



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

Grao en Química

Memoria do Traballo de Fin de Grao

Aplicación de la microextracción líquido-líquido asistida por vórtice para la determinación de ultra-trazas de mercurio en agua de mar

Aplicación da microextracción líquido-líquido asistida por vórtice para a determinación de ultra-trazas de mercurio en auga de mar

Vortex-assisted liquid-liquid microextraction applied to the determination of ultra-trace mercury in seawater

Paula Conchado Amado

Curso: 2021 – 2022

Convocatoria: Julio

Director/a 1: María Isabel Turnes Carou

Director/a 2: Jorge Moreda Piñeiro

ÍNDICE

Cronograma.....	1
Acrónimos y abreviaturas.....	2
Resumen.....	3
Resumo.....	4
Abstract.....	5
1. Objetivos.....	6
1.1. Objetivo general.....	6
1.2. Objetivos específicos.....	6
2. Introducción.....	7
2.1. Espectrometría de absorción atómica (AAS).....	9
2.1.1. Fundamento de la técnica.....	9
2.1.2. Metodologías clásicas.....	9
2.1.3. Analizador Directo de Mercurio (DMA-80).....	11
2.2. Química verde.....	12
2.3. Técnicas de microextracción.....	13
2.3.1. Microextracción en fase líquida (LPME).....	14
3. Revisión bibliográfica.....	17
4. Parte experimental.....	19
4.1. Instrumentación y material.....	19
4.2. Reactivos.....	19
4.3. Recogida de muestras.....	20
4.4. Limpieza del material.....	20
4.5. Procedimiento de extracción VALLME y medida directa de Hg.....	20
5. Resultados.....	22
5.1. Optimización.....	22
5.1.1. Elección del disolvente de extracción.....	22
5.1.2. Elección de pH.....	23
5.1.3. Tiempo de agitación con vórtice.....	24
5.1.4. Fuerza iónica.....	26
5.1.5. Volumen de disolvente de extracción.....	27
5.1.6. Concentración de APDC.....	28
5.2. Características analíticas del método.....	30
5.2.1. Rectas de calibrado.....	30
5.2.2. Límites de detección y cuantificación.....	31

5.2.4.	Exactitud.....	31
5.2.5.	Precisión.....	33
5.3.	Aplicación a muestras de agua de mar.....	34
6.	Conclusiones.....	36
6.	Conclusión.....	37
6.	Conclusions.....	38
7.	Bibliografía.....	39

Cronograma

Actividades		Revisión bibliográfica	Redacción TFG	Optimización	Características analíticas	Tratamiento de datos	
Semanas	Febrero	1					
		2					
	Marzo	3					
		4					
		5					
		6					
		7					
	Abril	8					
		9					
		10					
		11					
	Mayo	12					
		13					
		14					
		15					
	Junio	16					
		17					
		18					
		19					
		20					
	Julio	21					
		22					
		23					

Tabla 1: Cronograma de trabajo.

Acrónimos y abreviaturas

AAS	Espectrometría de absorción atómica (Atomic Absorption Spectrometry)
APDC	Pirrolidín ditiocarbamato amónico (Ammonium pyrrolidinedithiocarbamate)
CV-AFS	Espectrometría de fluorescencia atómica de vapor frío (Cold Vapour Atomic Fluorescence Spectrometry)
CV-AAS	Espectrometría de absorción atómica de vapor frío (Cold Vapour Atomic absorption Spectrometry)
DDTC	Dietilditiocarbamato de sodio (Sodium Diethyldithiocarbamate)
DDTP	Ácido dietilditiofosfórico (diethyldithiophosphoric acid)
DLLME	Microextracción Dispersiva Líquido-Líquido (Dispersive Liquid Liquid Microextraction)
ETAAS	Absorción atómica con atomización electrotérmica (Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry)
FAAS	Absorción atómica con llama (Flame Atomic Absorption Spectrometry)
FP	Factor de preconcentración
ICP-MS	Espectrometría de masas de plasma de Acoplamiento Inductivo (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry)
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
LPME	Microextracción en fase líquida (Liquid-Phase Microextraction)
SPME	Microextracción en fase sólida (Solid Phase Microextraction)
VALLME	Microextracción Líquido-Líquido asistida por Agitación con Vórtice (Vortex Assisted Liquid-Liquid Microextraction)

Resumen

En este trabajo de fin de grado se realiza la determinación de mercurio a nivel ultra-traza en muestras de agua de mar. Para ello, se utiliza una técnica de preconcentración basada en la microextracción líquido-líquido asistida por vórtice (VALLME) y como método analítico la espectrometría de absorción atómica (AAS) mediante un analizador directo de mercurio (DMA-80).

Además, se realiza una revisión bibliográfica para determinar las condiciones de extracción adecuadas. Se prueban 3 disolventes de extracción orgánicos (hexano, octanol y acetato de etilo) y se determina que agente quelatante genera mayor señal analítica de mercurio; los seleccionados tras el estudio bibliográfico fueron el dietilditiocarbamato (DDTC) y el pirrolidín ditiocarbamato amónico (APDC). Una vez realizados los ensayos previos de optimización con agua de mar sintética al 35‰ como muestra, se establecieron los parámetros más importantes implicados en la técnica de microextracción VALLME: pH 3,5; volumen de hexano (300 μ L), concentración de APDC (0,125 mM), tiempo de vórtice (4 minutos) y fuerza iónica (en este caso sin adición de NaCl).

Por último, se tratan los datos generados y se estudian las características analíticas del método: rectas de calibrado, precisión, límites de detección y cuantificación, y la exactitud mediante el análisis de materiales de referencia (NASS-7, SLEW-3, BCR-505). Finalmente, la metodología optimizada y validada se aplica al análisis de Hg en muestras de agua de mar recogidas en distintos puntos de la costa de A Coruña.

Palabras clave: Microextracción líquido-líquido asistida por vórtice (VALLME), mercurio, agua de mar, espectrometría de absorción atómica (AAS) y analizador directo de mercurio (DMA-80).

Resumo

Neste traballo de fin de grao realízase a determinación de mercurio a nivel ultra-traza en mostras de auga de mar. Para iso, emprégase unha técnica de preconcentración baseada na microextracción líquido-líquido asistida por vórtice (VALLME) e coma método analítico a espectrometría de absorción atómica (AAS) mediante un analizador directo de mercurio (DMA-80).

Ademais, realízase unha revisión bibliográfica para determinar as condicións de extracción axeitadas. Se proban 3 disolventes de extracción orgánicos (hexano, octanol e acetato de etilo) e determínase que axente quelatante xera maior sinal analítico de mercurio, os seleccionados tras o estudo bibliográfico foron o dietilditiocarbamato (DDTC) e o pirrolidín ditiocarbamato amónico (APDC). Unha vez realizados os ensaios previos de optimización con auga de mar sintética ao 35‰ como mostra, establecéronse os parámetros máis importantes implicados na técnica de microextracción VALLME: pH 3,5; volume de hexano (300 μ L), concentración de APDC (0,125 mM), tempo de vórtice (4 minutos) e forza iónica (neste caso sen adición de NaCl).

Por último, trátanse os datos xerados e estúdanse as características analíticas do método: rectas de calibrado, precisión, límites de detección e cuantificación, e a exatidade mediante o análise de materiais de referencia (NASS-7, SLEW-3, BCR-505). Finalmente, a metodoloxía optimizada e validada aplícase ao análise de Hg en mostras de auga de mar recollidas en distintos puntos da costa da Coruña.

Abstract

In this project, mercury quantification at ultra-trace level in seawater samples has been carried out by using vortex-assisted liquid-liquid microextraction (VALLME) as preconcentration technique, and atomic absorption spectrometry (AAS) by direct mercury analyzer (DMA-80) as analytical method.

Also, a review to extraction conditions assessment has been carried out. Three organic solvents (hexane, octanol and ethyl acetate) and two chelating agents (diethyldithiocarbamate, DDTC and ammonium pyrrolidine dithiocarbamate, APDC) have been tested. After VALLME optimization by using synthetic seawater (35‰), the most important parameters involved were established: pH 3,5; hexane volume (300 μ L), APDC concentration (0.125 mM), vortex time (4 minutes) and ionic strength (in this case without addition of NaCl).

Finally, data is treated and the figures of merit have been studied: calibration graph, precision, detection and quantification limits, and accuracy through the analysis of reference materials (NASS-7, SLEW-3, BCR-505). Finally, optimized and validated methodology has been applied to the analysis of Hg in seawater samples collected at different points along the coast of A Coruña.

1. Objetivos

1.1. Objetivo general

Hoy en día es de gran importancia el estudio de la calidad del agua del mar, la presencia de elementos tóxicos a niveles traza, como los metales pesados, puede afectar negativamente a la salud humana y al medio ambiente. El seguimiento y la regulación de la concentración son acciones de vital importancia, además, del desarrollo de técnicas analíticas de determinación de metales traza.

El objetivo principal de este Trabajo de Fin de Grado se basa en la determinación y cuantificación de Hg presente en muestras de agua de mar pertenecientes a la costa de la ciudad de A Coruña (de las playas de Riazor, las Lapas, Adormideras, Oza, Santa Cristina y de la ría del Burgo), previa optimización de los parámetros de extracción para la técnica VALLME (como son el disolvente de extracción, el pH, el tiempo de agitación, la fuerza iónica, el volumen de disolvente extractante y la concentración de quelatante).

1.2. Objetivos específicos

- Aplicación de la técnica verde de microextracción líquido-líquido asistida por vórtice (VALLME) para la extracción y preconcentración del mercurio.
- Determinación de Hg mediante la aplicación de la espectrometría de absorción atómica con un analizador directo de mercurio (DMA-80).
- Estudio y selección de los parámetros óptimos para el proceso de extracción.
- Estudio de la exactitud, precisión y de los límites de detección y cuantificación gracias al análisis de materiales de referencia.

2. Introducción

Los metales pesados, como el mercurio, son elementos tóxicos que se pueden acumular en los organismos vivos y pueden causar graves problemas de salud en seres humanos y en el medio ambiente, por lo tanto, es de especial importancia su seguimiento y el estudio de sus fuentes de origen.

El mercurio es un metal de transición, de color gris brillante, que se encuentra en estado líquido a temperatura ambiente. Destaca su uso en el ámbito científico e industrial debido a sus propiedades químicas y físicas de interés.

A causa de sus peculiares propiedades, éste es muy usado tanto en la disciplina de la química, para la construcción de, por ejemplo, electrodos de calomelanos, que se emplean en la medida de pH, tubos de rayos X o barómetros, como en la disciplina de la medicina para la creación de termómetros o en la odontología para realizar empastes de dientes. En la actualidad no es muy utilizado en esta rama debido a la alta toxicidad que presenta¹.

El mercurio es relativamente inerte, su forma elemental forma amalgamas fácilmente con metales nobles (Au, Ag, Pt, Pd). Esta propiedad permite la preconcentración de este previa a su determinación analítica².

Sus diferentes especies tanto orgánicas (las que presentan mayor toxicidad) como inorgánicas, afectan a los sistemas nerviosos central y periférico.

Las especies de este elemento son muy volátiles y, consecuentemente, peligrosas, pueden ser transportadas con facilidad a grandes distancias por el aire y las precipitaciones.

La capacidad de los sedimentos para retener este metal puede retrasar la eliminación de la contaminación durante años. El mercurio inorgánico puede ser metilado por los microorganismos (Figura 1) que se encuentran en los sedimentos formando compuestos de gran toxicidad².

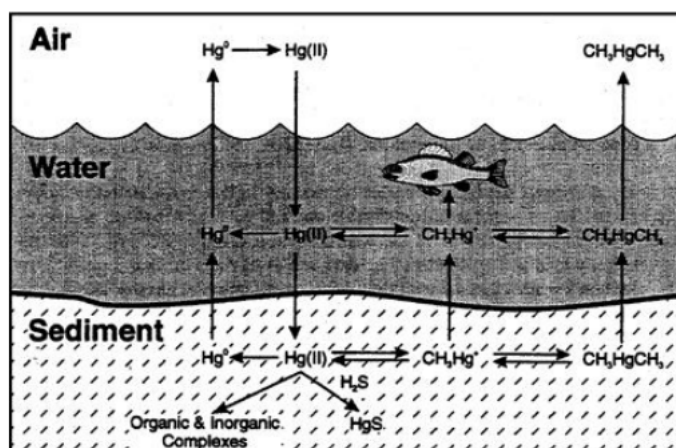


Figura 1. Ciclo del mercurio¹.

Las liberaciones al medio ambiente se originaron debido a fuentes naturales como volcanes y a la actividad humana mediante la producción de cemento, fundiciones, la minería u otras acciones³.

Es un elemento tóxico, que se puede acumular en los organismos vivos y puede causar graves problemas de salud en seres humanos y en el medio ambiente. El riesgo por ingestión o inhalación de vapor de mercurio puede ser perjudicial o mortal en ocasiones, afectando tanto al sistema nervioso como inmunitario, al aparato digestivo, los pulmones y los riñones. Además, las sales de mercurio inorgánicas son corrosivas para la piel, los ojos y el tracto intestinal².

Los organismos acuáticos pueden ingerirlo, transformándose en una especie altamente tóxica que se bioacumula y que puede ser transportada a través de la cadena trófica. Existen catástrofes históricas de intoxicación a gran escala, por ejemplo, el suceso de la enfermedad de Minamata a mediados del siglo XX, en la bahía de Japón, causada por las aguas industriales contaminadas, el cual se trata del caso más grave de envenenamiento y contaminación por metilmercurio de la historia^{4,5}. Después de este suceso entró en vigor un acuerdo mundial, el Convenio de Minamata, para controlar el ciclo de vida de este metal pesado, así como su suministro y comercio, reduciendo su uso, emisión y liberación e intentando concienciar al público⁵.

Según varios estudios, en el ser humano se ha demostrado la presencia de mercurio en el cabello, uñas y en el propio organismo. La contaminación proviene de alimentos, en especial, mariscos y pescados, donde el mercurio elemental se transforma en metilmercurio, el cual posee una elevada solubilidad en lípidos y una gran facilidad para atravesar las membranas celulares. En los alimentos vegetales también existe

contaminación por mercurio, debido al uso de fertilizantes fosfatados (contenido de mercurio, cadmio y plomo)⁶.

Por todos estos problemas, tanto en el medioambiente como en los seres vivos, es recomendable hacer una monitorización del mercurio para controlar los niveles de concentración de este metal y que no sobrepasen los límites de toxicidad establecidos. En el Real Decreto 817/2015 se establecen los objetivos de la protección de aguas, prevención del deterioro y protección de su estado, además de establecer medidas específicas para reducir la contaminación por sustancias prioritarias. Esta normativa establece para el mercurio y sus compuestos que el límite en aguas superficiales sea de 0,07 µg/L y en la biota, es decir en los peces, de 20 µg/Kg⁷.

El estudio realizado en este TFG se basa en la determinación de mercurio en agua de mar, donde se encuentra a niveles de concentración ultra-traza, es por eso que son necesarias técnicas de preconcentración elevadas que permitan separar exhaustivamente el mercurio de la matriz salina de la muestra, y técnicas de detección sensibles que permitan llegar a concentraciones de ng/L.

2.1. Espectrometría de absorción atómica (AAS)

2.1.1. Fundamento de la técnica

La espectrometría se basa en la interacción entre la materia y la energía. El tipo de espectrometría depende de la cantidad física medida, pudiendo ser una intensidad de energía absorbida o emitida⁸.

La espectrometría de absorción atómica (AAS) es una de las principales técnicas utilizadas en los laboratorios de química analítica para la determinación de metales pesados a niveles traza⁹. La absorción atómica es el proceso mediante el cual el átomo en estado fundamental puede absorber energía de una radiación a una longitud de onda específica y pasar al estado excitado. Se emplea este proceso para cuantificar la cantidad de energía, en forma de fotones de radiación, absorbidos por una muestra¹.

2.1.2. Metodologías clásicas

Las técnicas para la determinación y cuantificación de metales a nivel ultra-traza deben presentar una alta sensibilidad. Se han empleado una amplia variedad, como la espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS), la espectrometría de absorción atómica con llama (FAAS) o la espectrometría de masas acoplada de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS); sin embargo, las más populares, que presentan mayor sensibilidad y selectividad (precisión y exactitud) para

la determinación de nuestro analito de interés son la espectrometría de absorción atómica con vapor frío (CV-AAS) y la espectrometría de fluorescencia atómica con vapor frío (CV-AFS)¹. La diferencia entre las técnicas de AAS son los distintos tipos de atomización.

Atomización de llama

En este método, la disolución se nebuliza mediante un flujo oxidante gaseoso y se transporta hacia una llama donde ocurre la atomización. En la llama tienen lugar dos procesos: una desolvatación (donde el disolvente se evapora para producir un aerosol) y una disociación (donde la mayor parte de las moléculas produce un gas atómico y algunos de esos átomos se ionizan formando cationes y electrones)¹⁰.

Atomización electrotérmica

Los atomizadores electrotérmicos son más sensibles, debido a que la muestra completa se atomiza en un corto periodo de tiempo, utilizándose para medir la absorción y la fluorescencia atómica. Este método se basa en que un volumen pequeño de muestra se evapora primero a una temperatura baja y luego se convierte en cenizas a una temperatura mayor en un tubo de grafito que se calienta eléctricamente. Después de convertirlos en ceniza, la corriente se incrementa con rapidez, elevando la temperatura y atomizándose la muestra en un periodo de segundos¹⁰.

Generación de vapor frío

Se trata de un método de atomización química aplicable solamente a la determinación de mercurio. Se denomina vapor frío debido a que el mercurio puede encontrarse en fase gas a temperatura ambiente lo que implica que no es necesario suministrar energía térmica por llama o por otro sistema diferente de atomización. La generación del vapor tiene como objetivo reducir (reductor: NaBH_4 , SnCl_2) todo el mercurio presente en la muestra a mercurio elemental, independientemente de la forma o especie en la que exista^{1,10}

Es un método de análisis directo para la determinación de analitos mediante la volatilización, permitiendo la separación del mercurio. Las especies generadas son conducidas a través de una corriente de gas inerte hasta el equipo de Espectrofotometría de Absorción Atómica (AAS) o Espectrofotometría de Fluorescencia Atómica (AFS) de donde se obtiene la determinación y cuantificación del analito de interés¹⁰.

2.1.3. Analizador Directo de Mercurio (DMA-80)

En las muestras de agua de mar se ha determinado mercurio a nivel ultra-traza mediante Espectrometría de Absorción Atómica (AAS) en el SAI, Servicio de Apoyo a la investigación de la Universidad de A Coruña.

Se ha utilizado un analizador directo de mercurio (DMA-80) (Figura 2). Este equipo dispone de un automuestreador con capacidad para analizar 40 muestras con control electrónico de la posición y con un sistema neumático para la introducción de muestras¹¹.

Se introducen las navecillas manualmente en el muestreador con un orden específico, para así evitar contaminaciones y ambigüedades, y posteriormente se programa con las condiciones deseadas.



Figura 2. Analizador Directo de Mercurio Tricell (DMA-80).

El funcionamiento del equipo se basa en el calentamiento de la muestra a 750°C en un horno de atmósfera rica en oxígeno (99,5%) durante 60 segundos, produciéndose una descomposición térmica¹¹

Los productos gaseosos de la reacción, incluido el mercurio, son conducidos a través de una corriente de oxígeno que pasa por una cámara catalítica eliminando las impurezas presentes. A continuación, son transportados hacia una amalgama de oro donde el vapor de mercurio queda retenido. Posteriormente, pasado un tiempo predefinido (60s) el amalgamador se calienta rápidamente a temperaturas mayores de 800°C, produciéndose una desorción térmica liberando así todo el mercurio. El vapor liberado pasa a través del sistema hasta una celda que se ubica a lo largo del paso óptico del espectrómetro donde se realiza la medida de la absorbancia y

consecuentemente de la concentración de mercurio. El sistema de detección contiene una lámpara específica de Hg (253,7 nm) que permite cuantificar este metal¹¹.

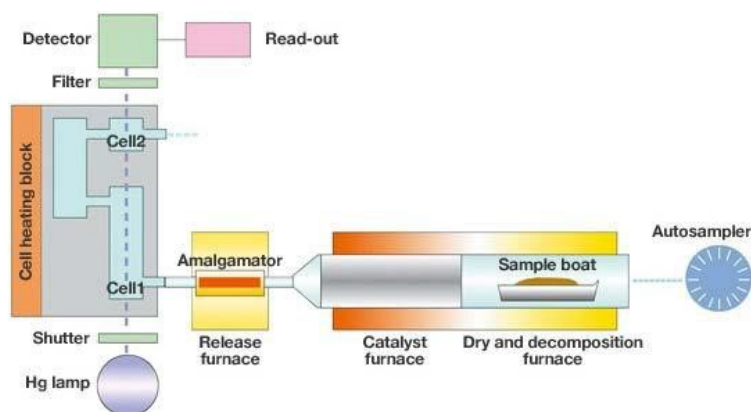


Figura 3. Esquema del procedimiento de medida.

La ventaja de esta técnica es la posibilidad de eliminar el uso de reactivos y la etapa de pretratamiento, minimizando los tiempos de análisis y la manipulación de las muestras, se trata de una técnica analítica verde, respetuosa con el medio ambiente. Se puede realizar la determinación de mercurio presente en muestras sólidas, líquidas y gaseosas¹². La principal desventaja es que no se puede realizar una especiación, es decir, no permite diferenciar entre las diferentes especies de mercurio existentes en la muestra, es necesario aplicar un tratamiento previo. En este caso es de interés determinar todo el mercurio presente así que es un procedimiento óptimo para la práctica.

Por otro lado, la sensibilidad del método es muy elevada debido a la etapa de pre-concentración en la amalgama de oro, permitiendo la cuantificación de mercurio a nivel ultra-traza².

2.2. Química verde

La química verde, también llamada química sostenible es una propuesta definida para minimizar el impacto de la actividad humana ejercida sobre el medio ambiente que genera graves problemas globales. Esta rama de la química se basa en el desarrollo y en el diseño de productos o procesos químicos que reducen o eliminan el uso y producción de sustancias peligrosas y minimizan los riesgos medioambientales, sobre la salud humana y la generación de residuos¹³. A pesar de llevar unos años activa esta disciplina se encuentra en sus inicios.

El objetivo es la utilización de un conjunto de principios que reducen o eliminan el uso o la generación de productos peligrosos, los 12 principios de la química verde fueron

definidos en 1988 por Anastas y Warner¹³. Algunos de los principios en los que se basa este trabajo son:

- Prevenir la producción de residuos.
- Maximizar la economía atómica. Minimizar la formación de subproductos.
- Uso de disolventes y condiciones seguras. Las sustancias auxiliares de los procesos químicos (disolventes, tampones, aditivos de separación, entre otros), han de ser inocuas o se deben reducir al mínimo.
- Monitorear los procesos químicos en tiempo real para evitar la contaminación. Deben crearse sistemas de control y monitorización continuos para prevenir la producción de sustancias secundarias peligrosas durante los procesos.

2.3. Técnicas de microextracción

Los métodos analíticos que permiten la determinación de compuestos perjudiciales o contaminantes han aumentado considerablemente en los últimos años, debido al incremento en la demanda de análisis ambientales de muestras de gran relevancia, pues presentan un gran impacto sobre la salud de las personas y sobre el medio ambiente.

A pesar de los avances que se han producido en la instrumentación analítica, el pretratamiento de la muestra sigue siendo necesario en la mayoría de los casos para lograr una cuantificación precisa de los analitos de interés. Por lo tanto, se han desarrollado nuevas metodologías de extracción/preconcentración que aumentan la precisión, la reproducibilidad, el rendimiento del experimento; las cuales son económicas y sencillas, y presentan procedimientos ajustados para determinar niveles traza en muestras ambientales¹⁴.

Muchas de estas técnicas llevan implícito la miniaturización del proceso de extracción, lo cual es acorde a los principios de la química verde, reduciendo el uso de reactivos, la generación de residuos y el consumo de energía¹⁴.

Las técnicas de pretratamiento de muestra más utilizadas que reúnen todas las características mencionadas son las técnicas de microextracción. Existen diferentes técnicas de microextracción establecidas por diferentes investigadores, algunas de ellas son: la microextracción en fase líquida (LPME) o la microextracción en fase sólida (SPME), entre otras¹⁴. En este trabajo se hace uso de la LPME, en concreto la microextracción líquido-líquido asistida por vórtice (VALLME).

2.3.1. Microextracción en fase líquida (LPME)

Se trata de una de las más antiguas técnicas de preconcentración en química analítica. Es un método rápido, sencillo, respetuoso con el medio ambiente y alcanza elevados factores de preconcentración (FP). El proceso se produce entre una mínima cantidad de disolvente (inmiscible en agua) y una muestra acuosa¹⁵¹⁶. Se divide en diferentes tipos de técnicas derivadas que se distinguen por el tipo de fase extractante.

2.3.1.1. Microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME)

Fue desarrollada por Rezaee en 2006¹⁷, sus ventajas son la sencillez de operación, la rapidez de extracción, alta sensibilidad y selectividad, alto factor de preconcentración (FP), bajo coste, elevada recuperación, precisión y además, es respetuosa con el medio ambiente por el bajo consumo de reactivos y disolventes orgánicos tóxicos.

Se basa en la formación de una solución turbia, primero se inyecta rápidamente un microvolumen de una mezcla de extractante orgánico y disolventes dispersivos a la muestra acuosa. Las pequeñas gotas de disolventes de extracción dispersas proporcionan una gran área de superficie de contacto, por lo que el estado de equilibrio se logra en muy poco tiempo¹⁸. Luego, se centrifuga y se realiza la recogida de la fase orgánica enriquecida con los analitos para la posterior determinación mediante la técnica analítica más adecuada.

Es de gran importancia la elección de unas condiciones adecuadas y su respectiva optimización. Esos parámetros son:

- Selección del disolvente de extracción: se eligen disolventes con un buen comportamiento cromatográfico, baja solubilidad en agua y con gran capacidad de extracción. Se pueden emplear disolventes de baja y alta densidad, en función de esta la gota enriquecida con el analito se flotará sobre la muestra acuosa o se depositará en el fondo del tubo.
- Volumen del disolvente de extracción: un volumen bajo es la opción más adecuada porque permite obtener un buen FP siguiendo los principios de la Química Verde.
- Selección del dispersante: se escoge en función de sus propiedades y a su capacidad de miscibilidad con la fase acuosa y orgánica. Por otro lado, se busca reducir el empleo de disolventes tóxicos.
- Volumen del dispersante: se escoge en función de las necesidades del ensayo. El uso de un volumen grande puede provocar un FP menor y el empleo de un volumen pequeño puede causar que el proceso de dispersión sea incompleto.

- Tiempo y velocidad de centrifugación: este paso se aplica para obtener el equilibrio entre ambas fases, la orgánica y la acuosa. Cuanto menor sea el tiempo para lograr alcanzar ese equilibrio mejor será el proceso de extracción, sin embargo, si el tiempo es elevado el experimento sería más lento, al reducir demasiado el tiempo de extracción puede no llegar a alcanzar el equilibrio y se reduciría la extracción de analito.
- Fuerza iónica: este parámetro equivale a la concentración salina en la muestra, un aumento de la fuerza iónica implica que el volumen de fase orgánica sedimentada sea mayor y, por lo tanto, hace que el FP disminuya. Por otro lado, la adición de sal aumenta el FP provocando una disminución de la solubilidad del analito en la fase acuosa, mejorando así la capacidad de extracción.

Si bien esta técnica tiene sus ventajas frente a otras utilizadas con los mismos objetivos, también posee algunas desventajas como pueden ser la difícil automatización y el empleo de dispersante.

2.3.1.2. Microextracción líquido-líquido asistida por vórtice (VALLME)

Fue presentada en 2010 como una técnica innovadora para solucionar los inconvenientes de la técnica DLLME. Se basa en la preparación de muestras por la dispersión de un disolvente orgánico de extracción en contacto con una fase acuosa empleando como agitación un vórtice produciéndose una emulsión suave¹⁹. Las microgotas que se forman pueden acelerar la transferencia de masa de los analitos a la fase captadora orgánica. La separación entre la fase acuosa y la fase orgánica se produce gracias a un proceso de centrifugación¹⁸, posteriormente se forma una microgota en la parte superior o inferior de líquido dependiendo de la densidad del disolvente elegido. Con una micropipeta automática es posible extraer fracciones de la gota y así analizar y determinar los analitos de interés.

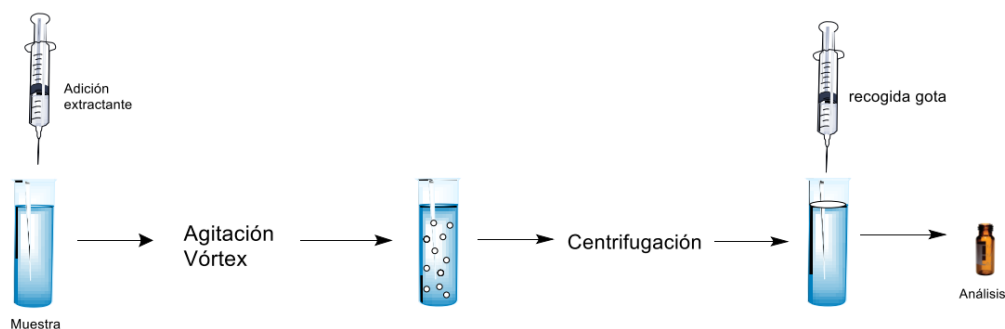


Figura 4. Esquema del proceso de la técnica VALLME.

La selección de unas condiciones adecuadas determinará la obtención de una elevada recuperación de extracción. Los parámetros importantes en esta técnica son similares a los de la DLLME detallados anteriormente. En ausencia de disolvente dispersante es necesario optimizar el tiempo de vórtice, hay que tener en cuenta que si se emplea un tiempo muy corto la dispersión y la emulsión serán incompletas y consecuentemente, la extracción disminuirá; por el otro lado si el tiempo es excesivo se ralentizaría el proceso.

Esta técnica permite alcanzar el equilibrio entre las fases presentes con gran rapidez, lo que hace que el factor de preconcentración sea elevado y los límites de detección bajos a nivel de ppb o ppt. Además, sustituye el uso de dispersante por la agitación con vórtice, que mejora el proceso de extracción, esto es una ventaja frente a la técnica de DLLME¹⁸

3. Revisión bibliográfica

Para la selección de las condiciones de microextracción VALLME para la preconcentración de Hg en agua de mar se realizó en primer lugar una búsqueda bibliográfica (Tabla 1). En la tabla 1 se muestran los agentes quelatantes y los disolventes orgánicos más utilizados para la microextracción de Hg en diferentes muestras mediante DLLME; así como las condiciones experimentales óptimas. No se encontró en la bibliografía ningún procedimiento que utilice la VALLME para la preconcentración de Hg.

Como puede verse, los agentes quelatantes más utilizados son DDTC, APDC, ditizona y ácido dietilditiofosfórico (DDPT), los disolventes más comunes son cloroformo, tetracloruro de carbono, octanol y undecanol. En este trabajo se selecciona el DDTC y APDC como agentes quelatantes y se descarta el uso del tetracloruro de carbono y del cloroformo como disolventes de extracción ya que no cumplen los principios de la química verde. Se eligen como disolventes extractantes el octanol (ya citado en la revisión bibliográfica como posible candidato) y el hexano y el acetato de etilo debido a su menor toxicidad y su aplicación para la extracción de una gran variedad de compuestos orgánicos.

Tabla 1. Resumen de las condiciones experimentales para la preconcentración de mercurio en agua de mar mediante VALLME.

Quelatante (concentración)	Muestra	Volumen de muestra	Disolvente extractante (volumen)	pH	Sal adicionada (NaCl)	Referencia
DDTC (0,05 M)	Muestras de agua	5 mL	CCl ₄ (20 µL)	6	No adición	20
APDC	Muestras de comida	10 mL	1-octanol (50 µL)	5	No adición	21
DDTC (60 mg/L)	Muestras medioambientales	5 mL	CCl ₄ (35 µL)	6	- ^a	22
DDTP (0,15 % (v/v))	Trucha de piscifactoría	10 mL	1-undecanol (40 µL)	2,4	No adición	23
Ditizona (1,6·10 ⁻⁴ M)	Muestras de agua	10 mL	CCl ₄ (200 µL)	3,4	- ^a	24
Ditizona	(1,0·10 ⁻⁴ M)	Medio no acuoso	CCl ₄ (0,05 mL)	4	- ^a	25
	(8,0·10 ⁻⁵ M)		CHCl ₃ (0,05 mL)	4		
	(3,0·10 ⁻⁵ M)		Octanol (0,04 mL)	1		
^a No indicado						

4. Parte experimental

4.1. Instrumentación y material

- Analizador Directo de Mercurio DMA-80 (Milestone Srl, Sorisole, Italia).
- pHmetro GLP21 (Crison, Barcelona, España).
- Sistema de purificación de agua Mili-Q (Millipore Co., Bedford, MA, USA).
- Centrífuga Eppendorf 5804 (Eppendorf, Madrid, España).
- Agitador de tubos Vórtice, Vibrax-VXR (IKA, Staufen, Alemania).
- Micropipetas Eppendorf de volumen fijo y variable (Hamburgo, Alemania).
- Tubos para centrífuga con tapones
- Navetas de níquel (Milestone Srl, Sorisole, Italia).
- Balanza analítica ADN modelo EA-180A con precisión de $\pm 0,0001$ g (Thebarton SA, Australia)
- Balanza granataria GRAM modelo SV-510ix, de precisión $\pm 0,001$ g (ICT, Instrumentación Científica Técnica, Barcelona, España).
- Material de uso común

4.2. Reactivos

- Standard solution of Hg 1.000 mg L^{-1} (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Disolución de DDTC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) $0,05 \text{ M}$ en metanol
- Disolución de APDC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) $0,05 \text{ M}$ en agua
- Agua ultrapura (Mili-Q) con resistividad de $18 \text{ M}\Omega/\text{cm}$.
- Disolución de ácido nítrico 69-70% (Baker, Phillipsburg, PA USA)
- Disolución de amoníaco 25 % (Panreac, Barcelona, España).
- Disolución de agua mar (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) al 35%
- Disolventes extractantes:
 - o 1-octanol Merck (Darmstadt, Alemania).
 - o Hexano para análisis Panreac, (Barcelona, España).
 - o Acetato de etilo para cromatografía de líquidos Merck (Darmstadt, Alemania).
- Muestras de agua de mar de diferentes puntos de la costa de A Coruña (Playa de Riazor, Las Lapas, Adormideras, Oza, Santa Cristina y la ría del Burgo).
- Materiales de referencia:
 - o NASS-7, Material certificado de agua de mar (National Research Council of Canadá, Ottawa, Canadá).
 - o SLEW-3, Material certificado de agua de estuario (National Research Council of Canadá, Ottawa, Canadá).
 - o BCR-505, Material certificado de agua de estuario (Comisión Europea, Bruselas, Bélgica).

4.3. Recogida de muestras

Las muestras de agua de mar se toman el día 25/05/21 en diferentes playas urbanas y en una ría urbana de la ciudad de A Coruña y se recogen en botellas de vidrio topacio de 100 mL, se filtran a través de un filtro de celulosa de 0,45 μm y se acidifican con ácido nítrico ($\text{pH} < 2$) y se almacenan en la nevera a 4 $^{\circ}\text{C}$.



Figura 5. Mapa de la recogida de muestras de agua de mar en la costa de A Coruña.

4.4. Limpieza del material

Durante el proceso para eliminar la contaminación de los materiales de plástico y de vidrio, se lavaban con abundante agua ultra-pura, si se encontraban rotulados los tubos para centrifuga se limpiaban con acetona previamente a ser sumergidos en un baño de ácido nítrico al 10% durante 24 h. Por último, el material se volvió a lavar con abundante agua ultra-pura y los tubos centrifuga se introdujeron en una estufa a $< 60^{\circ}\text{C}$ para que se secaran.

Las navcillas antes de ser utilizadas se limpiaron en un horno mufla eléctrico a 600°C durante 15 minutos para eliminar restos de trazas de mercurio de análisis anteriores².

4.5. Procedimiento de extracción VALLME y medida directa de Hg

Se introducen 20 mL de agua de mar en tubos de centrifuga de 50 mL, se adiciona 50 μL de APDC (0.125 mM) y 300 μL de hexano. Se cierran los tubos y se agita (con formación de vórtice) durante 4 minutos. Después de centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos, se recogen 100 μL de hexano (fase orgánica) y se depositan en la navcilla de

Ni. La navicilla de Ni se introduce en el muestreador automático del equipo (DMA-80) y se mide la concentración de Hg mediante AAS según el procedimiento indicado en el apartado 2.1.3.

5. Resultados

5.1. Optimización

En este trabajo se realizan diferentes ensayos de optimización donde se ajustan los parámetros más importantes para la técnica de microextracción VALLME: selección del disolvente de extracción, el pH, el tiempo de vórtice, la fuerza iónica, el volumen de extractante y la concentración de quelatante. Para cada uno de los experimentos se realizarán por duplicado y para cada uno de ellos se preparará un blanco.

5.1.1. Elección del disolvente de extracción

Primero, se realizan unas pruebas previas con tres disolventes distintos (octanol, acetato de etilo y hexano) para poder determinar cuál de estos posee mejor capacidad de extracción del analito de interés. Los tres disolventes poseen una densidad inferior a la del agua, por lo tanto, la fase orgánica flota en la parte superior de la muestra.

El octanol es un disolvente orgánico incoloro con un olor característico. Posteriormente a la agitación con vórtice se forma una emulsión bastante visible. A continuación, se centrifuga y se crea una gota esférica y uniforme, facilitando su recogida para la deposición en las navetas. El inconveniente de este disolvente de extracción es que su punto de evaporación es relativamente alto, en torno a 196°C y no se evapora sin aplicarle un proceso extra²⁶

El acetato de etilo es un disolvente orgánico incoloro. La emulsión que se forma durante la agitación por vórtice es suave. Luego del proceso de centrifugación se puede visualizar la fase orgánica en forma de una película fina en la parte superior del líquido, esto dificulta su recogida con la micropipeta. Su evaporación al depositar la fase orgánica en la naveta es rápida y permite la determinación del analito en el analizador²⁶.

El hexano es un disolvente orgánico incoloro, con un olor característico similar al de un hidrocarburo con un punto de ebullición relativamente bajo lo que facilita su evaporación en la naveta. La nube de dispersión que se genera por el vórtice es suave. La gota sedimentada se visualiza peor que la que se genera por el octanol. Su forma es similar a una película depositada en la parte superior del líquido contenido en el tubo, pero con un grosor mayor a la del acetato de etilo. Es viable recoger varias porciones sin contaminar la muestra con fracción acuosa²⁶.

A la vista de estos resultados, seleccionamos el hexano como extractante para los posteriores ensayos.

5.1.2. Elección de pH

En el siguiente ensayo, se preparan muestras de agua de mar sintética a diferentes valores de pH en torno al valor óptimo indicado en la bibliografía para que cada quelatante (DDTC y APDC). Estos valores están detallados en el apartado de revisión bibliográfica.

Las condiciones experimentales para las otras variables implicadas se indican en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones experimentales para la optimización del pH para el DDTC y APDC (N=2).

	Volumen muestra (mL)	Volumen hexano (µL)	Concentración DDTC/APDC (mM)	[Hg] (µg/L)	Tiempo vórtice (min)	Velocidad y tiempo centrifuga
Blanco	20	500	0,125	-	5	3000 rpm / 10 min
Muestra	20	500	0,125	0,25	5	3000 rpm / 10 min

En la Figura 6 se puede observar que, dentro del rango de pH estudiado para DDTC, la masa de Hg (expresada en ng) disminuye a medida que el pH es mayor.

En la figura 7 aparece representada la masa de Hg frente al rango de pH establecido para el APDC. Igual que en el caso estudiado para el DDTC a valores de pH más ácidos la señal del analito aumenta. Por otro lado, la variación de la señal analítica no es uniforme ya que a pH 3.5 sufre una pequeña disminución.

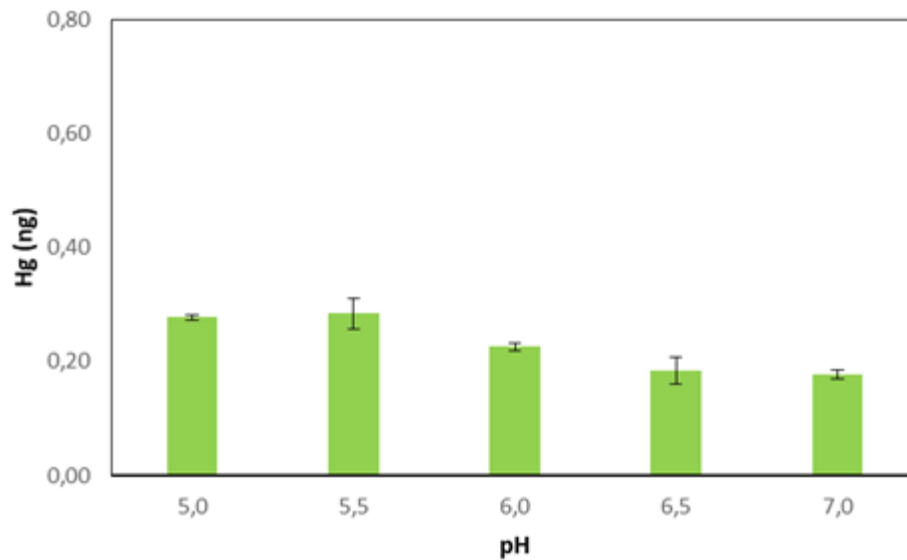


Figura 6. Optimización del pH para el DDTc.

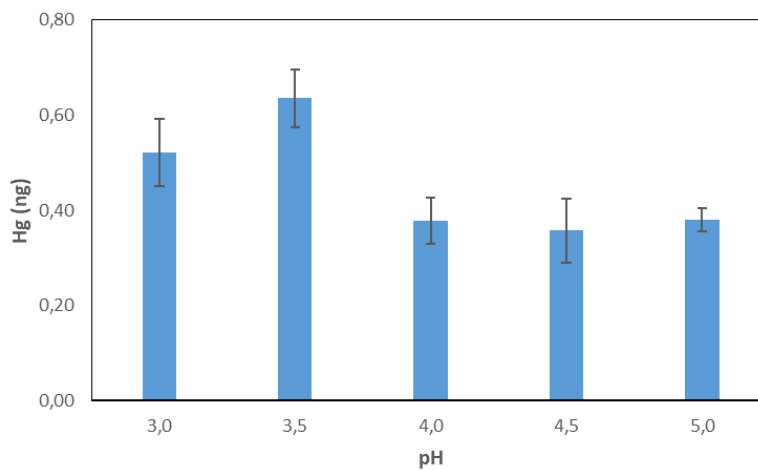


Figura 7. Optimización del pH para el APDC.

Por tanto, seleccionamos pH óptimos de muestra 5.5 y 3.5 cuando utilizamos DDTc y APDC, respectivamente.

5.1.3. Tiempo de agitación con vórtice

A continuación, se realizan varias pruebas para determinar el tiempo óptimo de agitación (vórtice). Las condiciones experimentales para las otras variables implicadas se indican en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones experimentales para la optimización del tiempo de agitación del vórtice (N=2).

Tiempo de vórtice		Blanco	Muestra
Volumen muestra (mL)		20	20
Vol disolvente hexano (µL)		500	500
Concentración de quelatante (mM)		0,125	0,125
[Hg] (µg/L)		-	0,25
Velocidad y tiempo centrifuga		3000 rpm / 10 min	3000 rpm / 10 min
pH	DDTC	5,5	5,5
	APDC	3,5	3,5

En la Figura 8 se observa la comparación de las medidas experimentales del tiempo de extracción para los diferentes agentes quelatantes. La masa de Hg obtenida para el APDC es superior a las que proporciona el DDTC. Además, para ambos agentes la masa de Hg medida varía ligeramente en el rango estudiado.

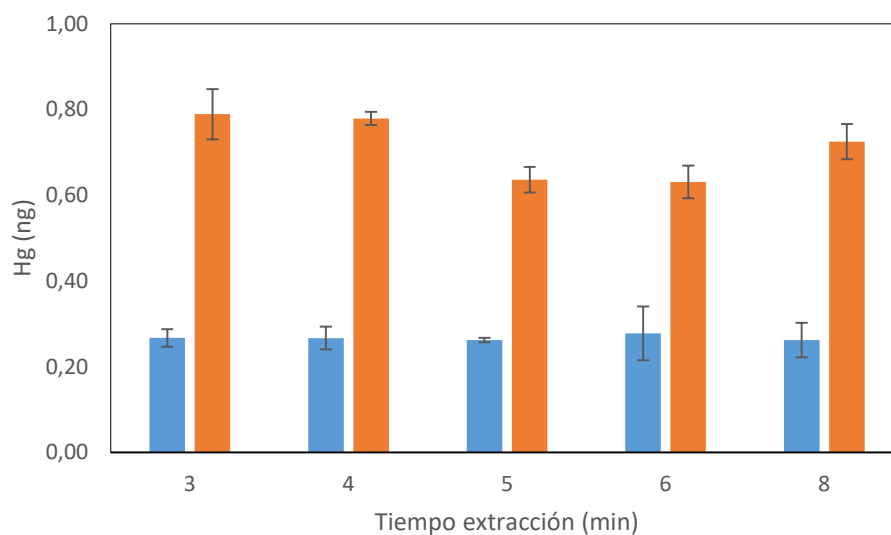


Figura 8. Optimización del tiempo de extracción. En naranja el tiempo para el APDC y en azul para el DDTC.

A la vista de estos resultados se selecciona como agente más adecuado el APDC y el tiempo de vórtice se fija en 4 minutos.

5.1.4. Fuerza iónica

A continuación, se realiza la optimización de la fuerza iónica, mediante la adición de NaCl a la muestra de agua de mar sintética en el rango de 0 a 5 g. Las condiciones experimentales para las otras variables implicadas se indican en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones experimentales para la optimización de fuerza iónica.

Fuerza iónica	Blanco	Muestra
Volumen muestra (mL)	20	20
Vol disolvente extractante (µL)	500	500
Concentración de APDC (mM)	0,125	0,125
[Hg] (µg/L)	-	0,25
Tiempo vórtice (min)	4	4
Velocidad y tiempo centrifuga	3000 rpm / 10 min	3000 rpm / 10 min
pH	3,5	3,5

Como puede verse en la Figura 9, la adición de sal para modificar la fuerza iónica de la muestra no parece ser un factor decisivo en la preconcentración del mercurio, ya que masa de Hg extraída se mantiene casi constante en el rango estudiado. Por lo tanto, no se adicionará sal a las muestras de agua, lo cual simplifica el procedimiento.

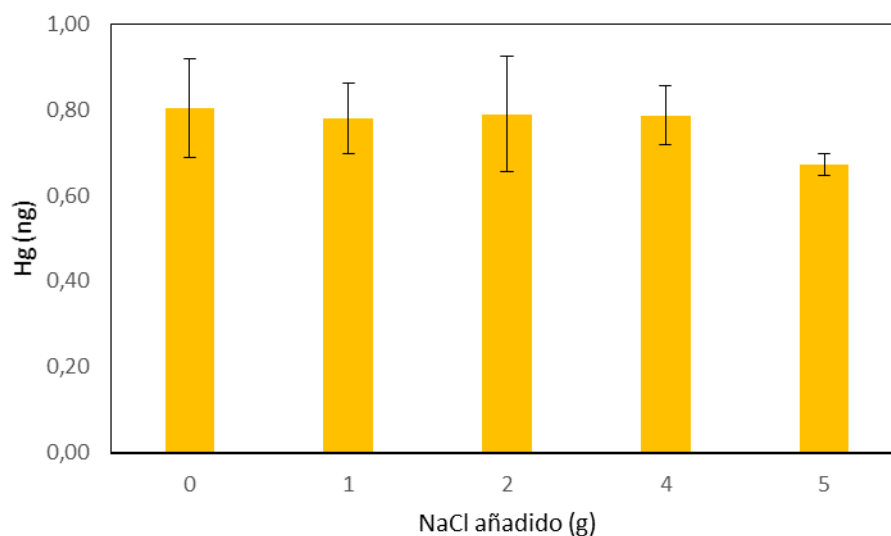


Figura 9. Optimización de la fuerza iónica.

5.1.5. Volumen de disolvente de extracción

Una vez elegido el disolvente de extracción (hexano) se preparan diferentes ensayos donde se optimiza el volumen necesario para que el proceso de extracción sea lo más eficaz posible. Las condiciones experimentales para las otras variables implicadas se indican en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones experimentales para la optimización del volumen de disolvente de extracción.

Volumen extractante	Blanco	Muestra
Volumen muestra (mL)	20	20
Concentración de APDC (mM)	0,125	0,125
[Hg] ($\mu\text{g/L}$)	-	0,25
Tiempo vórtice (min)	4	4
Velocidad y tiempo centrifuga	3000 rpm / 10 min	3000 rpm / 10 min
pH	3,5	3,5

A mayor es volumen de hexano mejora la capacidad de extracción; sin embargo, el analito se encuentra más diluido y por tanto la masa de Hg recuperada es menor (Figura 10). No se ensayaron volúmenes de hexano menores de 300 μL ya que el proceso de recogida de la gota se complica.

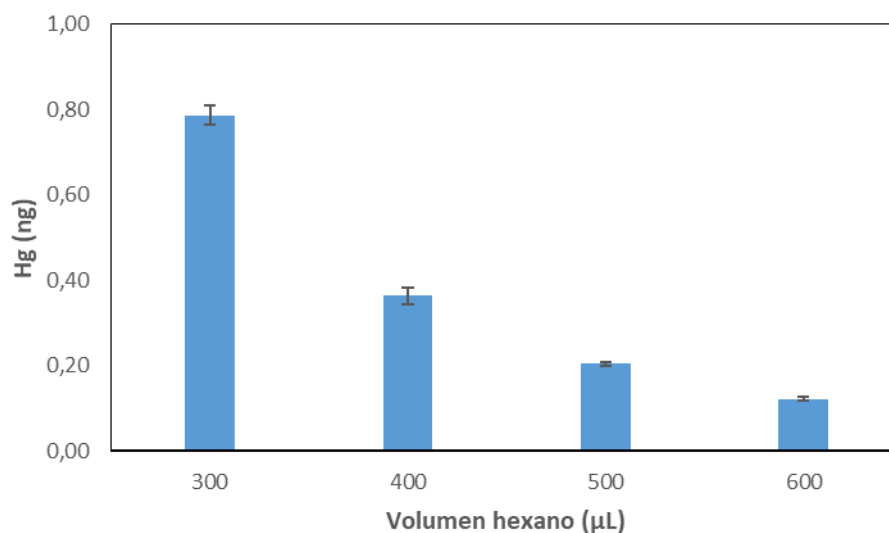


Figura 10. Optimización del volumen de disolvente de extracción.

Por tanto, seleccionamos como volumen óptimo 300 μL de hexano.

5.1.6. Concentración de APDC

Por último, una vez establecidas las condiciones experimentales de los apartados previos, se realiza la optimización de la concentración de APDC. Las condiciones experimentales para las otras variables implicadas se indican en la Tabla 6.

A la vista de la gráfica (Figura 11) los mejores resultados se obtienen para una concentración de 0,125 mM.

Tabla 6. Condiciones experimentales para la optimización de la concentración de APDC.

	Blanco	Muestra
Volumen muestra (mL)	20	20
Vol disolvente Hexano (μL)	300	300
[Hg] (μL)	-	0,25
Tiempo vórtice (min)	4	4
Velocidad y tiempo centrifuga	3000 rpm / 10 min	3000 rpm / 10 min
pH	3,5	3,5

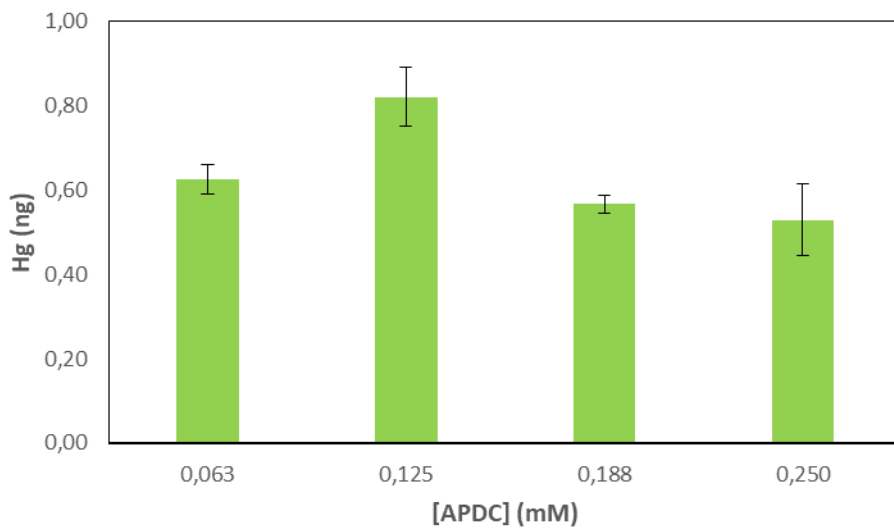


Figura 11. Optimización de la concentración de APDC.

5.2. Características analíticas del método

5.2.1. Rectas de calibrado

Se preparan 5 puntos de calibrado 0 / 0,0625 / 0,125 / 0,250 / 2,5 µg/L a partir de las disolución patrón de 100 µg/L. Se realiza un calibrado con muestra de agua de mar sintética (3 réplicas de cada punto) y un calibrado con agua ultra-pura con (3 réplicas de cada punto). Las rectas obtenidas se muestran en la Figuras 12-13.

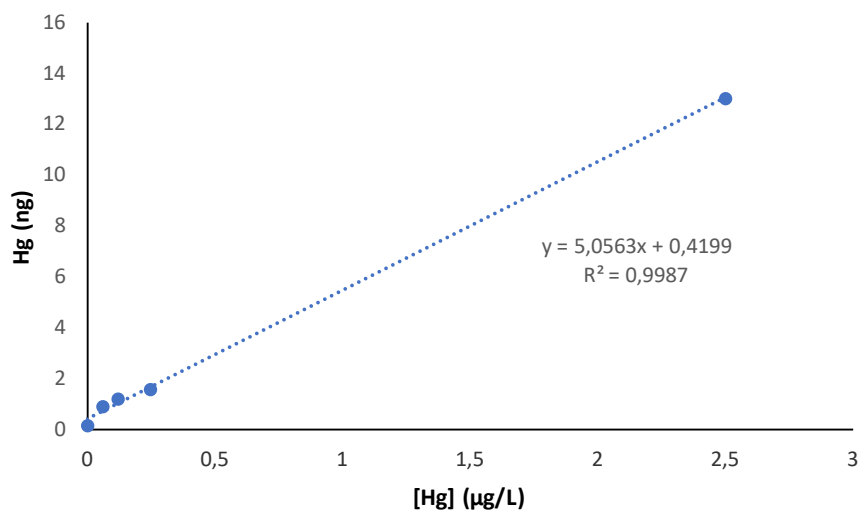


Figura 12. Recta de calibrado con agua de mar sintética

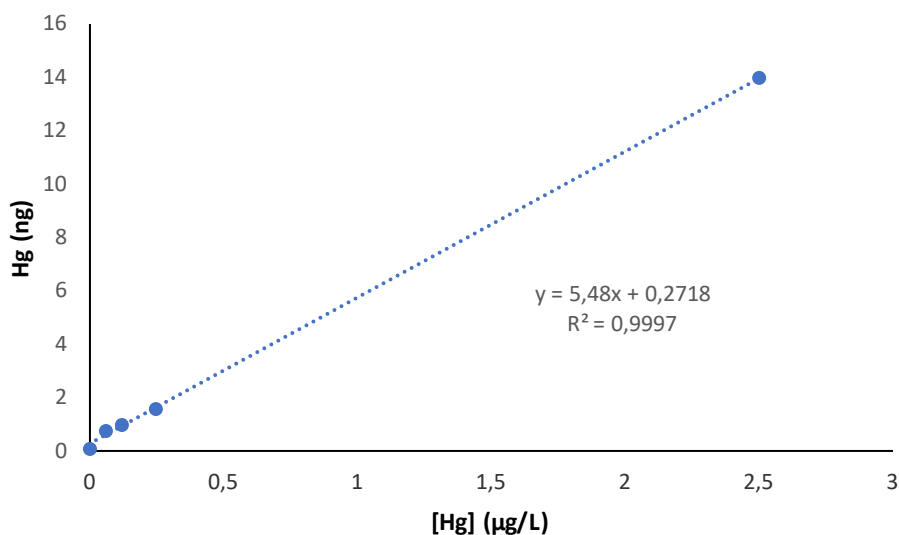


Figura 13. Recta calibrado con agua ultra-pura

Se estudia si las pendientes de ambas rectas son o no similares comprobando si las varianzas de ambas son comparables a través del test de Fischer. La evaluación estadística por aplicación del test F al 95% de confianza para $n_1=3$ y $n_2=3$ grados de libertad, obtiene un valor de F_{cal} (7,73) el cual es menor a la F_{crit} (9,3). Por lo tanto, como las varianzas son comparables se aplica el test t de student, donde la t_{cal} (2.92) es mayor a la t_{crit} (2.45) al 95% para 6 grados de libertad totales, es decir, existe efecto matriz.

5.2.2. Límites de detección y cuantificación

Límite de detección (LD) se trata de la concentración más baja de analito que puede ser detectada por el método a un nivel de confianza específico²⁷.

$$Y = \frac{Y_b + 3 \cdot S_b}{m}$$

Límite de cuantificación (LC) se define como el nivel más bajo de concentración de analito que se puede cuantificar.

$$Y = \frac{Y_b + 10 \cdot S_b}{m}$$

Estas definiciones permiten calcular los límites de detección y cuantificación instrumentales.

Tabla 7. Evaluación de los límites de detección y cuantificación.

LD	24,6 ng/L
LC	30,9 ng/L

Los valores obtenidos son suficientemente bajos para realizar la cuantificación de mercurio en los materiales de referencia y en las muestras.

5.2.4. Exactitud

Se define como la proximidad entre un resultado único y un valor de referencia. Para validar un método analítico hay que investigar este parámetro, que normalmente

engloba dos componentes: la veracidad y la precisión. La veracidad de medida representa la proximidad entre la media de un número infinito de resultados generados por un método a un valor de referencia, sin embargo, no es posible la obtención de un número infinito de medidas. Por lo tanto, únicamente se puede realizar una evaluación práctica de la veracidad, también llamado, sesgo²⁷.

La determinación del sesgo se basa en la comparación de la media de los resultados del método empleado con un valor de referencia adecuado. Existen 3 vías distintas²⁷:

- Análisis de materiales de referencia.
- Experimentos y cálculo de la recuperación.
- Comparación de los resultados con otro método.

Para evaluar la exactitud del método se analizan tres materiales de referencia de agua de mar (NASS-7) y agua de estuario (SLEW-3 y BCR-505). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Evaluación de la exactitud del método.

	NASS-7	SLEW-3	BCR-505
Tipo de agua	Agua de mar	Agua de estuario	Agua de estuario
Valores informativos	0,031 µg/L	- ^a	0,138 µg/L
Concentración medida	0,028 ± 0,0032 µg/L	0,53 ± 0,029 µg/L	0,101 ± 0,012 µg/L
^a Valor no certificado/indicado			

A la vista de la Tabla 8, se puede decir que los resultados de concentración de los materiales de referencia que se analizan concuerdan con el valor informativo para el material BCR-505 y para el valor proporcionado por la bibliografía para el NASS-7 (ref). Para el agua de estuario, SLEW-3, no se encuentra ningún valor de mercurio en la bibliografía, por lo tanto, no se puede realizar la evaluación práctica de la veracidad para este material.

5.2.5. Precisión

Se define la precisión de la medida como el grado de concordancia entre los resultados obtenidos con un determinado nivel de confianza². Se expresa mediante parámetros estadísticos que describen la propagación de los resultados como es la desviación estándar (o la desviación estándar relativa), calculada a partir de los datos obtenidos mediante la realización de mediciones repetidas en un material adecuado en condiciones específicas²⁷.

Tabla 9. Evaluación de la precisión del método.

Materiales de referencia	[Hg] (µg/L)	Promedio ± SD (µg/L)	RSD (%)
NASS-7	0,0250	0,0279 ± 0,0032	11,4
	0,0253		
	0,0302		
	0,0261		
	0,0281		
	0,0311		
SLEW-3	0,5727	0,5343 ± 0,0285	5,3
	0,5099		
	0,5127		
	0,5076		
	0,5406		
	0,5623		
BCR-505	0,1123	0,1014 ± 0,0121	11,9
	0,1012		
	0,1040		
	0,0904		
	0,0872		
	0,1132		

La precisión se suele expresar como desviación estándar relativa:

$$RSD(\%) = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$$

Donde la RSD es la desviación estándar relativa, \bar{X} el promedio de las medidas y S la desviación estándar.

La precisión del método se estudia analizando varios materiales de referencia de agua de mar por sextuplicado. Los resultados obtenidos (Tabla 9) son adecuados (RSD < 12%)

5.3. Aplicación a muestras de agua de mar

Se analizan 5 muestras de agua de mar de la costa de A Coruña, correspondientes a las playas de Riazor, Las Lapas, Oza, Santa Cristina y a la ría del Burgo. Previamente a realizar los experimentos se preparan 5 frascos de 50 mL de cada muestra recogida con pH ajustado a 3,5. Se prepararon por cada muestra 2 réplicas y de cada una se recogen dos volúmenes de 100 µL de la gota. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 10 y Figura 12.

Tabla 10. Concentraciones de Hg obtenidos para las muestras de agua mar.

Muestras	Promedio ± SD (µg/L)	RSD (%)
Riazor	0,172 ± 0,0018	1,0
Santa Cristina	0,124 ± 0,0009	0,69
Oza	0,105 ± 0,006	5,7
Las Lapas	0,091 ± 0,017	11,7
Adormideras	0,114 ± 0,006	5,1
Burgo	0,024 ± 0,004	10,7

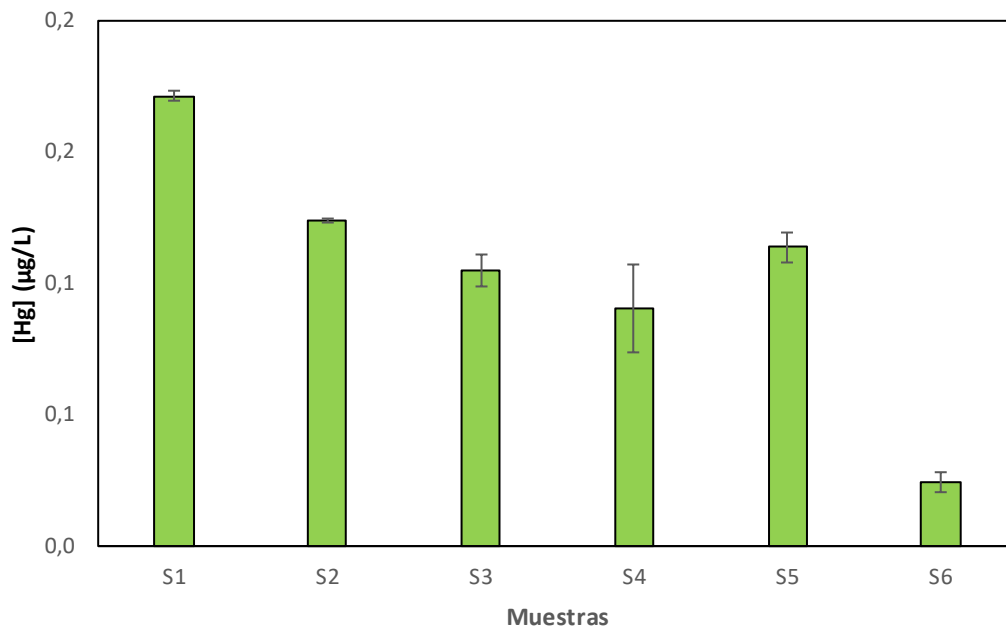


Figura 12. Concentraciones de Hg en las muestras de la costa de A Coruña. S1 playa de Riazor, S2 playa de Santa Cristina, S3 Playa de Oza, S4 playa de las Lapa, S5 ría del Burgo y S6 playa de Adormideras.

A la vista de los resultados se observa que la muestra de agua de mar de la playa de Riazor contiene la mayor concentración de mercurio; por el contrario, la presencia del metal en la playa de Adormideras es la más baja de las 6 muestras. Las concentraciones para las muestras S2, S3, S4 y S5 son similares, varían ligeramente unas con respecto a la otras.

6. Conclusiones

Tras el estudio de este trabajo de fin de grado se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- La técnica de microextracción líquido-líquido asistida por vórtice (VALLME) es innovadora, sencilla y rápida para la preconcentración de metales a nivel ultra-traza como el mercurio; además de ser respetuosa con el medio ambiente y cumplir las bases de la química verde.
- Se realiza un estudio de cada parámetro establecido como prioritario para su optimización y se seleccionan las condiciones del procedimiento que generan mayor eficiencia de extracción. Dichas condiciones se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Condiciones óptimas de extracción

Condiciones optimizadas	
Quelatante	APDC
Disolvente de extracción	Hexano
pH	3,5
Tiempo vórtice (min)	4
Fuerza iónica (g NaCl añadida)	0
Vol hexano (µL)	300
[APDC] (mM)	0,125
Condiciones adicionales	
Volumen muestra (mL)	20
Tiempo centrifuga (min)	10
Velocidad centrifuga (rpm)	3000

- La determinación y cuantificación de mercurio a nivel ultra-traza en muestras de agua de mar mediante espectrometría de absorción atómica (AAS) acoplada a un analizador directo de mercurio es un método de análisis de elevada sensibilidad (LD=24.6 ng/L), exactitud, precisión (<12%), automático, rápido y simple de manejar.

6. Conclusións

Tras o estudo deste traballo de fin de grao pódense establecer as seguintes conclusións:

- A técnica de microextracción líquido-líquido asistida por vórtice (VALLME) é innovadora, sinxela e rápida para a preconcentración de metais a nivel ultra-traza coma o mercurio; ademais de ser respetuosa co medio ambiente e cumprir as bases da química verde.
- Realízase un estudo de cada parámetro establecido como prioritario para a súa optimización e seleccionanse as condicións do procedemento que xeran maior eficiencia de extracción. Ditas condicións mostráanse na Taboa 11.

Tabla11. Condiciones óptimas de extracción

Condicións optimizadas	
Quelatante	APDC
pH	3,5
Tempo vórtice (min)	4
Forza iónica (g NaCl engadida)	0
Vol hexano (μ L)	300
[APDC] (mM)	0,125
Condiciones adicionales	
Volumen mostra (mL)	20
Tempo centrífuga (min)	10
Velocidade centrífuga (rpm)	3000

- A determinación e cuantificación de mercurio a nivel ultra-traza en mostras de auga de mar mediante espectrometría de absorción atómica (AAS) axustada a un analizador directo de mercurio é un método de análise de elevada sensibilidade (LD=24.6 ng/L), exactitud, precisión (<12%), automático, rápido e simple de manexar.

6. Conclusions

The following conclusions can be established from this study:

- The vortex-assisted liquid-liquid microextraction technique (VALLME) is innovative, simple and fast for the pre-concentration of ultra-trace metals such as mercury; also, it is linked to the principles of Green Chemistry.
- Each parameter involved have been optimised, selecting conditions that generate the high extraction efficiency. Optimised conditions are shown in Table 11.

Tabla11. Optimum extraction conditions

Optimized conditions	
Chelating <u>agent</u>	APDC
pH	3,5
Vortex time (min)	4
Ionic strength (g NaCl added)	0
Vol hexane (μ L)	300
[APDC] (mM)	0,125
Additional conditions	
Sample volume (mL)	20
Centrifuge time (min)	10
Centrifuge speed (rpm)	3000

- The quantification of mercury at the ultra-trace level in sea water samples by means of atomic absorption spectrophotometry (AAS) coupled to a direct mercury analyzer is a high sensible (LD=24.6 ng/L), accurate, precise (<12%), automatic, fast and simple-to-handle high procedure.

7. Bibliografía

1. Grecia B, Niño CG. *UNIVERSIDAD SIMÓN BOLÍVAR DECANATO DE ESTUDIOS PROFESIONALES COORDINACIÓN DE QUÍMICA DETERMINACIÓN DE MERCURIO POR GENERACIÓN DE VAPOR FRÍO Y DETECCIÓN VÍA ABSORCIÓN Y FLUORESCENCIA ATÓMICA*. <https://xdoc.mx/documents/determinacion-de-mercurio-por-generacion-de-vapor-frio-y-5c140e1edec1f>
2. Cabo AR. *Direct Mercury Determination in Atmospheric Particulate Matter*.; 2019. <https://sede.udc.gal/services/validation/b5d3qEWvc7Y0Xiixyt8mnw==>
3. Global Mercury Assessment 2018 | UNEP - UN Environment Programme. Accessed July 21, 2022. https://www.unep.org/resources/publication/global-mercury-assessment-2018?_ga=2.152961724.404864122.1658414116-1623320011.1657835083
4. Kudo A, Fujikawa Y, Mitui S M, et al. *History of Mercury Migration from Minamata Bay to the Yatsushiro Sea*.; 2000. <http://iwaponline.com/wst/article-pdf/42/7-8/177/29182/177.pdf>
5. Homepage | Minamata Convention on Mercury. Accessed July 15, 2022. <https://www.mercuryconvention.org/es>
6. Ferreira SLC, Lemos VA, Silva LOB, et al. Analytical strategies of sample preparation for the determination of mercury in food matrices - A review. *Microchemical Journal*. 2015;121:227-236. doi:10.1016/j.microc.2015.02.012
7. BOE.es - BOE-A-2015-9806 Real Decreto 817/2015, de 11 de septiembre, por el que se establecen los criterios de seguimiento y evaluación del estado de las aguas superficiales y las normas de calidad ambiental. Accessed July 21, 2022. <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2015-9806>
8. Martínez Guijarro M^ª Remedios. *Análisis Instrumental: Espectrometría de Absorción Atómica (EAA)*. <https://riunet.upv.es/handle/10251/138418?show=full>
9. Srogi K. Developments in the determination of trace elements by atomic spectroscopic techniques. *Analytical Letters*. 2008;41(5):677-724. doi:10.1080/00032710801934445
10. A. Skoog D, James Holler F, R. Crouch S. *Principios de Análisis Instrumental*. 6ta ed.; 2008.
11. ANALIZADOR DE MERCURIO. Servicios Técnicos de Investigación. Accessed July 11, 2022. <https://sstti.ua.es/es/instrumentacion-cientifica/unidad-de-analisis/analizador-de-mercurio.html>
12. UCM - GRUPO DE INVESTIGACIÓN DETERMINACIÓN DE TRAZAS, ESPECIACIÓN Y PROTEÓMICA. (TrEP). Accessed July 11, 2022. <https://www.ucm.es/determinaciondetrazas/analizador-de-mercurio-dma80>
13. Doria Serrano Ma del C. Química verde: un nuevo enfoque para el cuidado del medio ambiente. *Educación Química*. 2009;20(4):412-420. doi:10.1016/s0187-893x(18)30044-2
14. Jagirani MS, Ozalp O, Soylak M. New Trend in the Extraction of Pesticides from the Environmental and Food Samples Applying Microextraction Based Green Chemistry Scenario: A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. Published online 2021. doi:10.1080/10408347.2021.1874867

15. Hashemi B, Zohrabi P, Kim KH, Shamsipur M, Deep A, Hong J. Recent advances in liquid-phase microextraction techniques for the analysis of environmental pollutants. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2017;97:83-95. doi:10.1016/j.trac.2017.08.014
16. Viera-Santana S, Santana-Rodríguez J. *Técnicas Analíticas Avanzadas Para La Extracción y Preconcentración de Contaminantes Emergentes En Muestras Líquidas.*; 2017.
17. Rezaee M, Assadi Y, Milani Hosseini MR, Aghaee E, Ahmadi F, Berijani S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*. 2006;1116(1-2):1-9. doi:10.1016/j.chroma.2006.03.007
18. Rutkowska M, Owczarek K, Guardia M de la, Płotka-Wasyłka J, Namieśnik J. Application of additional factors supporting the microextraction process. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2017;97:104-119. doi:10.1016/j.trac.2017.09.005
19. Hashemi B, Zohrabi P, Kim KH, Shamsipur M, Deep A, Hong J. Recent advances in liquid-phase microextraction techniques for the analysis of environmental pollutants. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2017;97:83-95. doi:10.1016/j.trac.2017.08.014
20. Jia X, Han Y, Liu X, Duan T, Chen H. Speciation of mercury in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*. 2011;66(1):88-92. doi:10.1016/j.sab.2010.12.003
21. Laosuwan M, Mukdasai S, Srijaranai S. A simple in syringe low density solvent-dispersive liquid liquid microextraction for enrichment of some metal ions prior to their determination by high performance liquid chromatography in food samples. *Molecules*. 2020;25(3). doi:10.3390/molecules25030552
22. Liang P, Kang C, Mo Y. One-step displacement dispersive liquid-liquid microextraction coupled with graphite furnace atomic absorption spectrometry for the selective determination of methylmercury in environmental samples. *Talanta*. 2016;149:1-5. doi:10.1016/j.talanta.2015.11.039
23. Pirsahab M, Fattahi N. Trace determination of heavy metals in farmed trout fish using dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop and graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Analytical Methods*. 2015;7(15):6266-6273. doi:10.1039/c5ay00897b
24. Niazi A, Habibi S, Ramezani M. Preconcentration and simultaneous spectrophotometric determination of copper and mercury by dispersive liquid-liquid microextraction and orthogonal signal correction-partial least squares. *Arabian Journal of Chemistry*. 2015;8(5):706-714. doi:10.1016/j.arabjc.2013.12.014
25. Lei Z, Chen L, Yang S, Wen X. Effects of four organic reagents on non-aqueous phase cold vapor generation of mercury. *Microchemical Journal*. 2017;132:89-92. doi:10.1016/j.microc.2017.01.011
26. Merck | Spain. Accessed July 21, 2022. <https://www.sigmaaldrich.com/ES/es>
27. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods : A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. Accessed July 21, 2022. https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_ES.pdf