilidad de que la diferencia observada ocurra por azar sea menor del 5%. El estadístico F se calcula con la ecuación 1.

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (1)$$

Donde los valores de 1 y 2 se disponen para que el valor del estadístico F sea siempre mayor o igual que 1. Se aceptaría la hipótesis nula si el valor de F es menor a su valor crítico (F_c) para n_1-1 y n_2-1 grados de libertad y un nivel de significación seleccionado de 0,05.

¹. Miller J.N., Miller J.C., *Estadística y quimiometría para química analítica*, Pearson Education S.A. Madrid, 2002.

Comparación de dos medias experimentales

Otro test utilizado fue el que realiza el contraste de significación de los resultados obtenidos con los sistemas desarrollados en esta tesis con los obtenidos con otro método experimental que tomamos como referencia. En este caso vamos a tener dos medias muestrales \bar{x}_1 y \bar{x}_2 , siendo la primera la obtenida utilizando la metodología propuesta y la segunda la obtenida a partir del método de referencia en cada caso. La hipótesis nula se plantea como que no existen diferencias significativas entre las dos medias ($H_0: \bar{x}_1 = \bar{x}_2$) y la hipótesis alternativa que sí existan diferencias ($H_1: \bar{x}_1 \neq \bar{x}_2$). Para este test se ha elegido el mismo nivel de significación que en el test anterior, $\alpha = 0,05$. Para realizar este test de significación tenemos primero que tener en cuenta si las desviaciones estándar muestrales de ambos métodos son significativamente diferentes. Para ello debemos aplicar el test anterior F de comparación de desviaciones estándar.

Si las desviaciones estándar de ambos métodos son iguales

Si no hay diferencias se calcula una estimación conjunta de la desviación estándar, s , utilizando las desviaciones estándar individuales s_1 y s_2 con la ecuación 2.

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)} \quad (2)$$

Siendo n_1 y n_2 los tamaños muestrales del método estudiado en esta tesis y del de referencia, respectivamente. El valor del estadístico t se calcula a través de la ecuación 3.

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad (3)$$

Si el valor absoluto de t para $(n_1 + n_2 - 2)$ grados de libertad y un nivel de significación de 0,05 es mayor que su valor crítico (t_c) se rechazará la hipótesis nula.

Si las desviaciones estándar de ambos métodos no son iguales

Cuando las desviaciones estándar no son iguales, el valor del estadístico t se calcula con la ecuación 4.

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad (4)$$

donde los grados de libertad se calculan con la ecuación 5, redondeando el resultado obtenido al número entero más cercano.

$$g.l. = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\left(\frac{s_1^4}{n_1^2(n_1-1)} + \frac{s_2^4}{n_2^2(n_2-1)}\right)} \quad (5)$$

Si el valor absoluto de t es mayor que su valor crítico (t_c) para los grados de libertad calculados con la ecuación 6 y un nivel de significación de 0,05 se rechazará la hipótesis nula.

Comparación de una media experimental con un valor conocido

El segundo test t utilizado fue el que realiza la comparación entre una media experimental, \bar{x} , en este caso la obtenida con los sistemas de extracción estudiados,

con un valor conocido o verdadero μ , que en este caso es el valor teórico obtenido con el programa WinHumic V.

Este test plantea como hipótesis nula que no hay diferencias significativas entre el valor observado y el conocido ($H_0: \bar{x} = \mu$) y la alternativa que sí existen esas diferencias ($H_1: \bar{x} \neq \mu$).

Al igual que en el test anterior, la hipótesis nula es rechazada cuando la probabilidad de que dicha diferencia observada ocurra por azar es menor del 5%, es decir, la diferencia entre el valor observado y el conocido es significativa al nivel 0,05. Para ello, se calcula un estadístico denominado t cuya fórmula es la que aparece en la ecuación 7.

$$t = (\bar{x} - \mu) \frac{\sqrt{n}}{s} \quad (7)$$

Donde \bar{x} es la media muestral, s la desviación estándar muestral y n el tamaño muestral.

Si el valor absoluto de t es mayor que su valor crítico (t_c) para n-1 grados de libertad y un nivel de significación de 0,05 se rechazará la hipótesis nula.

A.9. LIMPIEZA DE DISOLUCIONES

Disolución orgánica utilizada como membrana líquida

Con el objetivo de eliminar la contaminación procedente de los reactivos utilizados en la disolución orgánica se decidió limpiarla una vez preparada, utilizando para ello porciones de disolución receptora (ácido clorhídrico). Este proceso se llevó a cabo en una sala blanca equipada con una campana de flujo laminar con filtro HEPA (clase 100).

1. Se realizan tres extracciones consecutivas de 100 ml de disolución orgánica preparada en las concentraciones optimizadas con porciones de 15 ml de ácido clorhídrico de alta pureza (calidad suprapur) preparado con la misma concentración que se utiliza en los experimentos realizados con las membranas líquidas en un embudo de teflón limpio para de este modo extraer las posibles impurezas metálicas presentes en la disolución orgánica.
2. Una vez se terminó el proceso de limpieza de la disolución, ésta es almacenada en un recipiente de teflón limpio.

Disolución tampón acético/acetato

1. Se prepara una disolución concentrada del tampón (ácido acético 5 M y 2,45 M de hidróxido sódico) en 100 mililitros (pH = 4,76).
2. Esta disolución se vierte en un embudo de decantación de teflón limpio y se añade un mililitro de una disolución de APDC/DDDC junto con 8 mililitros de cloroformo. Estas disoluciones fueron anteriormente preparadas como aparece en el anexo A.1.
3. La extracción se realiza agitando las dos fases durante 2 minutos y dejándolas reposar durante 5 minutos.

4. Posteriormente se repite la extracción dos veces más con 6 ml de cloroformo.
3. Después se añade otro mililitro de la disolución de APDC/DDDC y se realiza de nuevo la extracción anteriormente explicada.
4. Por último, al igual que con la disolución anterior, esta disolución se recoge en un bote de polietileno de baja densidad para su posterior uso.

A.10. PROTOSCOLOS DE LIMPIEZA DEL MATERIAL UTILIZADO

Botes de polietileno de baja densidad y material de plástico (puntas de pipetas, Eppendorfs,...)

Este material será utilizado para llevar a cabo los análisis tanto de los contenidos totales como de las diferentes fracciones de níquel en aguas reales con membranas de volumen y metodologías de referencia. Ya que estos contenidos son del orden de los microgramos por litro el proceso de limpieza se debe realizar con especial cuidado.

1. En primer lugar, el material se enjuaga con agua milli-Q varias veces, y se introducen en un baño de ácido clorhídrico 3 M.
2. Tras unos cuatro o cinco días se sacan de este baño y se enjuagan con agua milli-Q varias veces en el interior de una campana de flujo laminar.
3. Una vez enjuagado todo el material, se introduce en otro baño de ácido nítrico 3M, no más de cuatro días.
4. Se vuelven a enjuagar varias veces con agua milli-Q dentro de una campana de flujo laminar y se dejan secar en su interior.
5. Una vez seco todo el material se introduce en bolsas de plástico herméticas hasta su uso.

Material de teflón (embudos de decantación, botes,...)

El uso del material de teflón para realizar la separación y preconcentración de las muestras reales analizadas con la metodología de referencia para la determinación de los contenidos totales de metales en las mismas se debe a que presenta alta resistencia a los ácidos y baja capacidad de adsorción. Dentro de este tipo de material se encuentran los embudos de separación y las botellas destinadas a almacenar los reactivos y disoluciones utilizadas en la preconcentración.

Embudos de separación

1. Añadir unos mililitros de cloroformo y agua en el interior de cada embudo asegurándose que no existen pérdidas por ninguna de las uniones.
2. Se enjuagan los embudos con agua milli-Q y se desmontan manteniendo las piezas pequeñas en el interior del cuerpo del embudo.
3. En primer lugar se mantiene el material en el interior de una baño de agua milli-Q caliente durante 24 horas.
4. Al día siguiente se saca del baño y se enjuaga cinco veces con agua milli-Q.
5. Una vez todo el material ha sido enjuagado se deposita en el interior de un baño de nítrico 7,5 M calentando durante otras 24 horas.
6. Al día siguiente se saca el material y se enjuaga con agua milli-Q.
7. Se introduce en un baño de agua regia introduciéndolo lentamente para no sufrir salpicaduras por ebullición del agua regia en este proceso. El material se deja sumergido en este baño durante una semana.
8. Posteriormente se enjuaga de nuevo con agua milli-Q en el interior de la campana de flujo laminar.
9. Finalmente, una vez montados los embudos, se llenan de ácido nítrico 0,5 M hasta que se requiera su uso guardados en bolsas de plástico herméticas.

Otro material de teflón

Un procedimiento análogo es empleado para la limpieza de otros recipientes de teflón. Todo el material es almacenado individualmente en el interior de bolsas de plástico con cierre hermético.

Celdas de membranas líquidas de volumen

Las celdas utilizadas para llevar a cabo los experimentos de separación y preconcentración de níquel con muestras reales se limpiaron a través del protocolo que sigue a continuación:

1. Primero se enjuagan varias veces con agua milli-Q para eliminar las impurezas que puedan contener.
2. Se sumergen en un baño con ácido nítrico 3 N, calentándolo durante unas dos horas.
3. Después de este tiempo se dejan las celdas sumergidas en este baño a temperatura ambiente durante 12 horas.
4. Posteriormente se sacan del baño ácido y se enjuagan varias veces con agua milli-Q.
5. Finalmente, se llenan con ácido nítrico 2 M y se guardan en bolsas de plástico herméticas hasta su utilización.

A.11. DATOS DE ESPECIACIÓN TEÓRICOS CALCULADOS CON EL PROGRAMA WINHUMIC V PARA LAS MUESTRAS REALES ANALIZADAS

[AH]	[NiAH] $\cdot 10^6$		[Ni(OH) $_2$] $\cdot 10^9$		[Ni $^{2+}$] $\cdot 10^5$		[NiCl $^+$] $\cdot 10^6$		[NiOH $^+$] $\cdot 10^8$	
mg $\cdot l^{-1}$	M	%	M	%	M	%	M	%	M	%
0	0	0,0	1,45	0,0	1,26	74,1	4,34	25,5	3,40	0,2
15	1,08	6,3	1,33	0,0	1,17	68,7	4,03	23,7	3,13	0,2
30	2,04	12,0	1,23	0,0	1,09	64,0	3,75	22,1	2,90	0,2
50	3,16	18,6	1,12	0,0	1,00	58,5	3,43	20,2	2,63	0,2
75	4,35	25,6	1,00	0,0	0,90	52,7	3,09	18,2	2,35	0,1
100	5,35	31,4	0,90	0,0	0,81	47,8	2,80	16,5	2,13	0,1

Tabla 1. Especiación de níquel para distintas concentraciones de ácidos húmicos en muestras sintéticas.

[AH]	[NiAH] $\cdot 10^8$		[Ni(OH) $_2$] $\cdot 10^{11}$		[Ni $^{2+}$] $\cdot 10^8$		[NiCl $^+$] $\cdot 10^8$		[NiOH $^+$] $\cdot 10^{10}$	
mg $\cdot l^{-1}$	M	%	M	%	M	%	M	%	M	%
0	0	0,0	2,47	0,0	6,34	74,4	2,13	25,0	4,46	0,5
13,35	1,18	13,9	2,13	0,0	5,46	64,1	1,84	21,6	3,84	0,5
28,00	2,16	25,3	1,66	0,0	4,74	55,6	1,59	18,7	3,33	0,4
39,97	2,78	32,6	1,66	0,0	4,27	50,1	1,44	16,9	3,00	0,4

Tabla 2. Especiación de níquel para distintas concentraciones de ácidos húmicos añadidas a la muestra real 1.

Muestra	$[\text{NiAH}] \cdot 10^9$		$[\text{Ni}(\text{OH})_2] \cdot 10^{13}$		$[\text{Ni}^{2+}] \cdot 10^9$		$[\text{NiCl}^+] \cdot 10^9$		$[\text{NiOH}^+] \cdot 10^{11}$	
	M	%	M	%	M	%	M	%	M	%
1	1,49	12,0	2,74	0,0	8,28	67,0	2,65	21,5	5,36	0,4
2	2,12	8,9	1,00	0,0	16,7	70,2	4,88	20,5	4,58	0,2
3	0,34	94,3	0,06	0,0	0,74	2,0	0,02	0,0	0,27	0,0

Tabla 3. Especiación de níquel para las muestras reales 1, 2 y 3, utilizando la concentración de níquel total medida con la técnica MLV.

Muestra	$[\text{NiAH}] \cdot 10^9$		$[\text{Ni}(\text{OH})_2] \cdot 10^{13}$		$[\text{Ni}^{2+}] \cdot 10^9$		$[\text{NiCl}^+] \cdot 10^9$		$[\text{NiOH}^+] \cdot 10^{11}$	
	M	%	M	%	M	%	M	%	M	%
1	1,58	12,0	2,87	0,0	8,68	66,1	2,78	21,2	5,62	0,4
2	2,23	8,9	1,05	0,0	17,6	70,2	5,15	20,6	4,83	0,2
3	0,35	97,8	0,07	0,0	0,78	2,2	0,02	0,1	0,28	0,0

Tabla 4. Especiación de níquel para las muestras reales 1, 2 y 3, utilizando la concentración de níquel total medida con la técnica HF-LPME.



Celdas de membrana líquida de volumen utilizadas. (izquierda) celda de vidrio, (derecha) celda de teflón.



Celdas de microextracción en fase líquida utilizadas. (izquierda) unidad contenidos totales de níquel, (derecha) unidad especiación de níquel

