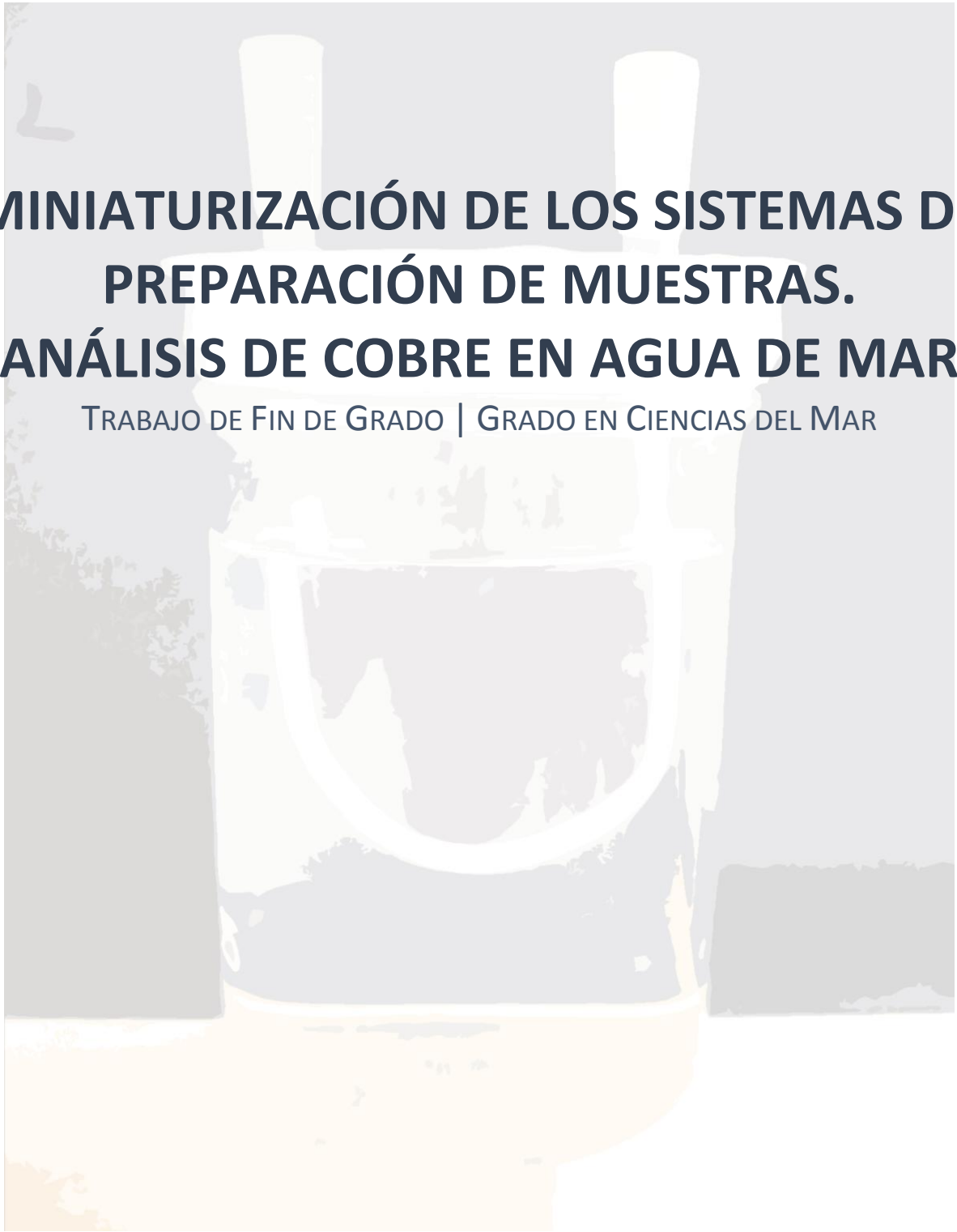




7 DE JULIO DE 2015

A large, semi-transparent background image of a laboratory flask containing an orange liquid. The flask is positioned centrally and is the focal point of the cover page.

MINIATURIZACIÓN DE LOS SISTEMAS DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS. ANÁLISIS DE COBRE EN AGUA DE MAR

TRABAJO DE FIN DE GRADO | GRADO EN CIENCIAS DEL MAR

MANUEL ALEJANDRO VARELA PÉREZ

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR Y AMBIENTALES

Universidad de Cádiz

El presente trabajo ha sido realizado en los laboratorios del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz, bajo la dirección conjunta de los profesores D. Juan José Pinto Ganformina y Dña. Carolina Mendiguchía Martínez, reuniendo las condiciones exigidas para optar a la defensa y evaluación del Trabajo de Fin de Grado para el título en Ciencias del Mar.

Puerto Real, a 7 de julio de 2015

Índice

Resumen	1
Abstract.....	2
1. Introducción	3
2. Objetivos	5
3. Antecedentes	6
3.1 Los metales traza en el medio marino.....	6
3.2 Métodos de análisis de cobre en agua de mar.....	7
3.3 Microextracción en fase líquida con capilares de fibra hueca	8
4. Material y métodos.....	10
4.1 Reactivos.....	10
4.2 Materiales.....	10
4.3 Limpieza del material	11
4.4 Desarrollo experimental.....	11
4.4.1 Ensayos preliminares	12
4.4.2 Sistema de microextracción.....	13
4.4.3 Funcionamiento del sistema	15
4.4.4 Determinación instrumental	18
5. Resultados y discusión	19
6. Conclusiones	25
7. Bibliografía.....	26

Resumen

Los metales pesados en el agua de mar se encuentran a niveles traza, es decir, en concentraciones del orden de los $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Algunos de ellos son oligoelementos, fundamentales para el desarrollo de las funciones vitales de muchos seres vivos a determinadas concentraciones, pero pueden llegar a ser tóxicos si éstas se superan. Entre ellos se encuentra el cobre, uno de los metales más importantes a nivel global por sus implicaciones industriales y en la bioquímica de los seres vivos.

Actualmente las técnicas analíticas para su determinación se enfrentan a dos problemas principales: requieren de una preconcentración del analito debido a la baja concentración en la que se encuentra en las muestras, y por otro lado la matriz en la que se encuentra disuelto (agua de mar) presenta numerosas interferencias. Tradicionalmente los métodos más empleados para el análisis de metales traza han sido la extracción líquido-líquido y la extracción en fase sólida, métodos que recurren al uso de disolventes orgánicos y reactivos que pueden provocar efectos nocivos para el medioambiente. Actualmente se tiende a la miniaturización de estos métodos enfocada a la minimización de las cantidades empleadas de dichos reactivos y la reducción de los residuos generados. Así la microextracción en fase líquida surge como una alternativa verde a los métodos tradicionales además de mejorar los factores de preconcentración.

En este trabajo se desarrolla un método de microextracción en fase líquida con capilares de fibra hueca (HF-LPME) para el análisis de cobre en agua de mar. La HF-LPME consiste en el transporte del analito desde la muestra hacia el interior de la fibra mediante la formación de un complejo con un agente extractante que se encuentra en la pared porosa de la misma. De esta manera se consigue la separación y preconcentración del analito y tras la recuperación del contenido del lumen podemos determinar su concentración a través de la espectroscopía de absorción atómica en horno de grafito (GFAAS).

El método se ha optimizado estudiando las principales variables que afectan al factor de enriquecimiento o de preconcentración. Estas variables han sido: selección del disolvente orgánico, selección de la disolución receptora, tiempo de impregnación de la fibra, concentración de agente quelatante, pH de la muestra, concentración de disolución receptora, tiempo de agitación, velocidad de agitación y efecto de la salinidad.

Abstract

The seawater composition is very heterogeneous due to the large quantity of compounds and elements that are included in it. An important group are the trace metals or heavy metals which are present at concentrations in the range of $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Some of them are oligoelements, and then necessary for the development of vital functions of organisms at certain concentrations, but they can be toxic if these are overtaken. One of them is copper, a useful metal at global level by its applications at industry because of its good electricity or heat conductive, and it is very important in the biochemistry of organisms.

Nowadays the analytical techniques for trace metals analysis face with two main problems: is required a preconcentration of analyte due to its low concentration, and the interferences from the matrix in which it is dissolved (seawater). Traditionally the most useful methods for the analysis of trace metals have been the liquid-liquid extraction and the solid phase extraction, methods that tend to the use of organic solvents and reagents which could cause adverse effects for the environment.

At present the tendency is towards the miniaturization of these methods in order to minimize the volumes of these reagents and to reduce the wastes generated. This way liquid phase microextraction rises up like a green alternative to the traditional methods in addition to improve the preconcentration factors.

In this work, it has been developed a hollow fiber liquid phase microextraction method (HF-LPME) for the copper analysis in seawater. HF-LPME consists in the transport of the analyte from the sample to the inside of the fiber through the formation of a complex with an extractant agent which is located in the porous wall of it. In this way the separation and preconcentration of the analyte is achieved, and after the recovery of the content of the lumen we can get its concentration through the measurement by graphite furnace atomic absorption spectroscopy (GFAAS).

The method has been carried out by studying the main variables affecting the enrichment or preconcentration factor. These variables were: selection of the organic solvent, selection of acceptor solution, time of impregnation of the fiber, chelating agent concentration, sample pH, acceptor solution concentration, stirring time, stirring rate and effect of the salinity.

1. Introducción

La mayor parte de nuestro planeta está cubierta por agua de mar en cuya composición se encuentran muchos de los elementos químicos que se conocen. Un grupo de estos últimos, los denominados metales traza, constituyen uno de los grupos que desde el punto de vista de la oceanografía química es de interés de estudio. Esto es debido a que la mayoría son muy persistentes y resultan nocivos para los seres vivos. De todos ellos el metal escogido para este trabajo ha sido el cobre.

Cuando se realiza un análisis de metales en agua de mar la baja concentración en la que estos se encuentran y la complejidad de su matriz son las principales limitaciones o problemas que debemos solventar para el correcto desarrollo del método. Tradicionalmente las técnicas empleadas para los análisis de metales han sido las extracciones líquido-líquido, el intercambio iónico, o extracciones en fase sólida. De todas ellas la técnica más efectiva y utilizada para este tipo de análisis es la extracción líquido-líquido.

Esta se basa en la afinidad del analito por una disolución u otra, por lo que dichas disoluciones deben de ser inmiscibles (generalmente se utilizan fases acuosas y orgánicas). La técnica consta de dos fases o etapas principales: la extracción del metal desde la muestra hacia la fase orgánica; y una re-extracción en la que el analito pasa nuevamente a una disolución acuosa para su posterior determinación instrumental. Con el tiempo se han desarrollado nuevas alternativas para mejora y/o simplificación de esta técnica y así surgieron las membranas líquidas. Como su propio nombre indica se tratan de membranas o barreras semipermeables constituidas por una disolución orgánica, y que se sitúa entre dos disoluciones acuosas. Con esto se consigue la realización al mismo tiempo de las etapas de extracción y re-extracción.

Las membranas pueden ser de tres tipos: de volumen, de emulsión o soportadas. Dentro de este último grupo se encuentra el método utilizado para este trabajo: la microextracción en fase líquida con capilares de fibra hueca (HF-LPME). Este consiste en la separación entre la muestra y la disolución receptora mediante una fibra porosa, en cuyos poros se alojará la disolución orgánica. Entre las ventajas que este método aporta está la preconcentración del metal al re-extraerse en un volumen reducido, y la minimización de los volúmenes de disolución empleados al tratarse de una miniaturización.

En este trabajo se desarrolla un método de análisis de cobre en agua de mar mediante la utilización de la HF-LMPE. Se ha optimizado a partir de la realización de ensayos preliminares y el estudio de las condiciones químicas e hidrodinámicas que afectan al factor de enriquecimiento, con el fin de que el valor de este sea máximo.

2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo es desarrollar un método de análisis de cobre en agua de mar basado en la microextracción en fase líquida con capilares de fibra hueca. Para ello se establecieron los siguientes objetivos parciales:

- Establecer las condiciones iniciales a partir de las cuáles se comience el desarrollo del método.
- Estudiar las condiciones químicas que afectan al factor de enriquecimiento.
- Seleccionar las condiciones hidrodinámicas más favorables para mejorar la preconcentración de cobre.

3. Antecedentes

3.1 Los metales traza en el medio marino

Las tres cuartas partes de la superficie de nuestro planeta están cubiertas por los océanos, es decir, por agua de mar. En ella se encuentra una gran variedad de sustancias y elementos químicos en distinta fase: sólida, disuelta, formando coloides o aerosoles. En estudios de composición del agua de mar se han conseguido identificar casi todos los elementos químicos de la tabla periódica. Bruland clasifica los elementos en tres grupos según su concentración: mayoritarios, minoritarios y trazas [1].

Los elementos mayoritarios son aquellos que se encuentran a concentraciones comprendidas entre 0,05-750 mM. Este grupo está compuesto por 14 elementos (O, H, Cl, Na, Mg, S, Ca, K, Br, C, Sr, B, Si y F) que son los que le confieren al agua de mar sus propiedades físico-químicas. El grupo de los elementos minoritarios está compuesto por aquellos que se encuentran a concentraciones comprendidas entre 50 y 0,05 μM , siendo un grupo muy heterogéneo. Los elementos traza son los que se encuentran a concentraciones inferiores a 50 nM. Dentro de esta última clasificación se incluyen los metales traza o pesados como Ni, Pb, Co, Cu, Cr, Zn, etc.

A las concentraciones naturales hay que añadirles las resultantes de las actividades industriales, agrícolas, mineras y urbanas que pueden llegar a causar efectos adversos sobre los ecosistemas o la salud humana. Debido a esto es importante conocer las concentraciones de estos elementos en el medioambiente.

De todos ellos el metal escogido para realizar el estudio es el Cu, reconocido como sustancia peligrosa según la Directiva 2008/105/CE y cuya especie más representativa en el medio marino es el catión bivalente Cu^{2+} [2]. Las principales fuentes de cobre en el agua de mar son [3]:

- ✚ Partículas en suspensión: son minerales resultantes de la erosión del suelo y de las rocas de la corteza terrestre que quedan suspendidos en el agua y acaban en el medio marino a través de los ríos.
- ✚ Cobre disuelto: procedente de la meteorización química de las rocas, en la que se dan fenómenos de extracción directa.
- ✚ Partículas biológicas: aquí se incluyen materia orgánica viva e inerte.

- ✚ Hidrotermalismo: cobre disuelto en los fluidos hidrotermales que circulan a través de la corteza oceánica en las zonas de actividad hidrotermal. Se incluyen la actividad volcánica y las chimeneas hidrotermales.
- ✚ Aporte directo desde el sedimento: directamente por la resuspensión del sedimento, o como producto de las reacciones que tienen lugar bajo las condiciones físico-químicas del sedimento.
- ✚ Cobre antropogénico: se incluye el cobre resultante de la actividad industrial y que se vierte a través de los emisarios de las estaciones depuradoras. También está recogido el cobre procedente de las pinturas anti-incrustantes o “*antifouling*” de las embarcaciones. Este cobre suele depositarse sobre el sedimento en forma particulada, parte de la cual se lixivia en forma disuelta.

La concentración media de Cu en el agua de mar oscila en torno a $0,15 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ [4]. Es uno de los metales más utilizado hoy en día por la mayoría de industrias por sus múltiples cualidades (resistente a la corrosión, excelente conductor termoeléctrico, maleable, dúctil...) [5]. También desempeña funciones vitales en los organismos marinos. La fotosíntesis, desnitrificación o incorporación de Fe por parte de algunas microalgas están facilitadas por compuestos enzimáticos que contienen cobre como la plastocianina o la multicobre oxidasa [6-8]. Estas características hacen que el comportamiento del cobre en el medio marino se asemeje a un nutriente (de hecho es considerado un micronutriente), afirmación que se ve reforzada si observamos sus perfiles verticales donde se producen un consumo superficial y una posterior regeneración profunda [9]. Otra particularidad que tiene el cobre así como la mayoría de metales traza es su toxicidad a baja concentración [10]. Suelen darse procesos de bioconcentración y biomagnificación pudiendo repercutir en la salud humana, causando trastornos como la enfermedad de Wilson [11].

3.2 Métodos de análisis de cobre en agua de mar

El análisis de metales traza en agua de mar está sujeto a dos principales limitaciones [12]:

- ✚ La baja concentración del analito en el medio. Como se ha comentado anteriormente, las concentraciones de metales traza en agua de mar son muy bajas y en la mayoría de situaciones no superan los límites de detección de los equipos de análisis. Por tanto, se requieren métodos y técnicas de preconcentración.

- ✚ La complejidad de la matriz en la que se encuentra. El método de análisis debe ser selectivo y capaz de aislar el analito de la multitud de compuestos que puedan interferir en el análisis.

Debido a ello, es necesario tener en consideración el empleo de materiales y procedimientos apropiados a la hora de la toma y procesado de las muestras (uso de materiales inertes, planificación de muestreos, protocolos de limpieza específicos, uso de instalaciones/laboratorios como salas blancas, etc.).

Son varios los métodos que se han implementado para solventar estas limitaciones como la extracción líquido-líquido con disolventes orgánicos [13, 14], co-precipitación con hidróxido de magnesio [15] o extracción en fase sólida utilizando resinas quelatantes [16 - 19]. De todos ellos, el más empleado ha sido la extracción líquido-líquido. Este consiste en conseguir la extracción de un analito desde una fase donadora a una receptora las cuales son inmiscibles entre sí. Se basa en la afinidad que el analito presenta por una disolución u otra. La optimización se dirige a conseguir que la extracción sea máxima estudiando la solubilidad del analito, empleando agentes quelatantes, modificando los volúmenes y otras variables experimentales. El inconveniente de estos métodos es el gasto de volumen que conlleva tanto de disolvente, muestra u otros reactivos. Para mejorar estos sistemas se desarrollaron los métodos de membrana líquida, en los que la extracción y re-extracción se dan en una sólo paso.

3.3 Microextracción en fase líquida con capilares de fibra hueca

La microextracción en fase líquida con capilares de fibra hueca (HF-LPME) se ha convertido en la “vía verde” para el análisis de metales traza en muestras medioambientales en general, ya que se requiere poco volumen tanto de disolventes como de muestra para su aplicación [20]. De modo esquemático el sistema cuenta con 3 elementos/disoluciones: la muestra/disolución cargada, los poros de la fibra/disolución orgánica, y el interior de la fibra/disolución receptora. La disolución cargada es de naturaleza acuosa y será la que contendrá el analito de interés. La disolución orgánica está formada por un compuesto orgánico quelatante y el disolvente, siendo la que constituye la membrana líquida de separación. Por último, la disolución receptora puede ser también una disolución acuosa, donde se produce la disociación del complejo orgánico formado con el analito y por tanto su liberación, o la propia disolución orgánica en el caso de que el analito fuera de naturaleza orgánica.

Este hecho hace que podamos encontrarnos con dos tipos de sistemas o configuraciones de HF-LPME: de dos y tres fases [21]. En el primero la disolución orgánica se aloja tanto en los poros como en el interior de la fibra y está enfocado para el análisis de compuestos orgánicos. En el segundo (ver figura 1), la disolución orgánica se ubica en los poros mientras que el interior se rellena con la disolución receptora acuosa, siendo esta configuración la más utilizada para el análisis de metales traza.

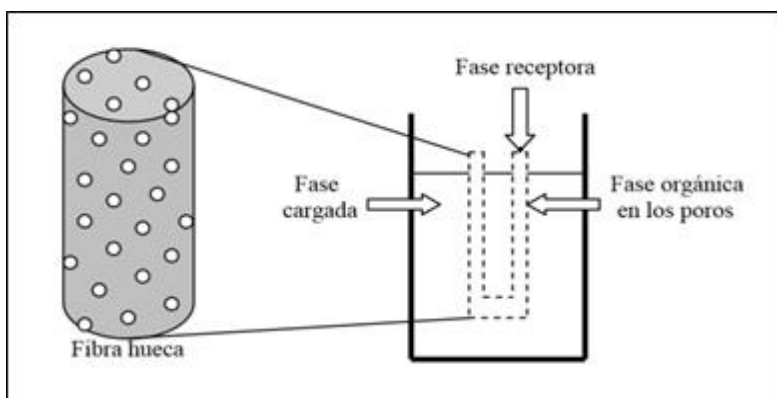


Figura 1. Esquema de un sistema de microextracción con capilar de fibra hueca.

Para este trabajo se ha desarrollado un método de HF-LPME de tres fases empleando como agente quelatante la di-2-piridilcetona bezoílhidrazona (DPKBH). Este compuesto realiza un mecanismo de contra-transporte acoplado (ver figura 2). Esta modalidad de transporte está basada en un mecanismo de transporte asistido en el que el paso del cobre de la muestra a la disolución receptora se ve favorecido por un contra-transporte en sentido contrario de protones.

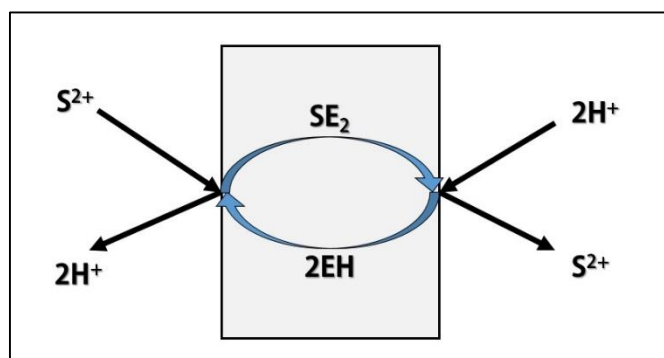


Figura 2. Esquema del proceso de contra-transporte acoplado. (S= soluto, E= extractante, H= protón).

El dPKBH forma el complejo con el cobre en la interfase orgánica-cargada y lo transporta hacia la orgánica-receptora donde se disocia. Gracias a este contra-transporte de protones el dPKBH se regenera y vuelve a la interfase orgánica-cargada para volver a transportar cobre.

Esta técnica permite por tanto:

1. la extracción de cobre de la matriz
2. al reducir el volumen de disolvente, ante la misma cantidad de soluto estamos preconcentrando la muestra.

Para que la técnica sea eficaz será necesario el estudio de las variables químicas e hidrodinámicas que influyen en el sistema y que se detallan en el apartado desarrollo experimental.

4. Material y métodos

4.1 Reactivos

Ácido nítrico 68%, ácido clorhídrico 37% y etanol 96% para análisis de Panreac (Barcelona, España). 1-Octanol 99% para análisis de Sigma-Aldrich (Madrid, España). Disolución estándar de $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ cobre de Merck (Madrid, España).

Benzoílhídrica 98% de Ega-Chemie (Steinheim/Albuch, Alemania), di(2-piridilcetona) 99% de Sigma Aldrich (Madrid, España). Cloruro de sodio 99% para análisis de Cosela (Sevilla, España). Hidróxido de sodio en lentejas para análisis de Scharlau (Sentmenat, España). Ácido (4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il-etanosulfónico) (HEPES) para análisis de VWR (Barcelona, España).

4.2 Materiales

Las fibras utilizadas fueron las Accurel PP S6/2 adquiridas de Membrana (Wuppertal, Alemania) cuyo espesor de pared es de $450 \pm 50 \text{ }\mu\text{m}$ y su diámetro interno $1800 \pm 150 \text{ }\mu\text{m}$. Su porosidad es de un 72% con un tamaño de poro de $0,2 \text{ }\mu\text{m}$.

Para la preparación de disoluciones se empleó material de vidrio diverso (matraces, vasos de precipitado, pipetas, etc.) así como material de polietileno (pinzas, micropipetas, cubetas, etc.).

Las medidas de pH se realizaron empleando un pHmetro Basic 20+ de Crison (Barcelona, España).

Para pesar los reactivos se utilizó una balanza CP324S de Sartorius (Goettingen, Alemania) mientras que las muestras se agitaron con agitadores Agimatic-S de J.P. Selecta S.L. (Barcelona, España) y Reax 2 de Heidolph (Schwabach, Alemania).

Para rellenar el lumen de las fibras se utilizó una bomba peristáltica Perimax 12 de Espetec (Erding, Alemania).

Una vez concluidos los experimentos, para cuantificar el contenido de cobre se empleó un espectrofotómetro de absorción atómica ContrAA 700 de Analytik Jena (Jena, Alemania).

4.3 Limpieza del material

Debido a los bajos niveles de concentración de cobre con los que se realizaron los experimentos, la limpieza del material es crucial para evitar problemas de contaminación. Por ello el material de uso diario (vasos de precipitado, matraces, tubos, pipetas, agitadores, tapas) se sometió a una limpieza diaria siguiendo el siguiente protocolo:

1. Enjuagado del material con abundante agua de grifo.
2. Fregado con jabón, seguidamente se elimina los restos con agua de grifo.
3. Enjuagado con agua Milli-Q (2 veces).
4. Adición de ácido nítrico de limpieza (2M).
5. Enjuagado con agua Milli-Q (mínimo de 5 veces).
6. Secado en campana.
7. Almacenamiento en bolsa de plástico y etiquetado.

Por otro lado, el material empleado para contener las disoluciones de analito a nivel de trazas, requirió un tratamiento de limpieza más exhaustivo, consistente en un baño con ácido clorhídrico 3M durante un mínimo de 4 días, seguido de otro baño en ácido nítrico 3M de 3 días mínimo de duración.

4.4 Desarrollo experimental

Para el desarrollo del método se partió de unos estudios previos en lo que se seleccionó una molécula orgánica que formara complejos estables con cobre [22]. Esta molécula fue la di-2-piridilcetona bezoilhidrazona (dPKBH) que al tratarse de un reactivo no

comercial, precisó de una síntesis previa para la cual se siguió el procedimiento descrito por García-Vargas y col. [23]:

“Se pesan cantidades equimolares de di-2-piridilcetona y benzoilhidracida en relación molar 1:2 y se disuelven en etanol. A continuación se mezclan ambas disoluciones en un matraz de fondo redondo, adicionando unas gotas de ácido clorhídrico concentrado, y se deja a reflujo durante una hora. Después de enfriar la disolución, se añade agua bidestilada hasta una relación en volumen 1:3 ($v_{org}:v_{ac}$) y unas gotas de una disolución 1N de hidróxido sódico, y se deja cristalizar en el frigorífico durante unas horas. Por último, se filtra la disolución y el precipitado obtenido se disuelve en etanol y posteriormente se precipita con agua bidestilada. El producto final se seca en estufa a una temperatura inferior a 50 °C durante unos minutos”

En la figura 3 se muestra la estructura propuesta para el complejo formado entre dPKBH y cobre en disolución acuoetanólica [22].

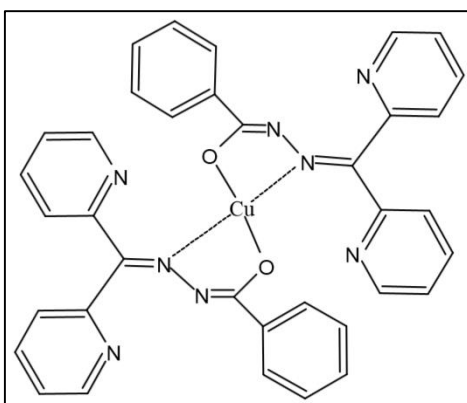


Figura 3. Estructura propuesta para el complejo Cu(II)-dPKBH.

4.4.1 Ensayos preliminares

Una vez sintetizado el reactivo orgánico se realizaron unos ensayos preliminares que consistieron en estudiar el efecto del pH de la muestra así como seleccionar el disolvente orgánico.

- ✚ **Selección del disolvente orgánico:** para conseguir la impregnación de la fibra con la disolución orgánica hay que seleccionar el disolvente más adecuado. Por un lado tiene que ser capaz de quedar retenido en los poros de la fibra y por otro tiene que poder disolver el dPKBH. Para ello se realizaron experimentos con tubos de ensayo que contenían 5 mL de una disolución acuosa (Milli-Q) con $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de cobre, y otra con el mismo volumen de disolvente orgánico. Se agitaron durante

30 minutos a velocidad 3 en un agitador a rotación Reax 2, hasta homogeneizar la mezcla y se dejaron en reposo hasta su separación. Seguidamente se determinó mediante espectroscopía de absorción atómica de llama la cantidad de cobre que quedaba en la fase acuosa y se calcularon los porcentajes de extracción. Como disolventes orgánicos se ensayaron dihexil-éter, hexilbenceno, octanol y tolueno.

- ✚ Efecto del pH de la muestra: puesto que ocurre un transporte de protones hacia la muestra, será necesario fijar el pH para mantener el gradiente muestra-lumen. Por otro lado, este estudio también nos sirve para confirmar los resultados del estudio de dPKBH [22]. De igual manera que el ensayo anterior, se realizaron extracciones líquido-líquido utilizando un mismo disolvente y variando el pH de la muestra de 5 a 9 utilizando para ello distintas cantidades/volúmenes de HEPES y NaOH 2M.

4.4.2 Sistema de microextracción

Una vez obtenidos los resultados de los ensayos preliminares se fijaron las condiciones iniciales para comenzar con el estudio de las fibras. Éstas fueron:

- ✚ Volumen de muestra: El volumen de muestra fue de 100 mL, ya que es el volumen soportado por los vasos de precipitado utilizados, mientras que la concentración de cobre fue de $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ preparada por dilución de un patrón comercial.
- ✚ Longitud de la fibra: La longitud de la fibra, en base a otros estudios de microextracción anteriores, se estableció en 8 cm [24, 25]. Entre los factores que afectan a esta elección están el diseño del montaje y la peor reproducibilidad de las medidas a una menor longitud.
- ✚ Velocidad de agitación: se estableció una velocidad de agitación de 300 r.p.m. al objeto de minimizar las posibles pérdidas de fase orgánica del interior de los poros de la fibra.

Para evaluar la idoneidad de las variables se utilizó el factor de enriquecimiento (F.E.) cuya expresión se indica en la ecuación 1. Como se puede observar consiste en la relación entre la concentración de cobre que se encuentra en el interior de la fibra tras concluir el experimento y la concentración inicial en la muestra.

$$F. E. = \frac{[Cu^{2+}]_{receptora}}{[Cu^{2+}]_{cargada}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Por tanto, una vez establecidas las condiciones iniciales así como los resultados de los ensayos preliminares se pasó a la realización de los ensayos previos y el estudio de la influencia de las variables químicas e hidrodinámicas.

✚ Ensayos previos

- Disolución receptora: para que se produzca el contratransporte de protones es necesario que exista un gradiente entre las disoluciones cargada-receptora, por tanto esta deberá ser ácida. Se realizaron pruebas de microextracción rellenando las fibras con disoluciones de ácido clorhídrico 1M y ácido nítrico 1M.
- Tiempo de impregnación: es el tiempo que permanece la fibra impregnada en la disolución orgánica. Este estudio se realizó simultáneamente con el anterior. Se establecieron tiempos de 1, 5 y 15 minutos de impregnación bajo las mismas condiciones.

✚ Influencia de las variables químicas e hidrodinámicas

- Concentración de dPKBH: dado que el volumen de la disolución orgánica empleado es mínimo, si se mantiene la relación molar será necesario aumentar la concentración de reactivo. Las concentraciones de dPKBH estudiadas fueron: 0,0005 M; 0,005 M; 0,01 M y 0,02 M. Se pesaron las cantidades necesarias en matraces de 10 mL y se enrasaron con el disolvente orgánico. Para la impregnación se utilizaron tubos de ensayo de vidrio con tapón a rosca
- Tiempo de agitación: una vez realizado el montaje del sistema se somete a un periodo de agitación en el que se producirá el movimiento de las partículas y favorecerá al transporte. Se realizaron estudios a periodos de 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 y 16 horas.

- Concentración de ácido: bajo el mismo razonamiento de la elección del ácido, la concentración de protones en la disolución receptora condiciona el transporte. Se estudiaron concentraciones de 0,1 M; 0,5 M, 1 M y 2 M.
- Efecto de la salinidad: en el agua de mar una de las principales variables junto al pH y la temperatura es la salinidad. Para ver su efecto se realizaron estudios a concentraciones de 5, 15 y 35 g·L⁻¹ de NaCl.

4.4.3 Funcionamiento del sistema

Para el desarrollo del método se utilizó un sistema de microextracción en fase líquida con capilares de fibra hueca, empleando un montaje en forma de “U” como se muestra en la figura 4. Este sistema permite el transporte del analito desde la disolución cargada (muestra) hacia la disolución receptora (el lumen de la fibra) mediante la acción transportadora del dPKBH, el cual se encuentra alojado en los poros de la fibra disuelto en la disolución orgánica.

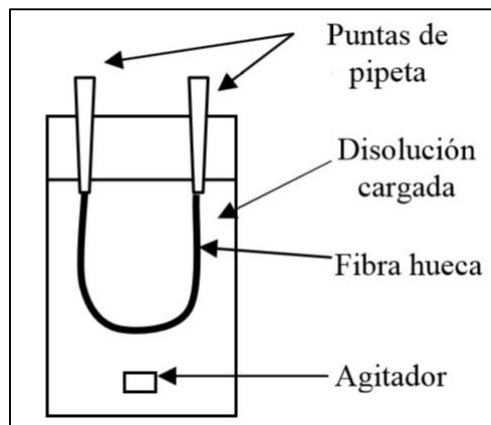


Figura 4. Esquema de un montaje de HF-LPME tipo "U".

Una vez preparadas las disoluciones necesarias se comenzó a montar el experimento. La mecánica básica se puede resumir en 6 etapas:

1. Corte de las fibras: Los segmentos de 8 cm de longitud fueron cortados sobre una base de papel filtrante desechable, utilizando una cuchilla de acero inoxidable como se observa en la imagen 1. Seguidamente se almacenaban en una bolsa hermética estéril para su conservación.



Imagen 1. Corte de la fibra

2. Impregnación de las fibras: Con ayuda de unas pinzas de polietileno se tomaron las fibras y se introdujeron en los tubos de vidrio que contenían la disolución orgánica como se muestra en la imagen 2. Se dejaron en impregnación el tiempo necesario dependiendo de los diversos experimentos.

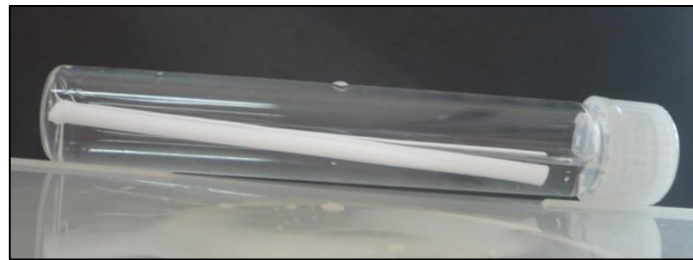


Imagen 2. Impregnación de la fibra en la disolución orgánica

3. Montaje de la tapa: en la tapa de un bote de polietileno de 100 mL se practicaron 6 orificios en los que se introdujeron 6 puntas de micropipeta, que servirán para conectar los tubos de la bomba peristáltica y la fibra ya impregnada (ver imagen 3). Con ayuda de las pinzas se conectaron las fibras en forma de “U”, y se introdujeron en un vaso con Milli-Q para que se limpiaran de los restos de disolución orgánica.



Imagen 1. Montaje de la tapa

4. Rellenado de las fibras: se conectaron los tubos de la bomba peristáltica a las puntas de micropipeta anteriormente mencionadas y se pasaba la disolución receptora a través de las fibras, dejando el lumen relleno tal y como se aprecia en la imagen 4.



Imagen 2. Relleno de las fibras

5. Agitación: una vez relleno el lumen de las fibras, éstas se introducían en las muestras, contenidas en vasos de 100 mL. Posteriormente el conjunto se agitaba durante el tiempo correspondiente (ver imagen 5).



Imagen 3. Agitación de la muestra

6. Extracción de la gota: una vez transcurrido el periodo de agitación, se descolgaron cuidadosamente las fibras de las tapas y se vertieron sus contenidos (gotas) en cubetas de polietileno tal y como se puede apreciar en la imagen 6. En este paso se anotaron los pesos de las gotas para estimar el volumen de las mismas.



Imagen 4. Extracción de las gotas

4.4.4 Determinación instrumental

La cuantificación de cobre se realizó mediante espectroscopía de absorción atómica. La absorción atómica consiste en medir la radiación electromagnética absorbida por un átomo cuando se produce el paso de un estado de energía a otro. Para que esto ocurra la muestra se atomiza utilizando una llama (FAAS) o un horno de grafito (GFAAS). El funcionamiento del equipo es el mismo en ambos casos. La muestra es introducida a través de un nebulizador en el caso de la llama, o inyectada en forma de gota en el horno y se atomiza calentándola a alta temperatura. Cuando el analito se encuentra formando una nube de átomos, una lámpara emite un haz de radiación con la longitud de onda específica para dicho analito. La radiación que no es absorbida pasa a través de un monocromador, el cual la difracta y dibuja el espectro de absorción en el receptor. Finalmente el software del equipo aplica una transformación logarítmica y proporciona una señal analítica (absorbancia).

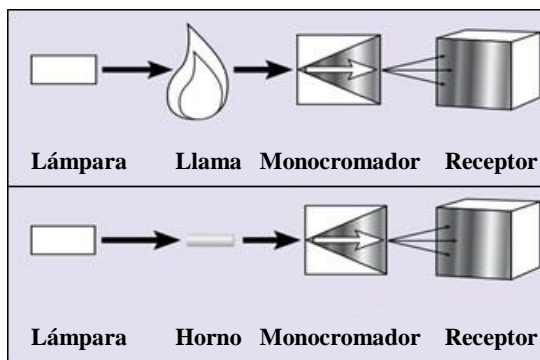


Figura 5. Esquema del funcionamiento del equipo de AAS con llama (arriba) u horno de grafito (abajo).

Haciendo una pequeña comparación la llama requiere volúmenes mayores de muestra y posee unos límites de detección menores que el horno de grafito.

El volumen de inyección se estableció en 20 μL , realizando las medidas por triplicado. Se utilizó la corrección de fondo de deuterio. El programa de temperaturas se recoge en la tabla 1.

Tabla 1. Programa del GFAAS utilizado en este trabajo

Etapa	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (s)	Rampa ($^{\circ}\text{C/s}$)	Espera (s)	Flujo Argón
Secado	80	28,3	6	20	Máximo
Secado	90	23,3	3	20	Máximo
Secado	110	14	5	10	Máximo
Pirólisis	350	24,8	50	20	Máximo
Pirólisis	900	11,8	300	10	Máximo
Adaptación del gas	900	5	0	5	0
Atomización	2000	4,7	1500	4	0
Limpieza	2450	4,9	500	4	Máximo

5. Resultados y discusión

A continuación se describirán los resultados obtenidos tras la realización de los diferentes experimentos.

Determinación instrumental

Las muestras fueron analizadas utilizando un equipo de absorción atómica equipado con una llama y un horno de grafito. Para poder transformar la señal analítica (absorbancia) en valores de concentración de cobre fue necesaria la construcción de una recta de calibrado, mediante el análisis de unas disoluciones con concentraciones conocidas.

La llama (FAAS) se utilizó para analizar las muestras en los ensayos preliminares. La recta de calibrado mostrada en el gráfico 1, se preparó de 0 a $0,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Cu^{2+} , con concentraciones de 0,05; 0,1; 0,15 y $0,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

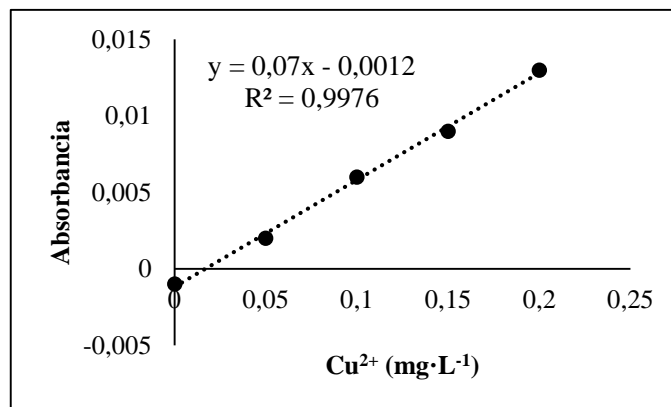


Gráfico 1. Recta de calibrado del FAAS

Para el resto de estudio se utilizó el horno de grafito (GFAAS) por lo que la recta de calibrado se construyó con concentraciones menores. En el gráfico 2 se observa una recta de calibrado de cobre para el GFAAS de 0 a 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Cu^{2+} con patrones de 5, 10, 15 y 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

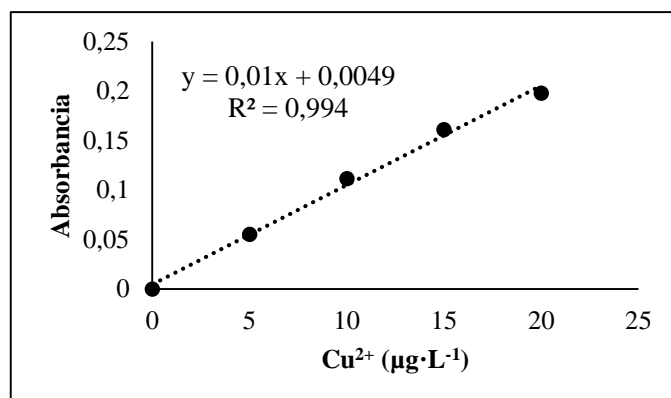


Gráfico 2. Recta de calibrado de GFAAS

Ensayos preliminares

Como ya se mencionó, la correcta selección del disolvente para estos sistemas es muy importante ya que por un lado debe ser capaz de impregnar la fibra, quedando retenido en los poros; y por otro, tiene que ser capaz de disolver el agente transportador (dPKBH). Para cada disolvente ensayado, se prepararon sus blancos correspondientes y se midieron las disoluciones acuosas resultantes tras cada extracción. Como se puede observar en el gráfico 3, empleando octanol como disolvente se obtuvieron los mejores resultados por lo que éste se seleccionó para realizar estudios posteriores.

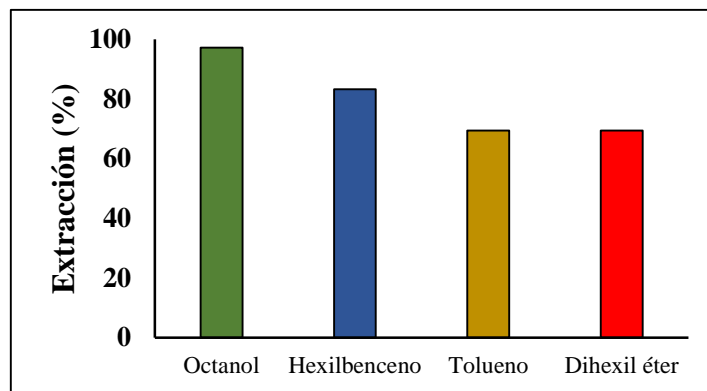


Gráfico 3. Selección de disolvente orgánico

Tras la confirmación del disolvente se procedió a estudiar la influencia del pH de la muestra. Esta variable no sólo influirá de manera directa en el contra-transporte acoplado sino que también afectará a la formación del complejo. A raíz de la observación de los resultados mostrados en el gráfico 4, se puede apreciar como el sistema experimenta un ligero aumento de los porcentajes de extracción a medida que el pH tiende a 8, sufriendo una disminución a pH más básicos.

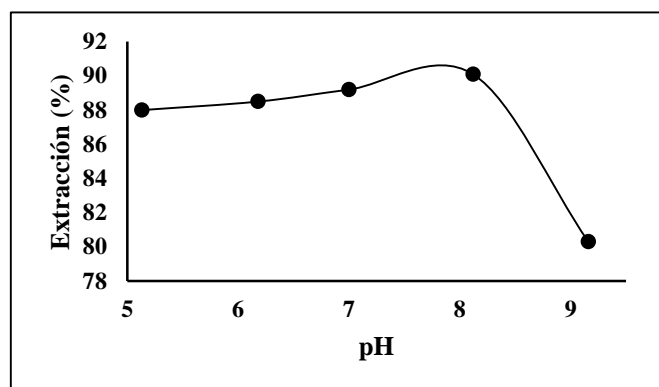


Gráfico 4. Efecto del pH de la muestra

Esta última puede atribuirse a la precipitación de cobre en forma de hidróxido a valores de pH básicos. Por otro lado, estos resultados coinciden con los previamente observados en el estudio de la formación del complejo Cu(II)-dPKBH [22], y en un estudio de microextracción de cobre con HF-LPME en octanol [26]. Por tanto, dado que el trabajo está enfocado a realizar el análisis de cobre en agua de mar, cuyo valor promedio de pH es 8 [1], se seleccionó este valor como más adecuado.

Sistema de microextracción

Los ensayos previos así como el estudio de la influencia de las variables químicas e hidrodinámicas fueron realizados partiendo de las condiciones iniciales expuestas

anteriormente e incluyendo en ellas el uso de octanol como disolvente y fijando el pH de la muestra en 8.

✚ Ensayos previos

Los ensayos previos fueron la selección de la disolución receptora y el tiempo de impregnación, los cuales fueron realizados simultáneamente. Como se expuso en un apartado anterior la disolución receptora debe ser de naturaleza ácida para que se produzca el transporte. De los resultados mostrados en el gráfico 5 se observa cómo, para las dos disoluciones ácidas ensayadas, el HNO₃ proporciona mejores factores de enriquecimiento, por lo que fue seleccionado como disolución receptora para los experimentos posteriores. Por otro lado, aumentando el tiempo de impregnación de las fibras se consigue un aumento del F.E. Como se puede observar en el mismo gráfico, la mejora no resulta significativa entre 5 y 15 minutos, por lo que se seleccionó tiempos más

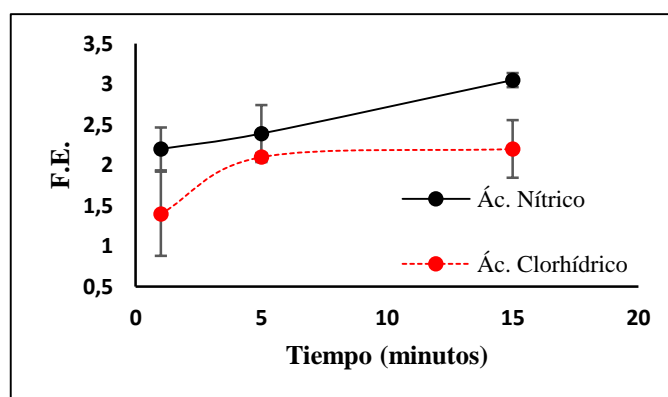


Gráfico 5. Selección de la disolución receptora y tiempo de impregnación

cortos.

✚ Influencia de las variables químicas e hidrodinámicas:

La primera de las variables químicas que se estudió fue la concentración de dPKBH. Como se expone anteriormente, al reducir el volumen de fase orgánica con la miniaturización, y manteniendo la relación molar se requiere el aumento de la concentración de dPKBH. De la observación del gráfico 6 se aprecia un comportamiento creciente hasta 0,01 M a partir del cual el factor de enriquecimiento disminuía. Este hecho también fue observado anteriormente en un estudio de preconcentración de plata utilizando TIBPS y se atribuyó a que una concentración demasiado alta puede ralentizar

el transporte del metal [27]. Por tanto, se seleccionó como óptima una concentración de 0,01 M, la cual fue utilizada para posteriores estudios.

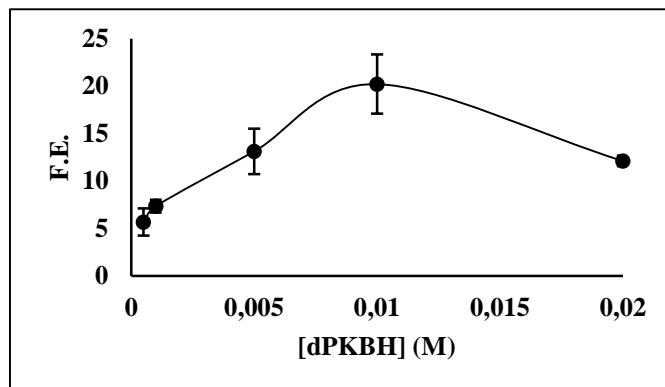


Gráfico 6. Selección de la concentración de dPKBH

La siguiente variable estudiada fue el tiempo de agitación. Esta variable de carácter hidrodinámico puede afectar a la membrana líquida si la agitación originada por el vórtice es demasiado alta. Los resultados muestran que el FE aumenta hasta las 3 horas a partir de las cuáles el aumento no se hace tan significativo (ver gráfico 7).

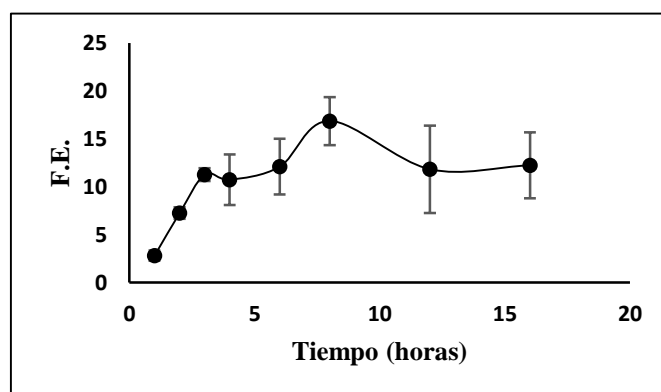


Gráfico 7. Efecto del tiempo de agitación

Esto se debe a que el sistema alcanza el equilibrio en el cuál el FE permanece aproximadamente constante.

Este comportamiento también fue observado por Li y Hu en un sistema de HF-LPME para especiación de vanadio [28]. A partir de las 3 horas también se puede observar que aumenta la irreproducibilidad de las medidas, posiblemente por la baja estabilidad de la fase orgánica en los poros de la fibra [29]. Teniendo todo esto en consideración el valor óptimo se estableció en 3 horas de agitación.

Partiendo de la selección de ácido nítrico como disolución receptora, el siguiente estudio fue ver la concentración más favorable de ácido para que el transporte sea máximo, permitiendo la formación del complejo así como el mantenimiento de la membrana líquida. Los resultados se recogen en el gráfico 8 donde se observa como el F.E. experimenta un máximo para una concentración 0,5 M de HNO_3 .

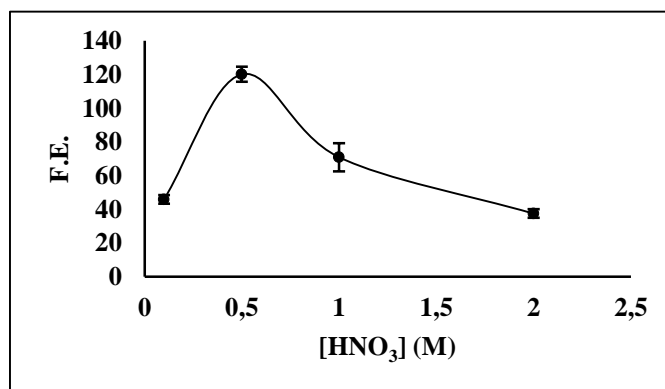


Gráfico 8. Efecto de la concentración de la disolución receptora

Este comportamiento también fue observado por Peng y col. [30] con un sistema de membrana para la determinación de cadmio y lo justifica como posibles pérdidas de reactivo extractante por la acidez de la disolución. Por tanto se seleccionó la concentración de 0,5 M de HNO_3 como más adecuada para el sistema.

Por último se estudió el efecto de la salinidad en el sistema de microextracción. Dado que el trabajo está enfocado a realizar análisis en agua de mar, esta variable es de vital importancia. Como se observa en el gráfico 9 el efecto de la salinidad sobre el sistema no es significativo ya que los valores de F.E. permanecen prácticamente inalterados.

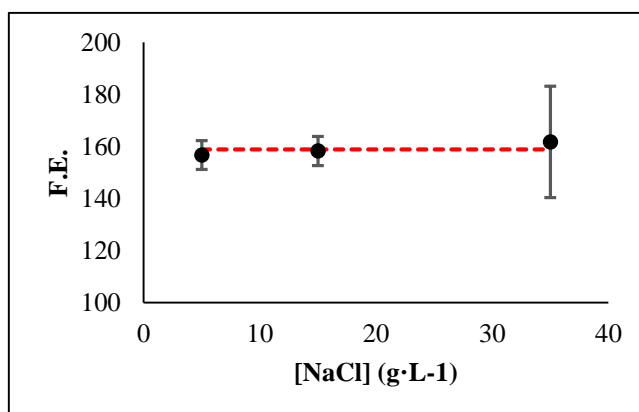


Gráfico 9. Efecto de los cloruros. (En rojo y discontinuo: valor medio de F.E.)

Este comportamiento también fue observado por Pinto en estudios similares de microextracción de cobre[22].

6. Conclusiones

A raíz de los resultados obtenidos, y dando por finalizado este trabajo, se puede concluir que el método basado en la microextracción en fase líquida con capilares de fibra hueca para el análisis de cobre en agua de mar desarrollado es efectivo, obteniéndose un factor de enriquecimiento promedio de $158,9 \pm 23$.

Se establecieron unas condiciones iniciales a partir de las cuales se llevarían a cabo los distintos estudios posteriores.

Se estudiaron las condiciones químicas que afectan al factor de enriquecimiento, así como las condiciones hidrodinámicas que mejoran la preconcentración a través de una serie de variables experimentales (selección de la disolución receptora, tiempo de impregnación de la fibra, concentración de agente quelatante, concentración de disolución receptora, tiempo de agitación y efecto de la salinidad), estableciéndose para cada una su valor óptimo.

No obstante, para completar este trabajo será necesario la realización de otros estudios tales como las interferencias de la matriz que dará paso a las aplicaciones del método a muestras de agua sintéticas y finalmente reales. Paralelamente será realizada una optimización uni/multivariante que incluirían los pertinentes tratamientos estadísticos que finalizaría con la validación del método.

7. Bibliografía

- [1] Bruland, K.W. (1983). Trace elements in sea water, Chapter 45, *Chemical Oceanography*, Vol. 8, 2nd ed., Riley, J.P., and Chester, R., Eds., Academic Press, New York, 157-220.
- [2] DIRECTIVA 2008/105/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 16 de diciembre de 2008 relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas, por la que se modifican y derogan ulteriormente las Directivas 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE y 86/280/CEE del Consejo, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE. ANEXO I, NORMAS DE CALIDAD AMBIENTAL PARA SUSTANCIAS PRIORITARIAS Y PARA OTROS CONTAMINANTES
- [3] Lewis, A. G. (1995). "Copper in Water and Aquatic Environments". International Copper Association, LTD. New York, NY, p. 65.
- [4] Eisler, R. (2000). Copper en Handbook of chemical risk assessment. Health hazards to humans, plants and animals. Cap. 3, Vol. 1. CRC Press, Boca Raton.
- [5] Copper Development Association Inc. (2015). Properties & Uses. New York: Copper Development Association. <http://www.copper.org/>
- [6] Peers, G., Price, N.M. (2006). Copper containing plastocyanin used for electron transport by an oceanic diatom. *Nature* 441(7091), p. 341–344.
- [7] Zumft, W.G., Kroneck, P.M.H. (2007). Respiratory transformation of nitrous oxide (N₂O) to dinitrogen by bacteria and archaea. *Adv. Microbial Phys.*, vol.52, p. 107-227.
- [8] Peers, G., Quesnel, S.A., Price, N.M. (2005). Copper requirements for iron acquisition and growth of coastal and oceanic diatoms. *Limnol. Oceanogr* 50 (4), p. 1149–1158.
- [9] Coale, K.H., Bruland, K.W. (1990). Spatial and temporal variability in copper complexation in the north Pacific, *Deep-Sea Res.* 37 (2), p. 317–336.

- [10] Brand, L.E., Sunda, W.G., Guillard, R.R.L. (1986). Reduction of marine-phytoplankton reproduction rates by copper and cadmium, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 96 (3), p. 225–250.
- [11] Harrys, ZL; Gitlin J. (1996). Genetic and molecular basis for Copper toxicity. *Am. J. Clin. Nutr* 63, p. 836S-841S.
- [12] Mendiguchía, C., Moreno, C., & García-Vargas, M. (2002). Determination of copper in seawater based on a liquid membrane preconcentration system. *Anal. Chem. Acta*, 460(1), p. 35–40.
- [13] Danielsson, L.G., Magnusson, B., Westerlund, S., (1978). Improved metal extraction procedure for determination of trace metals in sea water by atomic absorption spectrometry with electrothermal atomization. *Anal. Chim. Acta* 98 (1), p. 47–57.
- [14] Bruland, K.W., Franks, R.P., Knauer, G.A., Martin, J.H., (1979). Sampling and analytical methods for the determination of copper, cadmium, zinc, and nickel at the nanogram per liter level in sea-water. *Anal. Chim. Acta* 105, p. 233–245.
- [15] Wu, J.F., Boyle, E.A., (1997). Lead in the western North Atlantic Ocean: completed response to leaded gasoline phase out. *Geochim. Cosmochim. Acta* 61(15), p. 3279–3283.
- [16] Sohrin, Y., Urushihara, S., Nakatsuka, S., Kono, T., Higo, E., Minami, T., Norisuye, K., Umetani, S., (2008). Multielemental determination of GEOTRACES key trace metals in seawater by ICPMS after preconcentration using an ethylenediaminetriacetic acid chelating resin. *Anal. Chem.* 80(16), p. 6267–6273.
- [17] Ho, T.Y., Chien, C.T., Wang, B.N., Siriraks, A., (2010). Determination of trace metals in sea water by an automated flow injection ion chromatograph pretreatment system with ICPMS. *Talanta* 82(4), p. 1478–1484.
- [18] Milne, A., Landing, W., Bizimis, M., Morton, P., (2010). Determination of Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd and Pb in sea water using high resolution magnetic

sector inductively coupled mass spectrometry (HR-ICP-MS). *Anal. Chim. Acta* 665, p. 200–207.

- [19] Lee, J., Boyle, E., Echegoyen-Sanz, Y., Fitzsimmons, J., Zhang, R., Kayser, R., (2011). Analysis of trace metals (Cu, Cd, Pb, and Fe) in sea water using single batch Nitrilotriacetate resin extraction and isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 686, p. 93-101.
- [20] Spietelum, A., Marcinkowski, L., de la Guardia, M., Namieśnik, J. (2014). Green aspects, developments and perspectives of liquid phase microextraction technique. *Talanta* 119, p. 34-45.
- [21] Hu, B., He, M., Chen, B., Xia, L. (2013). Liquid phase microextraction for the analysis of trace elements and their speciation. *Spectrochim Acta Part B*, 80, p. 14-30.
- [22] Pinto Ganfornina, J.J. (2008). Nuevas alternativas para la simplificación y mejora de la metodología de análisis de metales pesados en muestras ambientales. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz.
- [23] García-Vargas, M.; Belizón, M.; Hernández-Artiga, M.P.; Martínez, C; Pérez-Bustamante, J.A. (1986). Ligands with the ‘ONNN’ group as chelating and preconcentrating substances of heavy metal ions: aroylhydrazone derivatives from di-2 pyridyl ketone. *Appl. Spectrosc.* 40, 1058.
- [24] Vergel Rodríguez, C. (2011). Desarrollo de procesos químicos de separación con membranas para la caracterización de sistemas marinos afectados por contaminación metálica. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz
- [25] Luciano, R.M., Bedendo, G.C., Carletto, J.S., Carasek, E. (2010). 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, *J. Hazard. Mat.*, 177, p. 567-572.

- [26] Es'haghi, Z., Azmoodeh, R. (2010). Hollow fiber liquid membrane microextraction of Cu^{2+} followed by atomic absorption spectroscopy determination. *Arabian J. Chem.* 3, p. 21-26.
- [27] López-López, J.A., Jonsson, J.A., García-Vargas, M., Moreno, C. (2014). Simple hollow fiber liquid membrane based preconcentration of silver for atomic absorption spectrometry. *Anal. Methods*, 2014 (6), p. 1462-1467.
- [28] Li L., Hu B. 2007. 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, p. 472-479.
- [29] Kislik V.S., Liquid membranes, Dzygiel P., Wieczorek P.P. (2010). Supported liquid membranes and their modifications: definition, classification, theory, stability, application and perspectives, Amsterdam, The Netherlands.
- [30] Peng J., Liu R., Liu J., He B., Hu X., Jiang G. 2007. Ultrasensitive determination of cadmium in seawater by hollow fiber supported liquid membrane extraction coupled with graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochim Acta Part B*, 62, p. 499-503.