

UNIVERSIDAD DE BURGOS
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



PRACTICUM Y COMPLEMENTO AL PRACTICUM

PRÁCTICAS EN LABORATORIO GALENO & VIDAL
ESPECIACIÓN ELECTROQUÍMICA DE CROMO
MEDIANTE VOLTAMPEROMETRÍA DIFERENCIAL DE
IMPULSOS EMPLEANDO ELECTRODOS
SERIGRAFIADOS DE CARBÓN MODIFICADOS CON
NANOPARTICULAS METÁLICAS.

MASTER EN QUÍMICA AVANZADA

ESPECIALIDAD EN PRODUCTOS Y PROCEDIMIENTOS INDUSTRIALES

Autor: Ana Calvo Pérez

Tutor académico: M^a Julia Arcos Martínez / Olga Domínguez Renedo

Departamento de Química, Área de Química Analítica

Línea de Investigación: Sensores electroquímicos

Tutor empresarial: Belén Santamaría

Septiembre de 2009

INDICE GENERAL

PRACTICUM

1.- INTRODUCCIÓN	9
1.1.- COMPONENTES DEL GRUPO VIDAL	9
1.2.- LABORATORIO GALENO & VIDAL	9
1.2.1.- ANÁLISIS	9
1.2.1.1. Ámbito agropecuario	10
1.2.1.2.- Ámbito alimentario y productos de consumo	10
1.2.1.3.- Medioambiental	10
1.2.1.4.- Industrial	10
1.2.2. SERVICIOS	11
1.2.3.- CALIDAD	11
1.2.4.- ORGANIGRAMA	12
2.- ENSAYOS REALIZADOS	14
2.1.- DETERMINACIÓN DE ALMIDÓN	14
2.2.- DETERMINACIÓN DE NITRITOS Y NITRATOS	15
2.3.- DETERMINACIÓN DE HIDROXIPROLINA	16
2.4.- DETERMINACIÓN DE FOSFATOS	17
2.5.- TEST ELISA	18
3.- CONCLUSIONES	25

COMPLEMENTO AL PRACTICUM

1.- INTRODUCCIÓN	31
1.1.- OBJETIVO	31
2.- FUNDAMENTO TEÓRICO	35
2.1.- DETERMINACIÓN DE CROMO A NIVEL DE TRAZAS	35
2.1.1.- ESPECIACIÓN DE CROMO A NIVEL DE TRAZAS	35
2.2.- ELECTRODOS SERIGRAFIADOS	36
3.- PARTE EXPERIMENTAL	43
3.1.- EXPERIMENTAL	43
3.1.1.- REACTIVOS	43
3.1.2.- INSTRUMENTACIÓN	43
3.2.- DETERMINACIÓN DE Cr(III) CON ELECTRODOS SERIGRAFIADOS	44
3.3.- DETERMINACIÓN DE Cr(VI) CON ELECTRODOS SERIGRAFIADOS	45
3.4.- DETERMINACIÓN SIMULTANEA DE Cr(III) y Cr(VI)	46
4.- CONCLUSIONES	53

PRACTICUM

PRÁCTICAS EN LABORATORIO GALENO & VIDAL

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Laboratorios del Grupo Vidal es la marca registrada que engloba a un conjunto de laboratorios propios, asociados y franquiciados, cuyo origen se remonta al año 1976, en el que se creó en Tarragona el “Laboratorio de Análisis Jordi Vidal”. Dicho laboratorio, que en la actualidad figura como laboratorio central del grupo, nació para dar respuesta a la creciente demanda existente en Tarragona y su entorno industrial, de establecimientos especializados en análisis de aguas, tanto de consumo público, como industriales. El laboratorio funcionó y trabajó a título individual, hasta que en el año 1994, se constituye el “Laboratorio Análisis Jordi Vidal S.L.”, donde se aporta todo el activo empresarial ya existente, a la vez que se da entrada en el accionariado a su Director Técnico, Sr. Joan Enric Poll. La creciente demanda de análisis y servicios de control existente en la provincia, motivada por el importante crecimiento portuario, turístico e industrial, hizo que el laboratorio fuese ampliando y consolidando nuevas líneas de trabajo, especializándose en los cuatro ámbitos que hoy ofrece: alimentario, agropecuario, medio ambiente e industrial. Más tarde, el Laboratorio de Análisis Jordi Vidal S.L., en previsión de una futura expansión estatal despersonifica la figura del fundador cambiando el nombre de la sociedad al actual de “Laboratorios Vidal S.L.”

Por último, Laboratorios Vidal S.L., inicia su expansión, creando o auspiciando nuevos laboratorios constituyendo así una nueva sociedad denominada Vidal Servigrup S.A., que se encarga de coordinar a los laboratorios del grupo ya existentes, y a su vez franquiciar a los de nueva creación.

1.1. COMPONENTES DEL GRUPO VIDAL

Este grupo esta compuesto por diez laboratorios:

- *Laboratoris Vidal* (Tarragona)
- *Galeno & Vidal* (Burgos)
- *Analico & Vidal* (Valencia)
- *Sanz & Vidal* (Vigo)
- *Alex & Vidal* (Algeciras)
- *Biocontrol & Vidal* (Sevilla)
- *Atres & Vidal* (Jaén)
- *Multilab & Vidal* (Lorca)
- *Sayci & Vidal* (Zaragoza)
- *Bio-Accali & Vidal* (Madrid)

1.2. LABORATORIO GALENO & VIDAL

Laboratorio Galeno & Vidal, puede definirse como un Laboratorio privado e independiente de análisis químicos y microbiológicos en general, con excepción de los análisis clínicos, que inicio sus actividades en el año 1995 integrado en el Grupo de Laboratorios Vidal. En 2008 el laboratorio pasó a formar parte de Servicios analíticos Agrolab Spain S.L. quienes poseen el 70% del accionariado de la empresa convirtiéndose en socios mayoritarios.

1.2.1. ANÁLISIS

Este laboratorio ofrece servicios de control y análisis de tipo químico, físico-químico, microbiológico y organoléptico. Estos análisis se aplican en diferentes campos, como son: alimentos y productos de consumo, agropecuario, medioambiente e industrial.

El laboratorio realiza sus actividades de ensayo conforme a los requisitos de la norma ISO 17025 y es su objetivo satisfacer las necesidades de los clientes, de las autoridades reguladoras o de las organizaciones encargadas de su reconocimiento.

El sistema de gestión del laboratorio abarca los trabajos realizados en sus instalaciones permanentes y, en su caso, aquellos realizados en otro tipo de instalaciones.

Los grupos de productos sobre los que se realizan análisis actualmente son:

1.2.1.1. Ámbito agropecuario

- Piensos y piensos compuestos
- Cereales y subproductos
- Harinas panificables
- Tapioca
- Semillas y sus raíces
- Aceites y grasas
- Harina de pescado, carne y huesos
- Productos lácteos
- Minerales y premezclas
- Suelos y fertilizantes
- Harina de carne

1.2.1.2. Ámbito alimentario y productos de consumo

- Aguas de consumo y envasadas
- Pastas alimenticias
- Pastelería y confitería
- Vinos y bebidas alcohólicas
- Embutidos y fiambres
- Huevos y ovoproductos
- Frutos secos
- Control higiénico de los productos alimenticios
- Análisis de productos higiénicos
- Análisis de cosméticos
- Control de calidad físico-químico, microbiológico
- Control de servicios de catering
- Miel
- Productos lácteos

1.2.1.3. Medioambiental

- Aguas residuales y caracterización de vertidos
- Residuos industriales y su caracterización
- Análisis del aire en el interior de recintos y de emisiones industriales
- Análisis de aguas de piscinas y de aguas de riego

1.2.1.4. Industrial

- Pureza de disolventes y sus contaminantes
- Plaguicidas y pesticidas
- Aleaciones y metales pesados
- Determinación y riqueza de principios activos

1.2.2. SERVICIOS

Laboratorio Galeno & Vidal ofrece multitud de servicios al público, que van desde un control de calidad contratado, incluyendo recogida de muestras y muestreos, así como cualquier tipo de asesoría técnico-legal o asesoría y consultoría en sistemas de calidad, análisis de peligros y puntos críticos de control (APPCC). Dentro de estos análisis, también desarrollan los procedimientos, especificaciones o fichas técnicas requeridas en cada caso. Sin olvidar, la asesoría nutricional, para la cuál realizan estudios comparativos e incluso se encargan de la formación de manipuladores de alimentos.

Por otro lado, se encargan de la caracterización de vertidos y residuos, realizando también en este caso estudios comparativos, incluyendo de la misma manera y sí es necesaria la formación mediante seminarios para los profesionales. Se encargan además del control de E.D.A.R., de la elaboración de fichas técnicas de productos, así como de la actuación como peritos de parte en análisis contradictorios, y el registro legal de productos alimentarios.

No obstante, además de todos estos servicios, en los últimos años han incluido además programas de mantenimiento y tratamiento de instalaciones de alto riesgo para la prevención de la legionelosis. Así como, estudios de envejecimiento en productos alimentarios, e incluso, asesoría en la elaboración de etiquetado nutricional.

En cuanto al medioambiente han incluido la caracterización de emisiones e inmisiones, la gestión de permisos de vertido, la cumplimentación de DUCA'S y de otros documentos administrativos, el control ambiental en Higiene industrial (Prevención de Riesgos), e incluso la detección y determinación de olores industriales, consiguiendo así un rango mayor de servicios tanto en rangos nutricionales, como de consultoría e inclusive en medio ambiente.

1.2.3. CALIDAD

La mayoría de los Laboratorios del Grupo Vidal poseen el máximo sello de calidad en forma de acreditación por ENAC (Entidad Nacional de Acreditación), según la norma ISO/IEC 17025. ENAC, es un organismo de reconocimiento y prestigio internacional, por ello, estando acreditados por dicha entidad aseguran que los resultados de su alcance tienen validez, no tan solo a nivel nacional, sino también a escala internacional y aportan a sus clientes el prestigio y reconocimiento de su empresa y de sus productos.

A diferencia de la certificación según la norma ISO 9001, que es la confirmación de que se ha establecido un sistema de calidad conforme con ciertos requisitos, la acreditación de acuerdo a la norma ISO/IEC 17025 confirma la competencia técnica del laboratorio y garantiza la fiabilidad de los resultados en los laboratorios de ensayo y calibración. Con el objetivo de obtener resultados correctos y comparables se evalúa de forma periódica y programada la calidad de los ensayos.

El procedimiento para este control de calidad interno incluye diferentes técnicas como el análisis de materiales de referencia y cálculo de la exactitud, la validación de los métodos analíticos y la participación en ejercicios de comparación interlaboratorio. Además de la calidad aplicada a los ensayos, para ofrecer un servicio respetuoso con el medio ambiente, los Laboratorios Vidal están en vías de implantación y certificación de la norma UNE-EN-ISO 14001:2004.

Además conscientes del impacto ambiental, siempre que es posible intentan reducir la cantidad de los residuos y/o su toxicidad.

1.2.4. ORGANIGRAMA

En la figura siguiente podemos observar el organigrama correspondiente al Laboratorio Galeno & Vidal (Fig. 1):

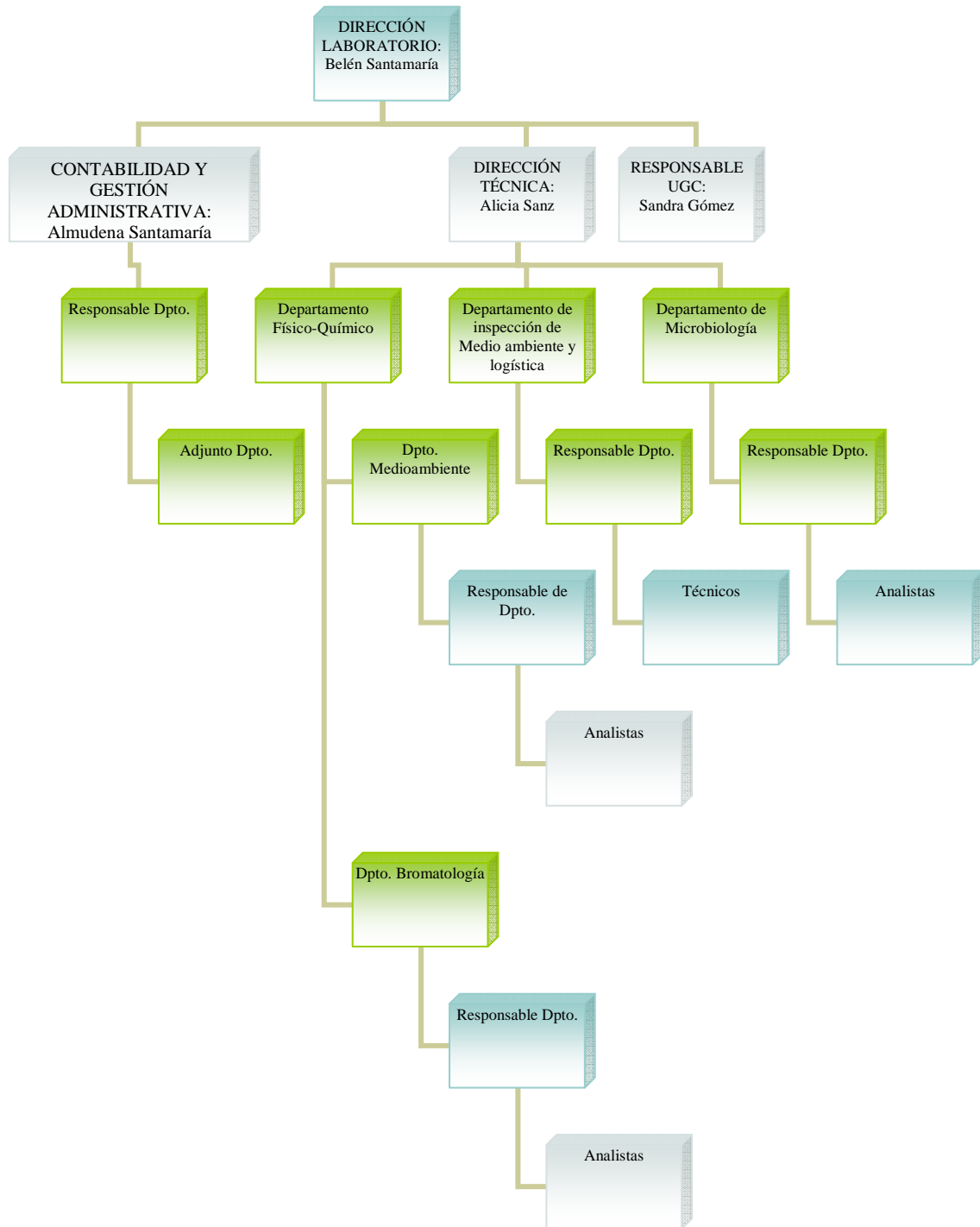


Fig. 1: Organigrama del Laboratorio Galeno & Vidal

ENSAYOS REALIZADOS

2. ENSAYOS REALIZADOS

Un paso previo al análisis de las muestras sólidas que llegan al laboratorio es la trituración o picado de las mismas con el objetivo de homogeneizarlas.

2.1. DETERMINACIÓN DE ALMIDÓN

Los almidones proporcionan propiedades funcionales a los alimentos, ya que ellos sirven para mejorar la textura, impartir viscosidad, ligar agua, proveer cohesión, y mantener la tolerancia al proceso necesaria y requerida para la manufacturación. La determinación del porcentaje de almidón de una muestra de carne se realiza mediante espectrofotometría de absorción molecular en el visible.

El proceso experimental desarrollado es el siguiente:

- Se pesan entre 2 y 3 gramos de muestra picada, sobre la que se realizan varias extracciones mediante centrifugación con una mezcla etanol-éter (1:3), eliminando en cada caso el sobrenadante.
- A continuación se realizan varias extracciones también mediante centrifugación con etanol al 80% caliente, eliminado también en este caso el sobrenadante.
- Seguidamente se realizan diferentes lavados del residuo sólido con mezclas de agua y ácido perclórico al 52% con el que se extrae el almidón y se consigue desechar las grasas y azúcares simples de la muestra. De tal forma que se recoge el residuo en un matraz aforado, que se enrasa a un volumen adecuado, y se filtra, de este filtrado se prepara una dilución. De este modo, la muestra ya está preparada para su posterior medida mediante espectrofotometría.

Para realizar las medidas es necesario realizar un calibrado. Los patrones de calibrado se preparan a partir de glucosa anhidra. Para medir las muestras se lleva a cabo el siguiente proceso:

- Se toman 5ml de cada una de las muestras y de cada patrón de calibrado en diferentes tubos de ensayo.
- En otro tubo de ensayo se toman 5ml de agua destilada, que actúa como blanco.
- Se añaden a cada uno de estos tubos 10 ml del reactivo colorimétrico (sulfúrico-antrona).
- Los tubos se introducen durante un breve espacio de tiempo en baño de agua hirviendo. De este modo se forma un complejo coloreado que absorbe a 630 nm (varía desde el amarillo para las muestras menos concentradas, hasta el verde para aquellas con mayor porcentaje de almidón (Fig. 2)).

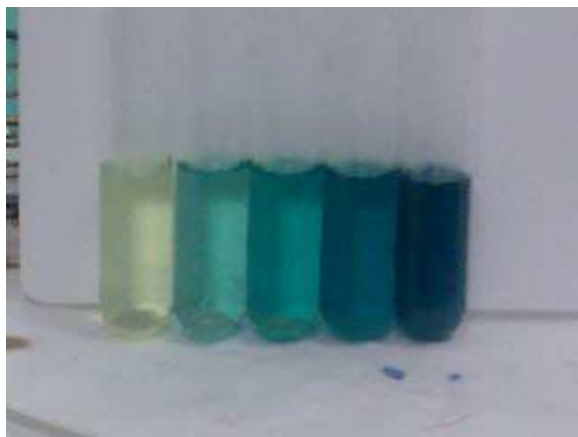


Fig. 2: Rango de colores para el calibrado

A partir del porcentaje de glucosa medido mediante el procedimiento descrito se calcula el porcentaje de almidón de la muestra.

2.2. DETERMINACIÓN DE NITRITOS Y NITRATOS

El uso de los nitritos y nitratos como aditivos conservadores es imprescindible en la elaboración de derivados cárnicos, bien por su acción antimicrobiana bien por su efecto curante sobre este tipo de alimentos. No obstante, el contenido de nitritos y nitratos debe ser controlado por su posible toxicidad debido a la formación de nitrosaminas. La determinación de estas especies se lleva a cabo en distintos alimentos siendo las carnes y los quesos los productos más analizados.

Los nitritos y nitratos se determinan mediante espectrofotometría de absorción molecular en el visible. En el caso de los nitratos se obtienen a partir de los nitritos por medio de una reducción con cadmio.

Con el objetivo de determinar el contenido en nitritos es necesario preparar las muestras. Para ello se disuelven las muestras en borax y agua caliente (se agitan y se mantienen en baño de agua hirviendo). Tras refrigerar, se le añaden los reactivos Carrez correspondientes, y se pasa a filtrar la muestra para eliminar los posibles restos de muestra que no se hayan disuelto. De esta forma se tienen las muestras de los nitritos preparadas. A continuación se deben someter las muestras a un proceso de reducción para obtener los nitratos, para ello se emplea una columna rellena con cadmio (Fig. 3).

El primer paso es dejar pasar por la columna una solución de EDTA-NH₄Cl de forma que se reduce el cadmio contenido en la columna, tras pasar esta solución se pasa agua caliente para eliminar los posibles restos de la solución anterior en la columna. En este momento se pasa la muestra, reduciéndose así los nitritos a nitratos, y oxidándose el cadmio. Entre muestra y muestra siempre ha de pasarse agua caliente, la solución de EDTA y cloruro amónico (para reducir de nuevo el cadmio), y el agua caliente para limpiar. Para medir el contenido de nitratos y nitritos se utiliza el calibrado disponible en el propio instrumento. Para verificar dicho calibrado es necesario preparar un patrón de concentración conocida, de NaNO₂ en el caso de los nitritos y de KNO₃ para los nitratos. De nuevo se emplea agua como blanco para leer las absorbancias correspondientes.



Fig. 3: Columna de Cd

Para llevar a cabo las medidas espectrofotométricas se toma un volumen de 10ml de cada muestra, del blanco y de los patrones. A continuación se añaden 10ml del reactivo colorimétrico (ácido sulfanílico, cloruro sódico, naftilamina y ácido acético glacial, disueltos en agua destilada). Así se forma un complejo coloreado rosáceo (Fig. 4) que ha de mantenerse 20 minutos en oscuridad antes de leer en el espectrofotómetro a 520 nm.

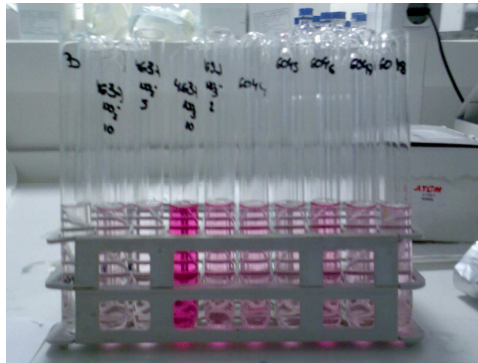


Fig. 4: Rango de colores para el calibrado

2.3. DETERMINACIÓN DE HIDROXIPROLINAS EN CARNES

La hidroxiprolina es un aminoácido abundante en el colágeno. Es una proteína copiosa en los tejidos conjuntivos (nervios y tendones), las partes cárnicas de más baja calidad nutritiva y comercial. Este parámetro se emplea para determinar la calidad proteica de los distintos derivados cárnicos (embutidos, salchichas o hamburguesas), ya que sirve para conocer la relación colágeno/proteína. El porcentaje de colágeno en relación con el de proteína libre de colágeno indica la calidad de los derivados cárnicos: cuanto mayor sea la relación colágeno/proteína, de peor calidad es la carne empleada, y viceversa, a menor porcentaje, mayor calidad de la carne. En este caso la determinación se realiza también por espectrofotometría de absorción molecular en el visible.

Se pesan 3 g. de muestra picada en un papel, junto con piedra pómez que se introducen en un matraz erlenmeyer esmerilado junto con 20-25 mL de HCl al 50%(v/v). Esta mezcla se mantiene en reflujo con ebullición suave durante 7 horas (Fig. 5).



Fig. 5: Sistema de reflujo

Tras el reflujo ha de refrigerarse con agua y ajustar el pH entre 6 y 7, con NaOH. Una vez ajustado el pH, la mezcla se deja en reposo durante un tiempo. Después se filtra y se realizan diluciones de la misma.

En este ensayo sí es necesario realizar la curva de calibrado, que se prepara a partir de una disolución madre de hidroxiprolina. Además como blanco se emplea agua destilada.

Ya preparado el calibrado, se añade a cada uno de los patrones, blanco y muestras una serie de reactivos:

- isopropanol
- solución oxidante (Cloramina T y tampón fosfato pH 6)
- Se agitan y se deja reposar durante 10 minutos
- ácido perclórico al 17.5%
- p-DMAB al 5% (preparada reciente e inicialmente)
- Homogeneizar en Vortex
- Introducirlos en baño de agua a 60°C
- Enfriar
- Añadir isopropanol, y así se forma un complejo coloreado, que absorbe a 560nm (varía de naranja a rosa)

De tal forma que gracias al calibrado se obtiene directamente la concentración de hidroxiprolina de las muestras.

2.4. DETERMINACIÓN DE FOSFATOS EN CARNES

En general se determinan en embutidos, ya que la principal función de los fosfatos es el incremento de retención de humedad de las proteínas. Los fosfatos permiten que la carne retenga la humedad durante la cocción, por lo que el producto no perderá demasiado peso durante este proceso y ello proporciona un beneficio importante al productor de embutidos. De nuevo se determinan mediante espectrofotometría de absorción molecular en el visible.

Para su determinación es necesario pesar unos 2 gramos de muestra picada, que junto con una pequeña cantidad de selenio, ácido sulfúrico y unas perlas de vidrio, se colocan en un tubo de digestión. En este tubo se mantienen 12 horas en reposo (Fig.6).



Fig. 6: Tubos digestores

A continuación se añade agua oxigenada y se realiza la digestión mediante un aumento progresivo de la temperatura desde 200°C a 420°C. Finalmente se mantiene durante 2 horas a 420°C. Tras este tiempo se obtiene un líquido incoloro y transparente. Este líquido se transvasa a un matraz, y se filtra empleando carbón activo para eliminar alguna posible coloración amarillenta del mismo. De este filtrado se toman 10 ml de muestra en un matraz aforado al que se añaden 10 ml de H₂SO₄ al 10%, y 20mL del reactivo colorimétrico y se enrasa con agua destilada. Este reactivo colorimétrico (NH₄VO₃, (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, ácido nítrico, sulfúrico y agua destilada) forma un complejo coloreado que absorbe a 436 nm (amarillo), longitud de onda a la que se medirá posteriormente. De nuevo, no es necesario realizar una recta de calibrado. De nuevo es necesario validar el calibrado disponible en el aparato de medida empleando 10 mL de un patrón de concentración conocida de fosfato al que se le añaden la misma serie de reactivos. Como blanco se toman 10ml de agua destilada a los que también se añaden los reactivos citados anteriormente.

2.5. TEST ELISA

Este tipo de test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), son test basados en reacciones antígeno-anticuerpo, donde el anticuerpo tiene afinidad por una sustancia de interés. Generalmente son pruebas relativamente exactas, sumamente sensibles y específicas. En este laboratorio en concreto se emplean para detectar aflatoxinas M1 y totales, histaminas y ocratoxinas. Todos ellos vienen preparados en kits donde se encuentran cada uno de los reactivos necesarios en el ensayo, que varían en función de la sustancia a determinar, pero generalmente son del tipo que se muestra en la Fig. 7.



Fig. 7: Ejemplo de kit de un Test Elisa

A continuación se describen por separado las moléculas para las que se realiza estos análisis:

- **Aflatoxinas totales**

Las aflatoxinas son micotoxinas producidas por muchas especies del género de hongos *Aspergillus*, los más notables son *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus parasiticus*. Estos hongos se forman en áreas húmedas y tropicales. Las aflatoxinas son tóxicas y carcinogénicas para animales y humanos. Tras la entrada al cuerpo, las aflatoxinas se metabolizan por el hígado con un reactivo intermedio, la

aflatoxina M1. Se miden principalmente en cereales. A continuación se muestran diferentes estructuras de las mismas (Fig. 8):

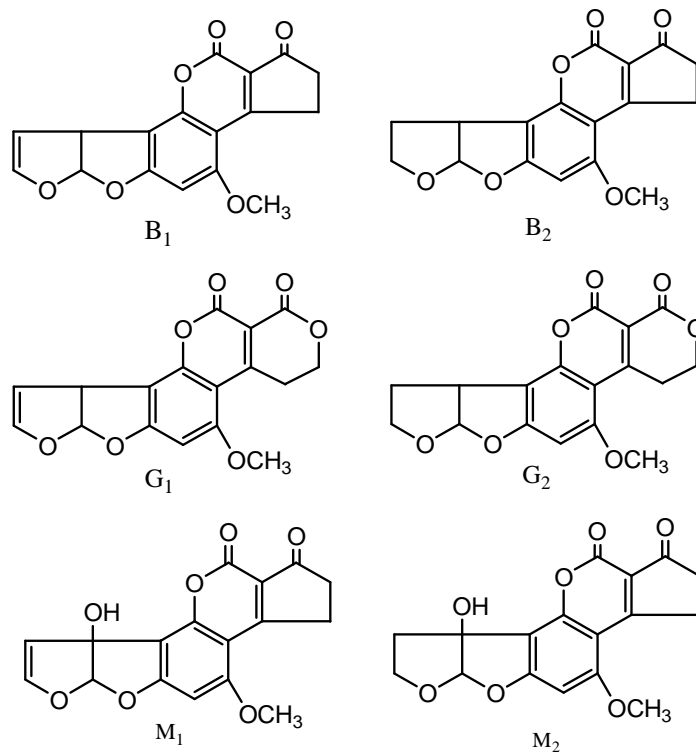


Fig. 8: Estructuras de las aflatoxinas más comunes

▪ Aflatoxina M1

La aflatoxina M1 es el metabolito hidroxilado de la aflatoxina B1. Las fuentes principales de aflatoxinas en la alimentación son los cacahuetes, el maíz y la semilla de algodón.

▪ Ocratoxina A

La Ocratoxina A (Fig. 9) es un metabolito nefrotóxico y nefrocarcinogénico, producido por los hongos *Penicillium verrucosum* y *Penicillium viridicatum* en climas fríos y templados y por distintas especies de *Aspergillus* como la *A. ochraceus* en climas cálidos y tropicales.

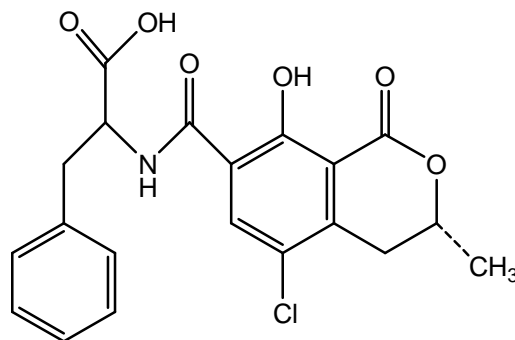


Fig. 9: Estructura química de la Ocratoxina

La ocratoxina A puede encontrarse en varios cereales y otros productos de planta, como café, y frijoles, además de en vino y piensos.

▪ Histamina

La histamina (Fig. 10) ingerida se destoxifica en el tracto intestinal por al menos dos enzimas, la diamina oxidasa (DAO) y la histamina N-metil transferasa (HMT). Este mecanismo de protección puede inhibirse si la ingestión de histamina y/o otras aminas biógenas es muy alta, o si las enzimas son bloqueadas por otros compuestos. La histamina como otras aminas biogénicas es indicador de la calidad del pescado (ya que se forma en él de forma *post mortem*) La acción proteolítica de las catepsinas causa la degradación de la proteína de pescado a aminoácidos y bajo la acción de descarboxilación bacteriana se forman compuestos aminos no volátiles como histamina, putrescina, tiramina y esparmina.

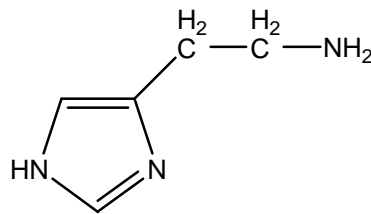


Fig.10: Estructura química de la Histamina

Los principales productos implicados suelen ser los pescados y los quesos, aunque también aparecen en los vinos y en los embutidos. Las bacterias productoras de histamina son ciertas *Enterobacteriaceae*, algunos *Vibrio sp.*, unos pocos *Clostridium*, *Lactobacillus sp.* y también la *Salmonella sp.*

A continuación se describe el proceso de determinación de las moléculas descritas anteriormente. Este procedimiento es similar en todas ellas variando ligeramente de unas a otras.

Los kits de análisis incluyen unos "pocillos" cuyas paredes están cubiertas con anticuerpos de captura específicos para cada antígeno. Sobre estos mismos pocillos se añade una pequeña cantidad de muestra, que posee se supone los antígenos, y una pequeña cantidad de enzima conjugado, que favorece la formación del complejo antígeno-anticuerpo.

Tras un tiempo de incubación para que esta unión tenga lugar, se realiza un lavado de los pocillos, empleando una solución de lavado contenida en el kit, con el objetivo de eliminar los restos de enzima conjugado y de antígeno que no ha reaccionado con los anticuerpos existentes ya en el pocillo.

Tras el lavado, se añade el sustrato correspondiente a cada uno de los pocillos, que actúa como cromógeno, dando un color azulado al complejo formado, para ello se requiere de nuevo un tiempo de incubación, ya que cuanto mayor sea la cantidad de complejo formado, mayor será el tono azulado que tome la muestra.

El último paso es añadir una solución de parada, que generalmente es ácido sulfúrico, que de nuevo genera un cambio de color de azul a amarillo. Este complejo absorbe a 450nm (amarillo), de tal forma que la absorción es inversa a la concentración de antígeno en la muestra, cuánto mayor absorbanancia, menor será la concentración de este en la muestra (Fig.11).

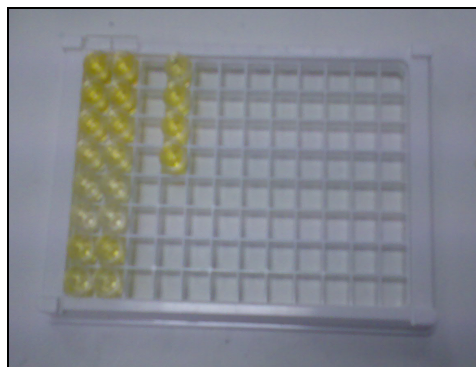
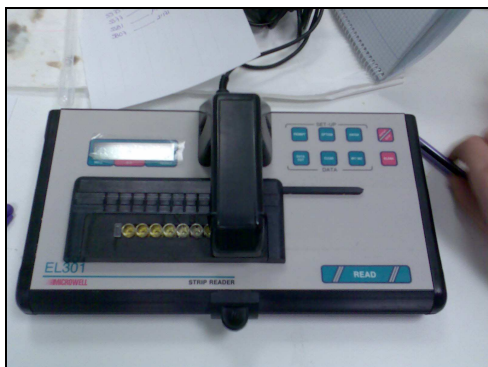


Fig. 11: Imagen del complejo coloreado formado, junto al espectrofotómetro empleado para la medida.

CONCLUSIONES

3. CONCLUSIONES

El período de prácticas en el Laboratorio Galeno & Vidal ha sido muy gratificante tanto a nivel profesional como personal. Ya que estas prácticas me han permitido adquirir nuevos conocimientos y experiencias que contribuirán en mi desarrollo posterior.

A lo largo de este período han sido varias las técnicas empleadas en el laboratorio, algunas de las cuales ya conocía o incluso había tenido la oportunidad de llevar a cabo; y otras tantas desconocidas hasta entonces para mí. Pasó a enumerar la variedad de técnicas empleadas durante el período de prácticas:

- Extracción por centrifugación
- Reducción por paso en columna
- Reflujo con ebullición
- Homogenización en Vortex
- Digestión
- Filtración
- Filtración con carbón activo
- Test Elisa
- Absorción espectrofotométrica de UV

Cabe destacar lo importante que ha sido para mí el poder integrarme en un equipo humano de trabajo. Considero que es única y exclusivamente en una empresa donde esta etapa de formación puede desarrollarse con mejor resultado.

COMPLEMENTO AL PRACTICUM

ESPECIACIÓN ELECTROQUÍMICA DE CROMO
MEDIANTE VOLTAMPEROMETRÍA DIFERENCIAL
DE IMPULSOS EMPLEANDO ELECTRODOS
SERIGRAFIADOS DE CARBÓN MODIFICADOS
CON NANOPARTICULAS METALICAS

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Existe en la actualidad una demanda creciente, por parte de los gobiernos y centros de investigación sobre contaminación ambiental, de metodología analítica rápida y fiable para medir aquellos elementos -en sus formas químicas- que sean esenciales o tóxicos para la salud de los seres humanos o de los ecosistemas¹. Sabemos que la contaminación del medio ambiente por diversas cantidades de metales, a menudo a nivel de trazas, provenientes tanto de fuentes naturales como antropogénicas es algo actualmente habitual. En el caso particular del cromo, la especie en grado de oxidación (III) en ciertas dosis es esencial para la vida del ser humano, y su deficiencia se trata con fármacos o suplementos dietarios. Sin embargo, la especie en grado de oxidación (VI), por su capacidad de traspasar membranas celulares, es tóxica y se ha comprobado su carcinogenicidad, de tal manera que está demostrado que su inhalación a nivel de trazas metálicas puede presentar efectos adversos para la salud.

La contaminación por cromo se debe principalmente, al extensivo uso de dicho metal en metalurgia, curtido de pieles, electroplatinado, industrias madereras, y otras industrias, que tienen todas ellas en común como resultado, la contaminación del agua. Es bien conocido, que ambas especies pueden coexistir en aguas naturales y efluentes, dependiendo de las características redox y pH del medio. La problemática de su determinación analítica radica en que la manipulación y tratamiento previo de la muestra, pueden producir cambios en la relación entre ambas especies químicas, y que dadas las bajas concentraciones que deben determinarse de ambas especies no son muchos los métodos que permitan su cuantificación con la sensibilidad y reproducibilidad necesarias. Algunos cumplen con estos requisitos pero suelen consumir mucho tiempo o requieren de equipamiento de elevado coste.

Uno de los ámbitos de mayor interés en el campo de la química analítica es el análisis medioambiental, debido a que hay que asegurar y mantener la calidad, ya sea del aire o del agua para que su composición no comporte ningún peligro para la salud de los seres vivos, los diferentes procesos industriales han contribuido a mejorar la calidad de vida, pero pueden producir subproductos que si son introducidos directa o indirectamente en el agua causan serios problemas de contaminación. De este modo, es necesario el tratamiento de una gran cantidad de desechos industriales, los cuales requieren una continua minimización. El cromo es un elemento ampliamente usado en la industria y por ello su determinación tiene gran importancia medioambiental. Debido a que la especie de Cr(VI) presenta elevada toxicidad y es considerado un agente cancerígeno, mientras que el Cr(III) resulta ser esencial, el desarrollo de métodos que permitan la determinación de ambas especies en una misma muestra se hace necesario. Entre estos métodos se encuentran los electroquímicos.

Las técnicas electroquímicas suponen actualmente una clara alternativa en el análisis de metales a nivel de trazas. Efectivamente unido a sus claras ventajas en cuanto a coste de instrumentación, es bien conocida la alta sensibilidad que se puede alcanzar en el análisis de muchos metales mediante técnicas electroquímicas.

1.1. OBJETIVO

El objetivo principal de este trabajo es el desarrollo de un método que permita la determinación simultánea de Cr(III) y de Cr(VI) en una misma muestra mediante voltamperometría diferencial de impulsos. Por ello, se pretende generar dos tipos de sensores electroquímicos basados en electrodos serigrafados modificados. Uno de los cuales, será sensible a la concentración de Cr(III) y el otro a la de Cr(VI).

¹ <http://www4.inti.gov.ar/gd/jornadas2000/cequipe-101.htm>

FUNDAMENTO TEÓRICO

2. FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1. DETERMINACIÓN DE CROMO A NIVEL DE TRAZAS

Existen en la bibliografía un gran número de referencias sobre trabajos, que describen distintas técnicas para la determinación de cromo, lo que da cuenta del enorme interés por este elemento en el campo del análisis químico.

Entre las técnicas analíticas más utilizadas en la determinación de cromo se encuentran las técnicas espectrofotométricas de ultravioleta visible^{2,3} y las técnicas de absorción atómica⁴, además de algunas técnicas electroquímicas como la voltamperometría de preconcentración anódica⁵ o la polarografía⁶.

2.1.1. Especiación de cromo a nivel de trazas

Existen grandes dificultades en la actualidad para llevar a cabo la especiación de elementos con distinto grado de oxidación, y en especial, para el caso del cromo. Tal y como se ha descrito anteriormente, el cromo es un metal, del cual interesa conocer la concentración de cada uno de sus grados de oxidación, debido a la especial toxicidad del (CrVI) frente al carácter beneficioso del Cr(III). Añadiendo además el uso excesivo del cromo en la industria que se libere posteriormente como residuo al medioambiente.

A pesar de que son muchas las referencias bibliográficas dedicadas a la determinación de cromo, son muy pocas las que hacen referencia a la especiación de dicho metal. De tal manera que no existe hasta la fecha, ningún trabajo publicado que detalle el desarrollo de un método sencillo para la determinación simultánea de ambas especies de cromo. Aunque sí es posible encontrar trabajos que describen la especiación de este metal empleando técnicas electroquímicas, pero mediante métodos complejos que requieren de técnicas de calibración multivariante y que emplean complejantes como el PCV (piracotocol violeta)^{7,8}.

Dentro de la bibliografía analizada sobre este tema, se ha encontrado que generalmente la especiación de cromo cuando se realiza por medidas electroquímicas, se realiza en varias etapas. De tal manera, que en una primera etapa se determina el contenido de Cr(VI) mediante voltamperometría diferencial de impulsos de redisolución absorbiva (DPAdSV). Y en una segunda etapa se oxida la muestra para transformar todo el cromo en Cr(VI), que se determina de nuevo por DPAdSV, de esta forma por diferencia se calcula el contenido en Cr(III).

Son muy pocos los trabajos que determinan de forma específica una de las especies empleando electrodos fabricados de modo que sólo una de las especies de cromo resulte electroactiva^{9,10}. Por este motivo, en el trabajo que se describe, se planteó como objetivo el desarrollar dos electrodos diferentes sensibles cada uno de ellos a un estado de oxidación del cromo, de forma que para una misma muestra, y empleando ambos electrodos la vez, pudiese lograrse la especiación del contenido de cromo de la muestra.

² Kamburova m., *Mikrochimica Acta*, 128 (1998) 177

³ Zhang M., Zhang Q., Fang., Lei Z., *Talanta*, 48 (1999) 369

⁴ F. Ahern, J.M. Eckert, N.C. Payne y K.L. Williams, *Anal. Chim. Acta*, 175, 147 (1985)

⁵ S. T. Crossman y T.R. Mueller, *Anal. Chim. Acta*, 75, 199 (1975)

⁶ R. Fuoco y P. Papoff, *Anal. Chim. Acta*, 65, 155 (1975)

⁷ O. Domínguez, M.J. Arcos. *Electroanalysis* 2000, 12, No. 6

⁸ O. Domínguez, M. Julia Arcos. *Analytica Chimica Acta* 470 (2002) 241–252

⁹ Cox J. A. y Kullcsza, P. J., *J. Electroanal. Chem.*, 159 (1983) 337-346

¹⁰ Cox J. A. y Kullcsza, P. J., *Anal. Chim. Acta*, 154 (1983) 71-78

2.2. ELECTRODOS SERIGRAFIADOS

El problema más común de las técnicas electroquímicas que emplean los electrodos sólidos convencionales es la falta de reproducibilidad de los resultados, lo que fundamentalmente se debe a la dificultad de tener superficies electródicas exactamente iguales para cada medida. Los electrodos de gota de mercurio son los que han presentado menores problemas en este sentido, pero su toxicidad justifica la búsqueda de otras alternativas. Las posibilidades de estas técnicas pueden mejorarse en determinados casos por la sustitución de los clásicos electrodos y celdas por dispositivos serigrafiados desechables. Esta metodología presenta varias ventajas:

- Permite disponer de electrodos idénticos, por lo que se mejora la reproducibilidad con un esfuerzo mucho menor.
- Al ser electrodos desechables evitan todo el proceso de limpieza habitual en los electrodos sólidos.
- Los electrodos se pueden construir de acuerdo con las características de cada problema de análisis, pudiéndose seleccionar la composición de los electrodos al imprimir la pasta elegida modificada convenientemente (con enzimas, agentes complejantes etc.), aumentando así la afinidad con el analito que se investiga. De igual manera, pueden incorporarse nanomateriales.
- Un gran número de unidades de tres electrodos de pequeñísimo tamaño, se imprimen simultáneamente en una hoja de celulosa por medio de unas pantallas prediseñadas que tienen grabado el circuito elegido (forma y tamaño del sistema de los tres electrodos). Estas unidades se conectan fácilmente a un potencióstato portátil, constituyendo así un medio adecuado para hacer análisis "in situ". Serán por tanto susceptibles de ser aplicados en la construcción de "biosensores de bolsillo" similares a los que utilizan los enfermos de diabetes para el control de la glucosa.

Aunque en la práctica los electrodos sólidos, son más adecuados para fines comerciales; con el desarrollo de este tipo de sensores se pretende mejorar la sensibilidad, selectividad, estabilidad, precisión, facilidad de uso, bajo coste y robustez de estos métodos. Además los electrodos sólidos, requieren una regeneración eficaz de la superficie, por esta razón se están desarrollando electrodos desechables que eliminan esta necesidad. Así mismo, membranas desechables y electrodos de pasta de carbono se presentan actualmente como alternativas, aunque con limitaciones.

La tecnología de capas gruesas (thick film) consiste en la utilización de una serie de técnicas que permiten construir electrodos planos en estado sólido aplicando secuencialmente películas de diversos materiales (pastas o tintas) sobre un soporte o sustrato. Generalmente la técnica de deposición de los mismos es la serigrafía.

De ahí que el serigrafiado de electrodos sea una técnica muy empleada y con gran éxito en los últimos años, posibilitando además la producción en masa de electrodos a un coste extremadamente bajo. Esta técnica es simple y puede ser aplicada en cualquier laboratorio, siendo apropiada para la producción de electrodos desechables. La posibilidad de total automatización en la fabricación de un sistema completo que contenga los electrodos de trabajo, auxiliar y de referencia, todos impresos en un mismo soporte, hace a los electrodos serigrafiados muy atractivos para el desarrollo de sensores comerciales. Permitiendo también la realización de medidas in situ, debido a su facilidad de miniaturización e integración de esta forma en pequeños equipos portátiles. Son simples de elaborar, tienen un diseño muy flexible y numerosas posibilidades de modificación, lo que les hace tener un uso extenso,

generalmente en electroquímica. Donde la mayoría de aplicaciones directas tienen que ver con ámbitos médicos, ambientales o farmacéuticos^{11,12}.

En la actualidad, esta tecnología se está empezando a aplicar con notable éxito a la construcción de electrodos para la determinación de moléculas de interés biológico, pesticidas, metales pesados, insecticidas, sulfuros y otras sustancias contaminantes o de interés en diversos campos. El hecho de que la "tinta" o pasta de impresión pueda ser modificada con partículas metálicas, mediadores, biocomponentes etc., permite la construcción de sensores y biosensores específicos y desechables de gran utilidad. A pesar de que hay un creciente interés por este tipo de dispositivos, son muy pocos los grupos de investigación que se dedican a la construcción de los mismos por las dificultades que lleva consigo el proceso. Nuestro grupo ha iniciado el desarrollo de estos sensores serigrafados y hemos obtenido buenos resultados en su aplicación tanto en el análisis de metales como de moléculas orgánicas.

Se ha comprobado la gran variedad de posibilidades de trabajo que nos ofrecen los electrodos serigrafados. Las referencias en cuanto a trabajos con electrodos serigrafados se centran en el análisis de metales¹³. De esta manera, se ha determinado plomo y plata a nivel de trazas usando voltamperometría de redisolución absorbiva. Asimismo, se ha llevado a cabo el análisis de cobre en muestras de agua y de suero bovino. Pudiendo emplearse tal cual, o bien modificándolos. Modificar un electrodo consiste en atribuir y controlar nuevas propiedades físico-químicas a un electrodo inerte mediante el acoplamiento de especies químicas activas a su superficie. Los procesos de modificación más comunes implican la deposición de una película metálica o de enzimas. Esta modificación puede realizarse durante la construcción de los mismos, o bien posteriormente. Normalmente se modifican con partículas metálicas como el mercurio, que se emplean sobre todo en determinación de metales¹⁴ que se pueden analizar fácilmente mediante técnicas de redisolución. Debido a su toxicidad, se investigan películas de otros metales como es el bismuto, que se ha empleado sobre todo en análisis de metales pesados. Además se han estudiado también superficies de estaño, oro y níquel¹⁵. Otra opción a tener en cuenta es el uso de nanopartículas metálicas¹⁶ ya que presenta varias ventajas con respecto a los macroelectrodos del mismo material: mayor área superficial efectiva, mejor transporte de masa y la existencia, en algunos casos, de propiedades catalíticas por parte de las nanopartículas que disminuyen el potencial al que aparecen algunos picos e incluso mejoran la reversibilidad de algunos procesos redox.

El uso de nanopartículas es destacable, ya que es conocido por todos que las nanotecnologías se han convertido recientemente en uno de los retos más interesantes para muchos investigadores de diversas áreas entre las que se incluye la química analítica. En los últimos años, la elaboración de nuevos materiales a nanoescala está adquiriendo cada vez más importancia debido a su gran número de aplicaciones en diversos campos. El gran interés por los nanomateriales se debe a sus importantes propiedades, y también a la posibilidad de diseñar a medida el tamaño y la estructura de los mismos, lo que ofrece excelentes perspectivas para diseñar nuevos sistemas sensitivos con mejores prestaciones. Desde el principio de los años 90 existe un creciente interés en el estudio de la transferencia electrónica entre diversos analitos y electrodos modificados con nanomateriales debido a las favorables condiciones que

¹¹ M. Prudenziati (ed.), *Thick Film Sensors*. Elsevier, Amsterdam, 1994

¹² A. L. Hart, H. Cox, D. Janssen, *Biosens. And Bioelectron.*, 11 (1996) 833

¹³ K. C. Honeychurch, J. P. Hart, D. C. Cowell, *Electroanalysis*, 12 (200) 171

¹⁴ D. Desmond, B. Lane, J. Alderman, G. Hall, M. Alvarez, I. Caza, A. Garde, J. Ryan, L. Barry, G. Svehla, S. W. M. Arrigan, L. Schniffner, *Sens. Actuators B*, 34 (1996) 466

¹⁵ J. Wang, B. tian, *Anal. Chim. Acta*, 274 (1993) 1

¹⁶ O. Dominguez, J. Arcos, *Electrochem. Commun.*, 9 (2007) 820

presentan. Particularmente, la combinación entre nanomateriales y biomoléculas es de considerable importancia en los campos de la biotecnología y la química bioanalítica.

La utilización de nanomateriales en sensores y biosensores químicos puede desempeñar diversas funciones que se pueden resumir en las siguientes:

- Inmovilización de biomoléculas: Debido a su gran área y alta energía superficial, los nanomateriales pueden adsorber biomoléculas fuertemente y jugar un importante papel en la inmovilización de estas para la construcción de biosensores.
- Catálisis de reacciones electroquímicas: Este hecho ha permitido la detección de muchas sustancias como azúcares, aminoácidos, y otras especies de interés farmacológico o medioambiental en concentraciones muy pequeñas de forma rápida y selectiva
- Aumento de la transferencia electrónica. Este aspecto es especialmente importante en los biosensores enzimáticos de tercera generación. Del mismo modo, nanopartículas metálicas han demostrado su utilidad para aumentar la transferencia electrónica entre enzimas y electrodos.
- Marcado de biomoléculas. Las biomoléculas marcadas con nanopartículas metálicas pueden retener su bioactividad e interactuar de la misma forma que si no estuvieran marcadas. La posterior detección electroquímica de estas nanopartículas de metal facilita la determinación de las biomoléculas. Esta propiedad ha sido muy utilizada en la construcción de biosensores de ADN.
- Reactividad. Los nanomateriales presentan una actividad mucho mayor que los correspondientes materiales, lo que se aprovecha para aumentar las posibilidades de muchos biosensores.

La incorporación de nanomateriales en los sensores electroquímicos se presenta como una vía importante para abrir sustanciales expectativas en la sensibilidad y selectividad de dichos dispositivos. Estas estructuras incluyen películas, nanotubos, nanofibras, nanobarras y nanopartículas. De todas estas estructuras, las nanopartículas metálicas han sido de las más estudiadas.

Generalmente las nanopartículas de plata tienen excelente conductividad y propiedades catalíticas, lo que las hace adecuadas para actuar como soportes electrónicos, aumentando la transferencia electrónica entre centros redox en proteínas y en superficies electrónicas, y como catalizadores, incrementando la velocidad de las reacciones electroquímicas. La posibilidad de obtener electrodos modificados con nanopartículas de distintos metales ha sido objeto de atención en los últimos años. Las nanopartículas de oro, plata, paladio y platino se han convertido en las más utilizadas para la modificación de electrodos debido a su facilidad de obtención, estabilidad y amplio rango de aplicaciones. Nanopartículas de otros metales como níquel, cobre y hierro son más difíciles de obtener y utilizar debido a su relativa facilidad para oxidarse tanto en el aire como en solución. Sin embargo, se han desarrollado agentes protectores y estabilizantes que también permiten su utilización. Un método habitual de preparación de estas nanopartículas consiste en la reducción química de una sal del correspondiente metal en presencia de un estabilizador, como citrato o un tiol que se enlaza a su superficie confiriendo estabilidad y solubilidades apropiadas. Alternativamente, la deposición electroquímica en un electrodo adecuado es un procedimiento rápido, simple y reproducible.

También se han preparado electrodos de pasta de carbono modificados, introduciendo metales coloidales en la pasta. Recientemente se ha descrito la

modificación de electrodos serigrafados con nanopartículas metálicas siendo esta opción de gran interés debido a las prestaciones de este tipo de electrodos. Igualmente, este tipo de partículas ha encontrado amplia aplicación en muchas formas de seguimiento de esquemas biológicos.

No sólo se emplean las nanopartículas, sino que los electrodos enzimáticos han sido ampliamente usados para el seguimiento de un gran número de sustratos de interés clínico, agroalimentario y medioambiental. Las enzimas se han utilizado en la construcción de biosensores porque a pesar de su elevado coste de extracción, aislamiento y purificación, se unen rápidamente y de forma selectiva a los analitos. Siendo capaces de catalizar reacciones químicas de forma específica; esta especificidad es la clave principal de su uso en la construcción de biosensores ya que los enzimas presentan una especificidad mucho mayor que la de otros catalizadores químicos, debido a que únicamente ciertos sustratos son capaces de acceder a los sitios activos del enzima.

Uno de los retos más importantes en los electrodos enzimáticos es el establecimiento de comunicaciones eléctricas satisfactorias entre la zona activa del enzima y la superficie electródica. El centro activo de muchas óxido-reductasas está eléctricamente aislado por una proteína protectora y debido a esta protección el enzima no puede sufrir reacciones redox directamente en un electrodo a ningún potencial. El empleo de series de nanotubos de carbono alineados que actúan como cables moleculares se presenta como una solución para obviar este tipo de inconvenientes.

A su vez, las propiedades catalíticas de las nanopartículas también facilitan el contacto eléctrico entre los centros redox de las proteínas y las superficies electródicas. Una amplia variedad de electrodos enzimáticos basados en deshidrogenasas y oxidasas se fundamentan en el seguimiento amperométrico del peróxido de hidrógeno o el NADH liberados. La detección anódica de estas especies en electrodos ordinarios es a menudo difícil por la importante sobretensión que requieren. El aumento de la actividad redox del peróxido de hidrógeno y NADH en electrodos modificados con nanotubos disminuye este sobrepotencial, lo que hace que estos materiales sean enormemente atractivos para el desarrollo de biosensores amperométricos basados en estas enzimas.

Existen un gran número de biosensores desechables basados en la inmovilización de enzimas sobre la superficie de electrodos serigrafados¹⁷. Pero el más remarcable lo constituye el biosensor de glucosa debido a su éxito comercial.

¹⁷ O. Domínguez, M. A. Alonso, M. J. Arcos, 73 (2007) 202

PARTE EXPERIMENTAL

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. EXPERIMENTAL

3.1.1. Reactivos

Todas las disoluciones han sido preparadas con agua desionizada con un sistema Barnstead NANO Pure II. Para desoxigenar se empleo nitrógeno al 99,99%.

Las tintas empleadas en la serigrafía de los electrodos han sido las siguientes: Electrodag PF-407 A (tinta de carbono), Electrodag 6037 SS (tinta Ag/AgCl), y Electrodag 452 SS (tinta aislante), todas ellas suministradas por Achenson Colloiden (Scheemda, Holanda).

Como tampón se han utilizado disoluciones de acético-acetato y Britton-Robinson. El tampón Britton-Robinson 0.04M, se han preparado con los siguientes ácidos: o-bórico, fosfórico y acético. Al cuál se le ha ajustado el pH a diferentes valores empleando adiciones de NaOH 0.2M (reactivo analítico, Merck, Darmstadt, Alemania). El tampón acético-acetato se ha preparado a partir de acetato sódico, al cuál se le ha ajustado el pH a diferentes valores empleando ácido acético y NaOH 0.1M (grado analítico, Merck, Darmstadt, Alemania).

El patrón de cromo (III) empleado fue $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ suministrado por Panreac (calidad para análisis, Barcelona, España), el hidrogenocloroaurato (IV) empleado en la fabricación de nanopartículas de oro fue suministrado por Sigma-Aldrich (reactivo ACS, Steinheim, Alemania), el patrón utilizado de cromo (VI) fue $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, que junto con el nitrato de mercurio (II) proceden de Merck (para análisis, Darmstadt, Alemania). Los ácidos sulfúrico y clorhídrico empleados proceden de Merck (reactivo analítico, Darmstadt, Alemania).

3.1.2. Instrumentación

Los electrodos serigrafados se imprimieron en un DEK 248 (DEK, Weymouth, Reino Unido) usando pantallas de poliéster con plantillas de diseño montadas a 45° al golpe de impresora (Fig. 12).

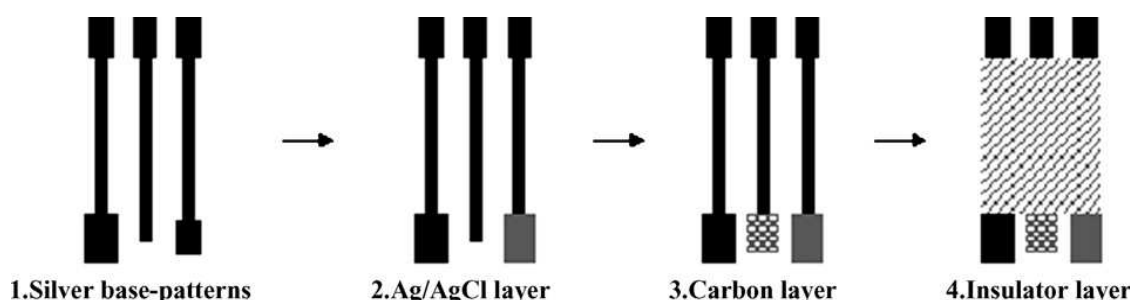


Fig. 12 : Esquema del procedimiento de preparación de los dispositivos serigrafados.

Las medidas se han tomado usando un sistema electroquímico Autolab con Software GPES y Multichannel (Eco chemie, Utrecht, Holanda).

La medida de pH se realizó con un Crison 2002 (Barcelona, España)

3.2. DETERMINACIÓN DE Cr(III) CON ELECTRODOS SERIGRAFIADOS

La primera etapa del trabajo de investigación que se presenta consistió en el desarrollo de un electrodo serigrafiado sensible a la presencia de cromo en su estado de oxidación III, mediante voltamperometría diferencial de impulsos. Para ello, se realizaron modificaciones del electrodo de trabajo de carbono empleando diferentes elementos tales como, Bi, Sn y Hg^{18,19,20}. Las diferentes experiencias realizadas con estos electrodos modificados demostraron que los sensores más específicos y sensibles, al cromo en su estado de oxidación fueron aquellos modificados con mercurio. Tras experimentar con diferentes técnicas, rangos de potenciales, etc, se determinó que el método más sensible y específico a esta especie, era modificar al electrodo serigrafiado con una capa de mercurio mediante acumulación.

Para depositar la capa de mercurio en el electrodo serigrafiado, se empleó un método sencillo de electrodeposición descrito en la bibliografía. Este método consiste en la electrodeposición de mercurio a partir de una disolución de 800 ppm de Hg (II) a un potencial constante de -0.9 V durante 600 s²¹.

Una vez modificado el electrodo serigrafiado con la capa de mercurio, fue necesario estudiar las condiciones óptimas de medida para determinar la especie Cr(III). Con este objetivo, se probaron diferentes valores de pH del tampón Britton-Robinson, analizando además el efecto que tenía sobre la respuesta la desoxigenación o no de la muestra y la activación o no del electrodo serigrafiado.

En primer lugar se analizó la influencia del pH en la medida electroquímica. Los valores de pH estudiados fueron tres: 4, 5 y 6. Determinándose finalmente que la mejor respuesta electroquímica se obtenía para el tampón Britton-Robinson a pH 6.

En cuanto al resto de variables, las experiencias realizadas demostraron que los mejores resultados se obtenían desoxigenando la muestra y empleando electrodos serigrafiados sin activar.

En la Figura 13 puede verse como la determinación de Cr(III) es posible llevarse a cabo mediante voltamperometría diferencial de impulsos realizando un barrido catódico desde 0 V hasta -1.5 V.

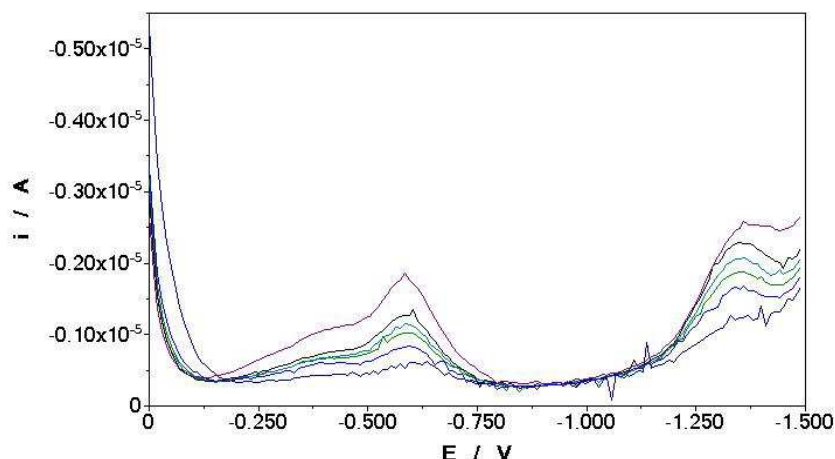


Fig. 13: Voltamperograma obtenido en la determinación de Cr(III) en disolución realizando adiciones sucesivas sobre un blanco (tampón B.R. pH 6) de 20 μ L de una disolución 10^2 M de Cr(III)¹.

¹⁸ Wei Wei Zhu, Nian Bing Li, Hong Qun Luo, Talanta 72, (2007), 1733-1737

¹⁹ Gil-Ho Hwang, Won Kiu Han, Joon-Shik Park, Sung-Goon Kang, Sensors and Actuators B 135(2008), 309-316

²⁰ A. Alberich, N. Serrano, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban, Talanta 78(2009), 1017-1022

²¹ O. Dominguez, M. J. Gómez, J. Arcos, Sensors., 8 (2008)

3.3. DETERMINACIÓN DE Cr(VI) CON ELECTRODOS SERIGRAFIADOS.

Una vez optimizado experimentalmente el proceso para la determinación de Cr(III), el siguiente paso fue el desarrollo de un electrodo sensible al cromo en su estado de oxidación VI.

En un trabajo anterior del grupo de investigación se describe un método para la elaboración de un electrodo específico al cromo en este dicho estado de oxidación²². Dicho método se basa en la modificación de electrodos serigrafiados con nanopartículas de oro. De tal manera, que el primer paso que se dio en este estudio, fue la comprobación del funcionamiento del electrodo descrito en este mismo. Para ello se probó modificando al electrodo serigrafiado con nanopartículas de oro (Fig.14).

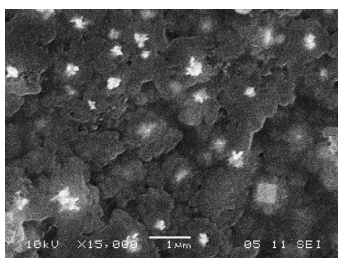


Fig.14 : Imagen del CSPE modificado con nanopartículas de Au obtenida mediante SEM.

De igual forma que para la modificación del electrodo serigrafiado con película de Hg, la modificación con nanopartículas de oro, se consigue mediante electrodeposición. En este caso las condiciones experimentales empleadas fueron las siguientes: un potencial de acumulación de 0.18V, un tiempo de depósito de 200 segundos y una disolución de H_{Au}ClO₄ de concentración 0.1mM. Siendo esta última preparada en medio ácido, concretamente, ácido sulfúrico 0.5M.

Con las condiciones de depósito ya establecidas, se pasó a estudiar el medio óptimo para determinar la concentración de la especie Cr(VI) mediante voltamperometría diferencial de impulsos. Así, se experimentó a diferentes valores de pH de tampón acético-acetato, siguiendo el esquema descrito en la bibliografía. Experimentalmente se comprobó que los mejores resultados se obtenían cuando se usaba como electrolito soporte el tampón acético-acetato a pH 4, de nuevo desoxigenando la muestra previamente, y a diferencia del electrodo modificado con mercurio, los resultados eran mejores cuando se activaba previamente al electrodo. Por tanto, se tiene optimizado tanto el proceso de modificación del electrodo, como el de cuantificación de la especie.

El proceso de activación del electrodo se lleva a cabo en dos pasos: primero se lleva a cabo un lijado mecánico, y por último se realiza una voltamperometría cíclica, en la que se realizan 20 barridos de ida y vuelta, entre potenciales de 2 y -2V. De esta forma, se consigue eliminar posibles impurezas de las tintas empleadas en la fabricación del electrodo que hayan podido quedar depositadas en el electrodo de trabajo del mismo, permitiendo así obtener una superficie del electrodo de trabajo mucho más limpia, lo que implica una mayor eficacia del electrodo de trabajo en posteriores medidas electroquímicas.

La determinación de Cr(VI) se llevó a cabo también realizando una voltamperometría diferencial de impulsos registrando un barrido catódico desde 0.1 V.

²² O. Dominguez, L. Ruiz, N. García, M.J. Arcos, Talanta 76(2008), 854-858

hasta -0.4 V (Fig. 15).

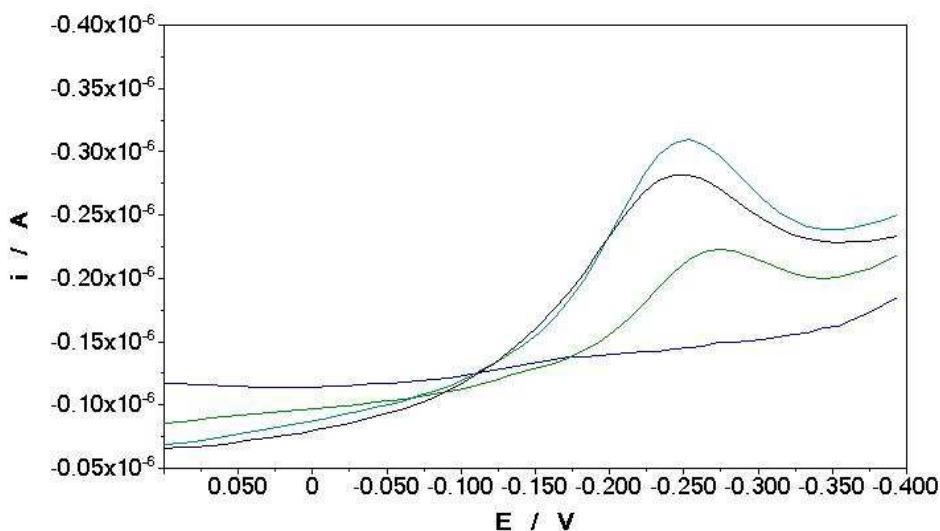


Fig. 15: Voltamperograma obtenido en la determinación de Cr(VI) en disolución realizando adiciones sucesivas sobre un blanco (acético-acetato pH 4) de 50 μ L de una disolución 10^{-3} M de Cr(VI).

3.4. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE Cr(III) Y Cr(VI).

Habiéndose optimizado por separado cada uno de los procesos para la determinación de ambas especies por separado, la última etapa del trabajo fue la optimización de ambos procesos en conjunto. Para ello, se estudiaron en primer lugar las condiciones experimentales optimizadas para la determinación de cada una de las especies por separado, y se observó que para ambos casos existían tanto coincidencias como diferencias, de tal forma que para ambas determinaciones los resultados son mejores desoxigenando la muestra; sin embargo, los tampones empleados en cada una de ellas son diferentes, lo que supone un problema en el estudio.

La forma de intentar solventar este problema fue llevar a cabo determinaciones para ambas especies con los tampones de medida, de la otra especie, es decir, se probó a determinar Cr(III) con un tampón acético-acetato y Cr(VI) con un tampón Britton-Robinson. En este caso no solo se probó a los valores de pH de medida optimizados anteriormente, sino que se probaron ambas experiencias a pH 4, 5 y 6. A la vez que se intentaba identificar que medio era el más adecuado para la determinación simultánea, se probó que no existiera interferencia de una especie con la otra, así cuando se pretendía determinar Cr(III) se hacía con una pequeña cantidad también de Cr(VI) y lo mismo, para el proceso contrario. De esta forma, se comprobó la inexistencia de interferencias entre ambas especies con los electrodos descritos anteriormente y a la vez, se concluyó que los mejores resultados en la determinación simultánea de ambas especies, eran empleando un tampón acético-acetato a pH 4 para la realización de las medidas.

De nuevo la técnica empleada es la voltamperometría diferencial de impulsos, con la única diferencia de que para la determinación simultánea el rango de potenciales empleado cambia, siendo desde 0.3 a -1.5V para la determinación de Cr(III) y de 0.3 a -0.4V para la determinación de Cr(VI)(Fig.16).

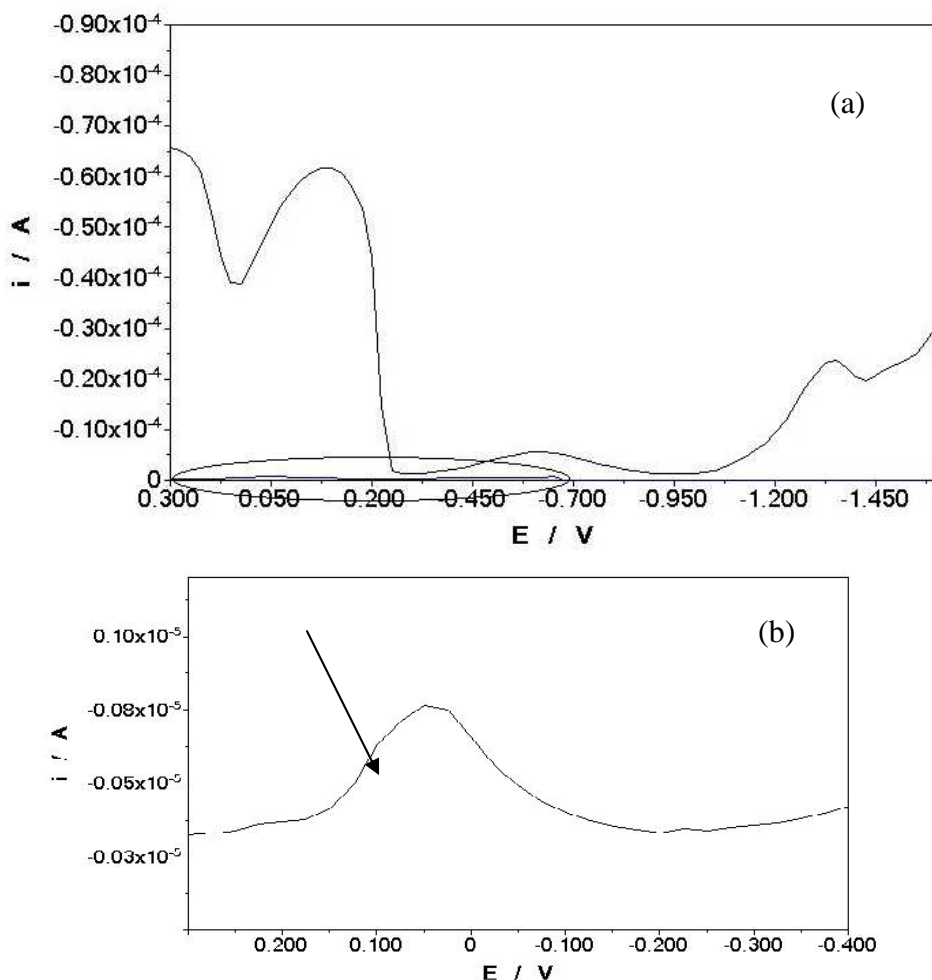


Fig. 16: a) Voltamperograma obtenido en la determinación simultánea de Cr(III) y de Cr(VI), empleado como blanco tampón acético-acetato a pH 4, y realizando sucesivas adiciones de $100\mu\text{L}$ de una disolución madre de 10^2M de Cr(III), y de $25\mu\text{L}$ de una disolución madre de 10^{-3}M de Cr(VI). b) Ampliación del pico obtenido para la especie Cr(VI).

Comprobado ya, la inexistencia de interferencias entre ambos procesos, y la compatibilidad de un medio tamponado para ambas, se pasó a realizar un calibrado para ambas especies. La recta de calibrado se obtuvo mediante una regresión lineal en la que la concentración se toma como variable independiente y la altura de pico como variable dependiente. Se eligió un método de regresión robusta, la regresión LMS (mínima mediana de cuadrados) como alternativa a una regresión lineal, ya que las regresiones robustas se distinguen por su insensibilidad en mayor o menor grado a la presencia de datos anómalos, y por ello, son capaces de detectar la verdadera relación lineal del calibrado y permiten decidir respecto a ella que datos son discrepantes y restablecer las condiciones bajo las cuales la estimación LS (mínimos cuadrados) es óptima. La regresión LMS tiene la capacidad de detectar datos anómalos, que bien pueden ser puntos "outlier" y/o puntos "leverage", considerándose "outlier", el dato cuyo residuo estandarizado es superior, en valor absoluto, a 2.5. Los puntos "outlier" son aquellos que se encuentran alejados del eje de ordenadas y los puntos "leverage" aquellos que se encuentran alejados del eje de abscisas. De forma que una vez determinados mediante la regresión LMS los datos anómalos de los calibrados, se pasa a realizar la regresión LS de estos mismos.

De esta forma se llevaron a cabo tres calibrados tanto para el Cr(III) como para el Cr(VI), según las condiciones experimentales descritas anteriormente. Para el Cr(III), las adiciones se hicieron de una disolución madre de concentración 10^{-2} M de Cr(III), y para el Cr(VI) se hicieron adiciones de una disolución madre 10^{-3} M de Cr(VI).

Los resultados obtenidos son los siguientes (Tabla 1):

		Pdte.	Término Independiente	R ²	Desviación estándar residual	N ^a datos	LOD (M)	% RSD
Cr ^{III}	1	0.0039	$-5 \cdot 10^{-7}$	0.9985	$1.17 \cdot 10^{-7}$	8	$1.95 \cdot 10^{-4}$	4.05
	2	0.0036	$2 \cdot 10^{-6}$	0.9954	$5.69 \cdot 10^{-8}$	9	$1.92 \cdot 10^{-4}$	
	3	0.0038	$2 \cdot 10^{-6}$	0.9994	$4.25 \cdot 10^{-8}$	8	$1.95 \cdot 10^{-4}$	
Cr ^{VI}	1	0.0285	$-3 \cdot 10^{-7}$	0.9996	$9.8 \cdot 10^{-9}$	9	$4.88 \cdot 10^{-6}$	1.48
	2	0.0279	$1 \cdot 10^{-7}$	0.9986	$1.32 \cdot 10^{-8}$	10	$4.88 \cdot 10^{-6}$	
	3	0.0277	$2 \cdot 10^{-6}$	0.9991	$1.29 \cdot 10^{-8}$	8	$4.88 \cdot 10^{-6}$	

Tabla 1: Resumen de los resultados obtenidos para las especies Cr(III) y Cr(VI).

Se pueden destacar dentro de los resultados obtenidos, valores altos de R², valores bajos para la desviación estándar del residuo y para el RSD. El valor del RSD se conoce también como coeficiente de variación, en este caso se ha calculado para valorar la precisión de las pendientes obtenidas en las regresiones LMS. Observándose que son valores bajos, lo que implica que las medidas son robustas.

$$CV = RSD(\%) = \frac{s}{x} \cdot 100$$

Los límites de detección calculados son más bajos para la especie Cr(VI) que para el Cr(III), lo que significa que el método optimizado para la determinación de Cr(VI) es más sensible que el optimizado para la especie Cr(III). Los límites de detección se han calculado con la finalidad de caracterizar al procedimiento y asegurar la calidad de las medidas. En nuestro caso el límite de detección, se ha calculado a partir de las curvas de detección, curvas que se han construido fijando probabilidades de falso positivo (α) y de falso negativo (β) de 0.05.

Podemos ver gráficamente la representación de los calibrados obtenidos para ambas especies de cromo (Fig. 17,18)

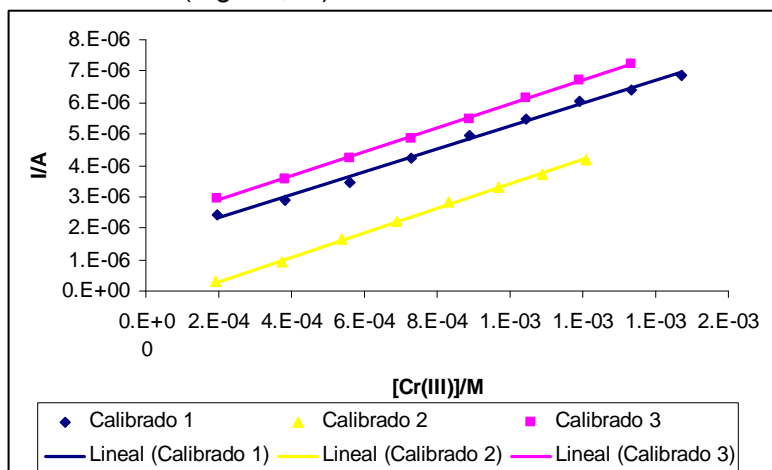


Fig.17: Calibrados de Cr(III).

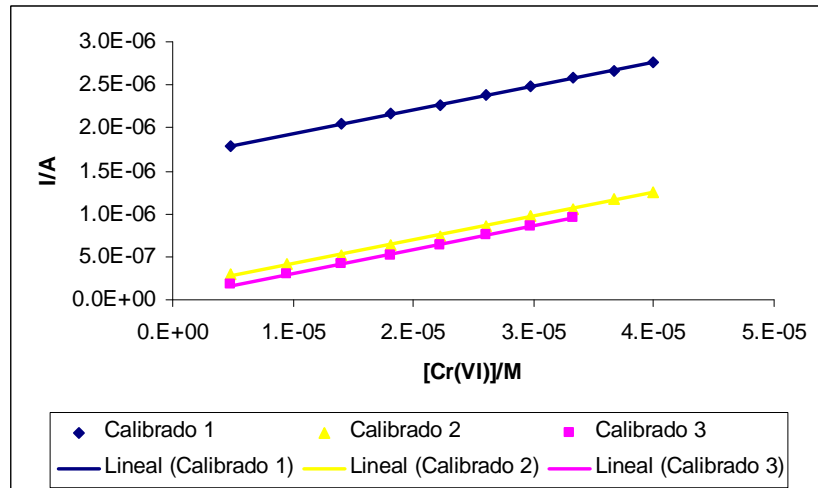


Fig.18: Calibrados de Cr(VI).

Determinadas las rectas de calibrado para ambas especies, el último paso en este estudio, es la especiación del contenido en cromo de una muestra real obtenida como residuo de una peletera. Para ello se han realizado medidas por triplicado empleando como método la adición estándar. Para realizar la adición estándar se han añadido al tampón acético-acetato, 100µL de la muestra real, lo que se ha tomado como blanco, y posteriormente se han realizado adiciones de 100µL de una disolución madre de Cr(III) 10⁻²M y adiciones de 25µL de una disolución madre de Cr(VI) 10⁻³M. De esta manera se han obtenido los resultados siguientes (Tabla 2):

	Cr(III) (M)	Cr(VI) (M)
Medida 1	3,83E-04	1,01E-06
Medida 2	5,14E-04	1,10E-06
Medida 3	4,29E-04	1,28E-06
Media (x)	4,42E-04	1,13E-06
Desviación típica (s)	6,65E-05	1,37E-07

Tabla 2: Concentraciones de Cr(III) y Cr(VI) obtenidas por adición estándar de una muestra real, junto co los valores de media y desviación típica obtenidos para las mismas.

Podemos por tanto, establecer los intervalos de confianza correspondientes a ambas determinaciones:

- Concentración obtenida para Cr(III):

$$[Cr(III)](M) = [2.77 \cdot 10^{-4}, 6.07 \cdot 10^{-4}]$$

- Concentración obtenida para Cr(VI):

$$[Cr(VI)](M) = [7.88 \cdot 10^{-7}, 1.47 \cdot 10^{-6}]$$

Las concentraciones determinadas por un método de referencia²³ para esta muestra real mediante medidas electroquímicas son:

$$[\text{Cr(III)}] = 4.96 \cdot 10^{-4} \text{ M}$$

$$[\text{Cr(VI)}] = 1.42 \cdot 10^{-6} \text{ M}$$

Estas concentraciones se han obtenido mediante medidas electroquímicas por voltamperometría diferencial de impulsos, empleando PCV como agente complejante y empleando análisis multivariante.

Por lo que podemos comprobar, que en ambos casos el valor de concentración real conocida se encuentra dentro del intervalo de confianza establecido para ambas especies.

²³ O. Domínguez, M.J. Arcos. *Electroanalysis* 2000, 12, No. 6

CONCLUSIONES

4. CONCLUSIONES

- a. Es posible determinar específicamente Cr(III) mediante voltamperometría diferencial de impulsos, empleando partículas de mercurio como agente modificante del electrodo serigrafiado, en un medio tamponado Britton-Robinson a pH 6.
- b. También es posible la determinación específica de Cr(VI) por voltamperometría diferencial de impulsos, empleando nanopartículas de oro como agente modificante del electrodo serigrafiado, en un medio tamponado acético-acetato a pH 4.
- c. Puede verse que el potencial al que aparece el pico de Cr(VI) está afectado por la presencia de la otra especie para cada caso, ya que se observa que el potencial al que aparece el pico de Cr(VI) cuando no está en presencia de Cr(III) es de -0.25V mientras que en presencia de Cr(III) aparece a un potencial de 0.5V. Pero no en cambio no está afectado por las condiciones de pH ya que el pH de medida en ambos casos es el mismo.
- d. El trabajo de investigación descrito anteriormente presenta un método que comprende la especiación de cromo en muestra reales. Por ello, es importante destacar la relevancia de esta investigación al conseguir determinar simultáneamente la concentración de cromo en cada uno de sus dos estados de oxidación en una muestra real, sin necesidad de realizar tratamientos previos en la muestra para extraer la cantidad de cromo. Destacar además la importancia que tiene la obtención de un método electroquímico simple de especiación de cromo. Esto es posible por la existencia de un bipotenciostato en el laboratorio de investigación.
- e. Esta determinación es posible debido a la inexistencia de interferencias entre ambas especies, cuando se cuantifican electroquímicamente en una misma muestra.
- f. Se ha podido determinar electroquímicamente la concentración de Cr(III) y Cr(VI) de una muestra real obtenida como residuo de una industria peletera.