

**ESPECIACIÓN Y DETERMINACIÓN DE CROMO EN AGUA POTABLE
MEDIANTE EL ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO CON MICRO-
COLUMNNA ACOPLADA (FIA) Y DETECCIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA
EN EL ULTRAVIOLETA-VISIBLE (UV-Vis)**

CINDY TATIANA LÓPEZ FARFÁN

Tesista

UNIVERSIDAD SANTO TOMAS DE AQUINO

FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL

BOGOTÁ D, C

2015

**ESPECIACIÓN Y DETERMINACIÓN DE CROMO EN AGUA POTABLE
MEDIANTE EL ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO CON MICRO-
COLUMNNA ACOPLADA (FIA) Y DETECCIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA
EN EL ULTRAVIOLETA-VISIBLE (UV-Vis)**

CINDY TATIANA LÓPEZ FARFÁN

Tesista

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA
AMBIENTAL**

Ph. D. JUAN CARLOS TORRES FERNÁNDEZ

Director

**UNIVERSIDAD SANTO TOMAS DE AQUINO
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL
BOGOTÁ D, C**

2015

Nota de aceptación

Firma del jurado

Firma del jurado

Bogotá D, C. Febrero del 2016

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	10
1. INTRODUCCIÓN	12
2. OBJETIVOS.....	13
2.1 Objetivo General	13
2.2 Objetivos específicos	13
3. MARCO DE REFERENCIA	14
3.1 Destino del cromo en el medio ambiente.....	14
3.2 Presencia de cromo en agua.....	14
3.3 El problema del cromo en Colombia.....	15
3.4 Métodos analíticos para la determinación de cromo.....	17
3.4.1 Espectrofotometría de plasma inductivamente acoplado (ICP).....	17
3.4.2 Cromatografía iónica.....	17
3.4.3 Determinación de cromo hexavalente mediante cromatografía líquida de alta resolución y espectrofotometría de plasma inductivamente acoplado(HPLC – ICPMS)	18
3.4.4 Métodos analíticos para la determinación de cromo implementados en Colombia.....	19
3.4.4 Espectrofotometría de absorción atómica.....	19
3.4.5 Determinación de cromo (III) y cromo (VI) en agua on- line, pre- concentración con micro-columna alúmina y detección espectrofotometría de absorción atómica.....	20
3.4.6 Método Colorimétrico	21
3.4.7 Principios del método analítico propuesto.....	21
4. REACTIVOS, MATERIALES Y METODOLOGÍA	25
4.1 Reactivos	25
4.2 Materiales	25
4.2.1 Zeolita	25
4.2.2 Vidriería y equipos.....	29
4.3 Sistema FIA	29
4.3.1 Sección 1- Transporte de líquidos.....	31
4.3.2 Sección 2- Elución de Cr (III)	31
4.3.3 Sección 3- Elución del Cr (VI)	32
4.4 Metodología	33

4.4.1	Cromo (III)	33
4.4.2	Cromo (VI).....	36
4.4.3	Recobrado.....	38
23.3.2	Preparación de curvas de calibración cromo (VI).....	41
5.	RESULTADOS Y ANÁLISIS	42
6.	CONCLUSIONES	50
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	51

LISTA DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Estructura molecular del Difenilcarbazida.....	22
Ilustración 2. Estructura química de la Na-clinoptilolita.....	27
Ilustración 3. Activación de zeolita modificada con surfactante (SMZ)	27
Ilustración 4. Equipo GE Ultropsec 2100 Pro Spec UV Vis para la detección y determinación de Cr (VI) en las muestras de agua.....	30
Ilustración 5. Bomba peristáltica utilizada para el transporte de líquidos (soluciones y muestra).....	30
Ilustración 6. Diseño del arreglo de transporte de líquidos FIA en el modo de pre-concentración en una sección.	31
Ilustración 7. Diseño del arreglo de transporte de líquidos FIA en el modo de elusión en dos secciones.....	33

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Concentración de cromo total en diferentes tipos de agua	15
Tabla 2. Curtiembres en Colombia y afluentes de descarga.	16
Tabla 3. Estudios que detallan la especiación de cromo por HPLC-MS/ ICP ...	18
Tabla 4. Parámetros determinantes en la metodología	24
Tabla 5. Resumen de las condiciones de pre-concentración y elusión en flujo en el métodos FIA.....	43
Tabla 6. Resultados de la estandarización de la pre-concentración y elusión y del método de adición de estándar para la determinación de Cr (III) y Cr (VI) en muestras sintéticas y de agua de grifo.....	50

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Pre-concentración y elución de Cr(III) 0.05 mg L ⁻¹ en función del volumen de solución buffer (NaOH/Na ₂ CO ₃ 0.1/0.05 M), H ₂ O ₂ 50 mM.	44
Gráfica 2. Curvas de elución en el método de adición de estándar para muestras de agua de grifo (USTA) para concentraciones de Cr(VI) de 20 – 80 µg L ⁻¹	45
Gráfica 3. Picos de absorbancia contra tiempo de elución para concentraciones de Cr (III) entre las concentraciones 4–12 µg L ⁻¹ Cr en el método de adición de estándar para las muestras de agua sintética.	46
Gráfica 4. Curva de calibración de método de adición de estándar Cr (III) en muestras de agua de grifo.	47
Gráfica 5. Picos de absorbancia contra tiempo de elución para concentraciones de Cr (VI) entre las concentraciones 20 - 80 µg L ⁻¹ Cr en el método de adición de estándar para las muestras de agua de grifo.....	48
Gráfica 6. Curva de calibración de método de adición de estándar Cr (VI) en muestras de agua de grifo.	49

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Transformación físico-química clinoptilolita	26
Esquema 2. Transformación físico-química zeolita modificada con surfactante	28
<i>Esquema 3. Activación de la HCC</i>	<i>34</i>
Esquema 4. Pre-concentración con adición estándar para cromo (III)	35
Esquema 5. Elusión de especies de cromo (III).....	36
Esquema 6. Activación de SMZ.....	37
Esquema 7. Elusión de especies de cromo (VI)	38
Esquema 8. Pre-concentración de cromo (III).....	39
Esquema 9. Preparación curva de calibración.....	40
Esquema 10. Elusión de especies de cromo (VI)	41

RESUMEN

La calidad del agua potable es de suma importancia para la salud del ser humano, es por esto que actualmente varios países tienen legislaciones internas que establecen las características óptimas de este recurso, con el fin de ser destinada al consumo y a los distintos usos que estén en contacto con la población. Estas legislaciones y normas contribuyen en concientizar y regular a los sectores involucrados en la producción y distribución de agua potable, con el fin de que el monitoreo y el control en los sistemas de potabilización sean más rigurosos y constantes.

Así mismo Colombia también viene trabajando en estas normas y no está exenta de la problemática que se genera a partir de la presencia de metales que alteran la calidad del agua potable.

En el país, el cromo proviene principalmente del vertimiento de agua residual asociado a las industrias del cuero, lo cual ha sido difícil de controlar, ya que aunque la legislación colombiana establece en la Resolución 2115 del 2007, un valor máximo de 0.05mg/L de cromo total; el cromo (VI) aún no ha sido reglamentado.

Con el fin de garantizar el cumplimiento de la normativa colombiana surge la necesidad de implementar un método analítico que permita la detección de ambas especies de cromo en agua potable en bajas concentraciones, de forma sencilla, eficiente, y económica.

La presente investigación tuvo como objeto de estudio la concentración de especies de cromo (III) y (VI) presente en el agua de grifo de la Universidad Santo Tomás – Sede Chapinero Bogotá, en la que se evaluó la técnica de inyección en flujo con micro-columna acoplada (FIA) y detección espectrofotométrica en el ultravioleta-visible (UV-Vis) con el fin de establecer las condiciones óptimas para la implementación y las ventajas que este método presenta sobre técnicas convencionales.

La técnica analítica propuesta se compone de tres etapas, la primera consiste en la activación de las micro-columnas (MC), para las especies de cromo (III) y (VI) se tiene un material adsorbente (zeolita) diferente, de tal forma se requieren soluciones propias para cada una, en la activación de las MC de Cr (III) es necesario cloruro de sodio (NaCl) y ácido clorhídrico (HCl), para cromo (VI) son estas mismas junto con bromuro de hexadecilmetilamonio (HDTMA). Las soluciones mencionadas son de vital importancia para llevar a cabo la determinación del analito, dado que son las encargadas de preparar la superficie de la zeolita, permitiendo así el intercambio aniónico o catiónico, de tal forma que la especie de cromo se queda retenida en ella. La segunda etapa es la pre-concentración del analito en la micro-columna, para esta se implementó el método de adición estándar, que consiste en añadir una concentración conocida del analito en la muestra, en la pre-concentración de Cr (III) se emplea una solución oxidante y la 1,5-difenilcarbazida (DPC), mientras que para Cr (VI) solo es necesaria la DPC. Finalmente esta es la etapa de elución, en la que el cromo retenido en la micro-columna sale de ella, a diferencia del Cr

(VI), el cromo (III) es conducido al coil de oxidación y de allí al coil de reacción junto con la DPC y es determinado como cromo hexavalente; esto último ocurre dado que el espectrofotómetro solo determina señales de Cr (VI).

Se encontró que la especiación y determinación de cromo en agua potable mediante el análisis por inyección en flujo con micro-columna acoplada (FIA) y detección espectrofotométrica en el ultravioleta-visible (UV-Vis) no genera desechos altamente tóxicos con relación a otro tipo de métodos analíticos. También, los costos disminuyen al utilizar adsorbentes naturales (zeolita modificada), los tiempos promedio de análisis oscilan entre 4 y 6 horas, y los errores experimentales son menores. Los resultados encontrados permiten afirmar que el análisis por inyección en flujo con micro-columna acoplada (FIA) y detección espectrofotométrica en el ultravioleta-visible (UV-Vis) es una técnica analítica cualitativa y cuantitativa, rápida, económica, sensible y confiable, que puede ser realizada por personal entrenado, pero no requiere una larga y compleja especialización.

Palabras claves: Cromo, especiación, determinación, pre-concentración, elusión.

1. INTRODUCCIÓN

El interés por la especiación del cromo es originado por el amplio uso de este metal en la industria metalúrgica, en la fabricación de materiales refractarios, en fabricación de pigmentos, electro-metalizado y curtido de pieles. Cantidades considerables de compuestos de cromo son descargados en el ambiente en forma de desperdicios líquidos [1], como consecuencia de estos procesos, dichas descargas alteran las condiciones naturales del afluente, ocasionando limitantes para el aprovechamiento del recurso hídrico.

Los dos estados de oxidación más comunes del cromo en el ambiente ($3+$ y $6+$) son drásticamente diferentes en carga, propiedades físico-químicas, así como reactividad química e bioquímica. El Cr (III) es considerado un elemento traza esencial para el funcionamiento de los organismos vivos. Éste ha sido reportado como el responsable del control de la glucosa y el metabolismo de los lípidos en mamíferos [1]. Sin embargo, el Cr (III) puede ser oxidado en la naturaleza transformándose en formas oxianiónicas. El Cr (VI) ejerce efectos tóxicos sobre los sistemas biológicos. En el hombre, la inhalación y contención de sustancias conteniendo Cr (VI) puede causar asma, bronquitis, neumonía, inflamación hepática e incrementa la ocurrencia de carcinoma del pulmón. Las propiedades tóxicas de los cromatos surgen de su libre difusión a través de la membrana celular y su fuerte poder oxidante, el cual resulta en la formación de radicales libres.

Aunque es poco frecuente encontrar altas concentraciones de cromo hexavalente en agua potable, es importante resaltar los efectos que este metal genera en la salud del ser humano.

Ahora bien, surge la necesidad de implementar un método analítico que evalúe la calidad del agua, tanto en fuentes naturales, como en plantas potabilizadoras, contando que este sistema analítico sea rápido y de fácil manejo al servicio de la vigilancia de la calidad del recurso en cuanto a especies nocivas.

El método propuesto en este trabajo de investigación es la unión entre el sistema de inyección en flujo (FIA) para especiar cromo total y la detección espectrofotométrica en el ultravioleta-visible (UV-Vis), estas técnicas ofrecen una serie de ventajas significativas para la determinación en orden de microgramos por litro ($\mu\text{g/L}$), entre las cuales se encuentra una mayor eficiencia, más bajo consumo de muestra y reactivos, y precisión mejorada.

2. OBJETIVOS

2.1 *Objetivo General*

Implementar un método analítico que permita especiar y determinar cromo hexavalente y cromo trivalente, en muestras de agua potable tomadas del grifo de las instalaciones de la Universidad Santo Tomás-Sede Chapinero, de forma fácil, confiable y económica.

2.2 *Objetivos específicos*

2.2.1 Determinar las condiciones experimentales para la detección espectrofotométrica (UV-Vis) de especies de Cr (VI) y Cr (III).

2.2.2 Seleccionar las condiciones más adecuadas para la oxidación de Cr (III), la pre-concentración de Cr (III) y Cr (VI), la elución en flujo (FIA) de las especies de cromo y la detección espectrofotométrica en UV-Vis de Cr(VI) directamente o de Cr(III) como Cr(VI).

2.2.3 Estimar valores de calidad asociadas al método, tales como: el límite de detección, límite de cuantificación, recobrado y análisis estadístico sobre los datos obtenidos.

3. MARCO DE REFERENCIA

Los dos estados de oxidación más comunes del cromo en el ambiente ($3+$ y $6+$) son drásticamente diferentes en carga, propiedades físico-químicas, así como reactividad química y bioquímica. El Cr (III) es considerado un elemento traza esencial para el funcionamiento de los organismos vivos. Éste ha sido reportado como el responsable del control de la glucosa y el metabolismo de los lípidos en mamíferos [2]. Sin embargo, el Cr (III) puede ser oxidado en la naturaleza transformándose en formas oxianiónicas. El Cr (VI) ejerce efectos tóxicos sobre los sistemas biológicos. En el hombre, la inhalación y contención de sustancias de Cr (VI) puede causar asma, bronquitis, neumonía, inflamación hepática e incrementa la ocurrencia de carcinoma del pulmón. Las propiedades tóxicas de los cromatos surgen de su libre difusión a través de la membrana celular y su fuerte poder oxidante, el cual resulta en la formación de radicales libres [3].

3.1 *Destino del cromo en el medio ambiente*

La distribución de los compuestos que contienen Cr (III) y Cr (VI) depende de: El potencial redox, el pH, de la presencia de compuestos oxidantes o reductores, de la cinética de las reacciones redox, de la formación de complejos de Cr (III) o de las sales insolubles de esta especie y de la concentración total de cromo.

En el medio ambiente, el Cr(VI) ocurre mayormente como CrO_4^{2-} o HCrO_4^- y el Cr(III) como $\text{Cr}(\text{OH})_3^+$, sabiendo esto, es importante resaltar que en el suelo, el Cr (III) predomina, mientras que en el agua, el Cr(VI) es un ión positivo que forma hidróxidos y complejos y es adsorbido a relativamente altos valores de pH. En las aguas superficiales la relación Cr (III)/Cr (VI) varía ampliamente, y concentraciones relativamente altas de Cr (VI) pueden ser localmente encontradas. En general, las sales de Cr (VI) son más solubles que las del Cr (III), lo que hace al Cr (VI) más móvil.

En el aire, el cromo está presente en la forma de aerosol. Este puede ser removido de la atmósfera mediante deposición húmeda y seca. Debido a dificultades analíticas, datos de especiación de cromo en el aire atmosférico son raramente encontrados, pero la proporción presente como Cr (VI) ha sido estimada como 0.01-30 ppm [3].

3.2 *Presencia de cromo en agua.*

Hoy en día, el cromo sigue siendo detectado en los suministros de agua potable, sin embargo, a diferencia de décadas anteriores, a nivel mundial se han estipulado valores con el fin de regularlo, puesto que se propaga fácilmente a través del agua, afectando la salud del consumidor.

La concentración promedio de cromo depende del tipo de agua en el que se encuentre disuelto, en la tabla 1 se menciona el rango y tipo de agua, encontrados en diferentes estudios sobre presencia de cromo.

Tabla 1. Concentración de cromo total en diferentes tipos de agua

TIPO	RANGO (µg/L)
Agua de mar	0.00004-0.0005
Agua de lluvia	0.0002-0.001
Aguas superficiales	0.0005-0.002
Lagos antárticos	<0.0006 hasta 0.03

Fuente:[4], [5],[6]y[7]

Al comparar la concentración registrada por cada tipo de agua con el valor estipulado en la Resolución 2115 de 2007 emitida por el Ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial, se puede afirmar que dichos valores se encuentra por debajo del límite establecido, el cual es de 0,05 mg/L, sin embargo es posible que estas concentraciones hallan aumentado con los años, debido a las diferentes actividades que ya se han mencionado anteriormente.

El valor reglamentado para Colombia tiene en cuenta la dosis máxima en la que este elemento comienza a generar efectos nocivos para la salud. A continuación se describen la concentración y las consecuencias asociadas a la ingesta de cromo.

Dosis permitida: Los requerimientos de cromo para los adultos es estimada en el intervalo 0.5-2 µg de Cr (III) absorbible [8].

Exposición aguda: La ingestión de 1-5 µg/L de cromo (VI) resulta en efectos agudos severos tales como trastornos gastrointestinales, diátesis hemorrágica y convulsiones. La muerte puede ocurrir seguida de choque cardiovascular [8].

Mutación: En algunos estudios ocupacionales, se han denotado los incrementos en las incidencias de los efectos geno-tóxicos tales como aberraciones cromosómicas e intercambios de cromátidas hermanas, esto ha sido encontrado en trabajadores expuestos a compuestos de Cr (VI) [8].

Carcinogénesis: En estudios epidemiológicos, una asociación ha sido encontrada entre la exposición ocupacional a los compuestos de Cr (VI) y una mortalidad debida a cáncer del pulmón. Sobre la base de estos estudios, ha sido concluido que existe suficiente evidencia de carcinogénesis respiratoria en humanos expuestos a Cr (VI) en los lugares de trabajo [9].

3.3 El problema del cromo en Colombia

A nivel mundial, las curtiembres representan un serio problema ambiental dado que utilizan sales de cromo en el proceso de curtiembre del cuero, y este finalmente es vertido a las fuentes de agua, en cuanto a este problema la legislación ambiental de los países desarrollados es prohibitiva, razón por la cual estos países en muchos casos contratan el curtido del cuero a terceros, generalmente industrias ubicadas en países en vía de desarrollo, como Colombia, los cuales poseen una tecnología obsoleta para descontaminar los

efluentes industriales y en donde se carece de exigencia, asistencia y seguimiento en la aplicación de leyes ambientales existentes[10].

En Colombia, la exposición ocupacional al cromo ocurre principalmente en la industria de cueros como se menciona anteriormente, en el que un porcentaje de trabajadores presenta un cuadro de enfermedades agudas y crónicas muy variadas como: hipertrofia de cornetes nasales acompañado de inflamación e irritación de la mucosa nasal, dermatitis, conjuntivitis entre otras.

Si bien se han descrito estas patologías como un riesgo ocupacional, actualmente, se considera que la población en general, que reside en la cercanía a los centros de producción, podría estar expuesta a niveles altos de cromo, tanto o más que la población ocupacionalmente expuesta, lo que puede deberse principalmente a la contaminación ambiental del agua, el suelo y el aire con este metal [11].

El país cuenta con industrias de curtiembres establecidas en departamentos como Cundinamarca, Nariño, Quindío, Valle del Cauca, Tolima, Antioquia, Santander y como principal lugar de producción Bogotá; sin embargo, no todos los municipios cuentan con plantas de tratamiento de agua residual, generando así, diferencias y desigualdades regionales, en la que además se destaca la falta de planeación, la inadecuada política de uso de los servicios públicos y el abandono en la conservación del medio ambiente [12].

En la tabla 2 se presenta una compilación del número de curtiembres registradas en el año 2003, mediante encuestas y documentación asociada al proyecto de Gestión ambiental en la industria de la Curtiembre realizado por el Centro Nacional de Producción más Limpia, adicional se presenta el afluente afectado por la descarga directa de los residuos líquidos provenientes de esta actividad económica.

Tabla 2. Curtiembres en Colombia y afluentes de descarga.

CURTIEMBRES EN COLOMBIA		
LUGAR	NÚMERO DE CURTIEMBRES (2003)	AFLUENTE DE DESCARGA
BOGOTÁ	350	RÍO TUNJUELITO
CUNDINAMARCA	190	RÍO BOGOTÁ
NARIÑO	64	QUEBRADA MACONDINO- RÍO PASTO
QUINDIO	27	RÍO QUINDÍO
VALLE DEL CAUCA	22	RÍO CERRITO- RÍO CAUCA
TOLIMA	8	
ANTIOQUIA	7	SISTEMA DE COLECTORES DE EPM O RÍO MEDELLÍN
SANTANDER	4	

Fuente:[12]

De acuerdo a los casos de estudio presentados con anterioridad, se observa que las autoridades ambientales del país requieren ser más rigurosas en cuanto al control y monitoreo ambiental en esta industria, puesto que la disposición inadecuada de residuos tanto sólidos como líquidos están generando la degradación de fuentes hídricas, en la que elementos contaminantes se presentan en mayor concentración.

3.4 Métodos analíticos para la determinación de cromo

Para la determinación de cromo en forma hexavalente o trivalente en muestras de agua existe una variedad de métodos tales como: cromatografía iónica, espectrofotometría de absorción atómica, colorimetría y espectrofotometría de plasma Inductivamente Acoplado (ICP).

3.4.1 Espectrofotometría de plasma inductivamente acoplado (ICP)

En la técnica espectroscopía de emisión se refiere a un plasma que es un gas ionizado neutro, que contienen el mismo número de partículas positivas (iones) y negativas (electrones) además esta técnica conserva algunas propiedades de los gases ideales en particular, como las referentes a la presión y al volumen [13].

En esta técnica se utiliza un generador de alta frecuencia (27,12 o 40 MHz) para producir el campo de alta frecuencia a través de la bobina de inducción. La potencia debe ser del orden de 1-2 kW, y su estabilidad es un parámetro crucial para evitar cualquier alteración en las propiedades del plasma, el generador debe ser lo suficientemente flexible como para compensar cualquier variación de la impedancia del plasma debido a cambios en su carga [13].

Dado que en esta técnica, la descarga o la introducción emite una considerable cantidad de líneas o bandas, el resultado es un espectro algo complejo de interpretar. Otra desventaja que presenta este método, es con relación a factores como el límite de detección, el costo del equipamiento, el tiempo de análisis, la selectividad y la preparación de la muestra.

3.4.2 Cromatografía iónica

El método consiste en la separación mediante una columna cromatográfica de intercambio aniónico de alta capacidad de ambas especies, en el que las muestras se conservan con un reactivo tampón con el fin de formar complejos de cloro libre y aumentar el pH. Se introduce un determinado volumen de la muestra al cromatógrafo iónico. CrO_4^{2-} se separa de otros componentes de la matriz en una columna de intercambio aniónico. El cromo (VI)- desarrolla color con 1,5- difenilcarbazida en un reactor de post-columna y se detecta espectrofotométricamente a una longitud de onda de 530 nm.

El Cr (VI) se identifica cualitativamente a través de tiempo de retención, y la concentración de esta especie en la muestra se calcula utilizando el área del pico integrada.

Esta técnica presenta una serie de ventajas, por ejemplo, presenta bajo límite de detección y no es afectado por interferencias, es altamente selectivo, sin

embargo el costo de equipamiento es elevado y requiere ser manipulado por personal especializado[14].

3.4.3 Determinación de cromo hexavalente mediante cromatografía líquida de alta resolución y espectrofotometría de plasma inductivamente acoplado(HPLC – ICPMS)

Dado que la especie de cromo (III) posee iones cargados positivamente y las especies de cromo (VI) son iones cargados negativamente, se pueden separar usando un intercambiador catiónico o aniónico. Después de esta separación, ICP-MS es utilizado para cuantificar la concentración de cada especie de cromo.

La optimización de la HPLC y la ICP-MS ha permitido conseguir un bajo límite de detección. Por su parte la cromatografía logra una buena separación entre los picos de Cr (III) y Cr (VI).El resultado de la unión de estas técnicas depende del tipo de columna usada, las cuales suelen ser costosas. [15]

La HPLC presenta una desventaja, solamente puede cuantificar una de las especies de cromo. Es decir, una columna de intercambio catiónico se puede utilizar para capturar Cr (III), de modo que sólo el Cr (VI) se deja a ser analizado por ICP-MS. En este caso, el Cr (III) sólo puede ser cuantificado mediante la medición de cromo total por ICP-MS y el cálculo de la diferencia.

Los parámetros juegan un papel de vital importancia para la optimización de HPLC, incluyen el tipo de columna, eluyente, composición y pH, y el volumen de inyección.

A continuación se presenta un listado de las columnas y condiciones experimentales asociados a este método junto con el límite de detección alcanzado.

Tabla 3. Estudios que detallan la especiación de cromo por HPLC-MS/ ICP

COLUMNA	ELUENTE	PARAMETRO	LIMITE DE DETECCION (µg/L)	
			Cr(VI)	Cr(III)
EXCELPAC ICS-A23 (Anión)	1 Mm EDTA- 2NH4 0.01M ácido oxálico	Volumen de inyección 0.5 mL; pH 7	0.088	0.081
DionexlonPac AS7 (Anión)	EDTA para acomplejar Cr(III), 35mM sulfato de amonio+ hidróxido de amonio	Volumen de inyección 0.1 mL; pH 9.2	1	0.4
Cetac ANX1606- Cr (Anión)	0.25% ácido nítrico	Volumen de inyección 0.01 mL	0.18	0.06
DionexlonPac AG5 (Anión)	Discontinuo- paso 1: ácido nítrico0.35M ; paso 2: ácido nítrico1 M	Volumen de inyección 0.01 mL	0.2	0.1

COLUMNA	ELUENTE	PARAMETRO	LIMITE DE DETECCION (µg/L)	
			Cr(VI)	Cr(III)
ShodexRspak NN-814-4DP (Multi-modo)	90mM sulfato de amonio+ 10 mM nitrato de amonio	Volumen de inyección 0.025 mL; pH 3.5	0.5	0.5
Dionex CG5A (Grupos de anión+ catión)	Discontinuo- paso 1: ácido nítrico 0.35M ; paso 2: ácido nítrico 1 M	-	0.19	0.32
Hamilton PRP-X100 (Anión)	Discontinuo- 20mM nitrato de amonio + 60mM nitrato de amonio	Volumen de inyección 0.1 mL; pH 8.7	0.13	No aplica
DionexlonPac AS7 (Anión)	EDTA para acomplejar Cr(III), 50mM nitrato de amonio	Volumen de inyección 1 mL; pH 8	0.012	0.005
Hypersil Gold	2mM EDTA+ 0.25mM tetrabutilamonio fosfato	Volumen de inyección 0.2 mL; pH 6.9	0.009	0.017
Brownlee C8	2mM hidróxido de tetrabutilamonio + 0.5mM K ₂ EDTA+ 5% metanol	Volumen de inyección 0.05 mL; pH 7.6	0.1	0.1

Fuente:[15]

3.4.4 Métodos analíticos para la determinación de cromo implementados en Colombia

Existen varias técnicas que pueden ser utilizadas para la determinación de cromo, sin embargo, los laboratorios colombianos acreditados por el IDEAM implementan la espectroscopia de absorción atómica con llama directa (FAAS) para cromo total y la colorimetría para cromo hexavalente [16]; así mismo estos métodos se encuentran validados por los “*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*”, que consiste en una publicación de los Estados Unidos, en el que se determinan todos los aspectos de las técnicas de análisis de agua potable y aguas residuales.

3.4.4 Espectrofotometría de absorción atómica

Este método analítico consiste en la medición de las especies atómicas por su absorción a una longitud de onda determinada previamente. La especie atómica se logra por atomización de la muestra, en los que los distintos procedimientos y los reactivos empleados determinan la exactitud del resultado.

La técnica de atomización más usada es la absorción atómica con llama, que nebuliza la muestra y luego la disemina en forma de aerosol dentro de una

llama de óxido nitroso- acetileno, no obstante, este método suele ser interferido fácilmente[17] , a continuación se presentan las diferentes clases de interferencias de este método:

Interferencias químicas: Interferencia química es cualquier alteración en el número total de átomos libres, generados por unidad de volumen debido a la formación de compuestos químicos termoestables [17]. Las causas más comunes de éstas son:

-Disociación incompleta de la molécula formada o formación de una sal difícil de fundir.

-Reacción espontánea de los átomos libres con otros átomos o radicales presentes en el medio ambiente.

Interferencias de ionización: Un átomo neutro en su estado fundamental puede ser ionizado a temperaturas elevadas. Estos iones exhiben propiedades espectroscópicas diferentes a un átomo neutro y no pueden ser determinados por espectroscopia de absorción atómica. Así, el número total de átomos disponibles para la absorción de la radiación por unidad de volumen disminuye, lo que produce una pérdida de sensibilidad. Esta interferencia depende tanto de la temperatura de la llama como del potencial de ionización del elemento en estudio[17].

Interferencias espectrales: La radiación del elemento a determinar es directamente influenciada, existiendo interferencias espectrales de línea e interferencias espectrales de banda [17]

-Las interferencias espectrales de línea ocurren cuando hay superposición de dos líneas atómicas o cuando éstas no son resueltas por el mono-cromador.

-El empleo de lámparas multi-elementales fabricadas con una combinación inadecuada de elementos puede producir interferencias del segundo tipo, si dentro de la banda espectral del mono-cromador se encuentra una línea de resonancia de otro elemento junto a la del elemento a determinar [17].

Equipo: para el desarrollo de este método es necesario un espectrofotómetro, el cual tiene un generador de radiación lumínica, un separador para obtener la radiación adecuada para posteriormente medir la potencia radiante; adicionalmente está compuesto por una fuente, mono-cromador, la base de la muestra, el detector y el registrador [18].

3.4.5 *Determinación de cromo (III) y cromo (VI) en agua on- line, pre-concentración con micro-columna alúmina y detección espectrofotometría de absorción atómica*

Es considerado como un método sensible y rápido para la determinación de cromo (III) y cromo (VI) en muestras de agua por absorción atómica por llama usando la pre-concentración on-line en una micro-columna empacada con alúmina en forma ácida. En el desarrollo de este método se ha establecido que el pH requerido para Cr (III) es básico, mientras que para Cr (VI) es pH 2. La pre- concentración de las especies son eluidas directamente de la columna al nebulizador junto con una solución de ácido nítrico 1 M para cromo trivalente y amonio 0.5 M para cromo hexavalente. La retención de la MC para cromo (III)

ha sido del 80% mientras que para cromo (VI) es del 90% y el recobrado de cada especie esta entre el 90- 106% y el límite de detección de esta técnica es de 1µg/L para cromo (III) y 8µg/L para cromo (VI)[19].

3.4.6 Método Colorimétrico

Esta técnica se basa en la reacción del cromo hexavalente con 1,5-difenilcarbazida en medio ácido, lo que produce la formación de un compuesto desconocido de color rojo violeta. Éste puede ser medido espectrofotométricamente a una longitud de onda de 540 nm y la absorbancia es proporcional a la concentración de cromo en la muestra. Para determinar cromo total, la muestra debe ser sometida a digestión ácida y oxidación con permanganato de potasio, previo a la reacción con la difenilcarbazida[20]

La colorimetría es considerada uno de los procedimientos más sencillos, aunque es una técnica poco sensible, y el límite de detección es de 0,1 mg/l. Esta técnica es usualmente complementada con otros métodos analíticos

Sensibilidad: Se refiere a la capacidad que tiene un método para detectar pequeñas concentraciones del analito[21].

Límite de detección: Conocido como el límite de concentración más bajo para mediciones cuantitativamente precisas[21].

3.4.7 Principios del método analítico propuesto

Es importante resaltar que la especiación y determinación de cromo en agua potable mediante el análisis por inyección en flujo con micro-columna acoplada (FIA) y detección espectrofotométrica en el ultravioleta-visible (UV-Vis) se realiza a partir de conceptos y técnicas específicas, estas son: el uso de zeolitas como adsorbentes, la técnica analítica colorimetría, método de adición estándar y finalmente la espectrofotometría (UV-Vis).

En cuanto a los parámetros claves para el desarrollo de dicha metodología se ha tenido como base el artículo científico “Spectrophotometric determination of ultra trace tri& hexavalente chromium by using on-line flow injection analysis with dual pre-concentration column” escrito por los koreanos Sung-woon Jung, Hyun-woo Lim, Chu-hokang y Yong-wook Choi.

El análisis de cromo trivalente y cromo hexavalente mediante la detección espectrofotométrica UV-Vis ha sido también implementada en investigaciones como la remoción de ambas especies con bio-absorbentes; este estudio se desarrolló en 1998 por David Kratochvil, Patricia Pimentel y Bohumil Volesky y se publicó un artículo llamado “Removal of trivalent and hexavalent chromium by seaweed biosorbent”, en el que se desarrolla el método de colorimetría para determinar cromo hexavalente y se lee a 540nm en el UV-Vis, la concentración de cromo (III) es determinada a partir de la diferencia entre el cromo total y el hexavalente.

3.4.7.1 *Determinación espectrofotométrica de ultra traza para cromo hexavalente y trivalente mediante el análisis de inyección en flujo con micro-columna acoplada.*

Los métodos que emplean la columna de pre-concentración con flujo junto con el sistema FIA ofrece una serie de ventajas importantes para la determinación ultra-trazas, estas son: mayor eficiencia, menor consumo de muestra y de reactivos y mejor precisión [22]

La retención de cromo y la elución en la columna de pre-concentración con los procedimientos de inyección en flujo (FIA), junto con oxidación en línea de Cr (III) a Cr (VI) utilizando la 1,5-difenilcarbazida (DPC), que es selectivo para Cr (VI), y de modo que DPC reacciona con Cr (VI) en medio ácido para formar un complejo de color rojo-violeta, es una de las técnicas más exitosas para la determinación de cromo en ambos estados de oxidación [22].

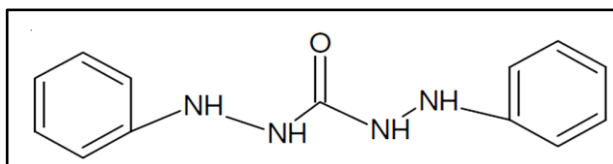
Tal método de medición indirecta de Cr (III) suele ser extenuante, sin embargo es una forma fácil y sencilla de determinar selectivamente una cantidad ultra traza de Cr (III). En este estudio, un sistema FIA es equipado con dos tipos de columnas de cationes y pre-concentración de intercambio aniónico para la especiación de Cr (III) y Cr (VI) [22].

3.4.7.2 *Sistema de inyección en flujo (FIA)*

Los sistemas de inyección en flujo (FIA) comparados con los métodos discontinuos, ofrecen una serie de ventajas significativas para las determinaciones ultra-traza (orden en los microgramos por litro, $\mu\text{g/L}$), entre las cuales se encuentra una mayor eficiencia, más bajo consumo de muestra y reactivos, una precisión mejorada, riesgo reducido de contaminación y un incremento de la frecuencia de muestreo. Varios investigadores han propuesto los métodos on-line, con dos columnas para la determinación simultánea de Cr(III) y Cr(VI) a través de la combinación de la espectrofotometría de absorción atómica con el FIA [23].

Algunos intentos exitosos en la automatización de la retención y elución del cromo en columnas de pre-concentración han sido realizados utilizando los procedimientos on-line de inyección en flujo. Los procedimientos FIA con oxidación en flujo de Cr (III) a Cr (VI) han sido utilizados para los métodos automatizados que utilizan 1,5-difenilcarbazida (DPC), el cual es altamente selectivo al Cr(VI), de forma tal que la DPC reacciona con Cr(VI) en medio ácido para formar un complejo coloreado violeta [24].

Ilustración 1. Estructura molecular del Difenilcarbazida



Fuente: [21]

El Cr (III) en muestras ambientales es usualmente calculado mediante la diferencia entre la concentración de cromo total y la de Cr(VI).

Este método indirecto de determinación de Cr(III) es más bien inconveniente y dificultoso, pero hasta hace poco tiempo atrás no hubo una forma fácil y simple de determinar cantidades ultra-traza de Cr(III) [22]. Los científicos Lim y Jung [12] desarrollaron un sistema FIA equipado con dos tipos de columnas independientes para la pre-concentración en paralelo de las especies de Cr(III) y Cr(VI) conectadas a una válvula de inyección de 6 puertos para la especiación de cromo.

En este trabajo, el sistema FIA fue ideado para contener componentes simples y distintivos para la determinación de Cr (III) y Cr (VI) mediante la elusión secuencial de las dos especies concentradas de cromo en columnas empacadas con adsorbentes aniónicos y catiónicos con un eluyente común.

3.4.7.3 Método de adición estándar

La técnica de adición estándar implica la adición de cantidades conocidas de una solución patrón a la muestra procesada, compensando un constituyente de la muestra que mejora la señal del analito, la absorbancia de cada solución se determina, y seguido a esto los valores recolectados se grafican de tal forma que en el eje horizontal son las concentraciones de los estándares conocidos y en el eje vertical es la absorbancia registrada por el espectrofotómetro.

Para ambas especies de cromo se analizó una muestra con cinco diferentes alícuotas, este método facilita determinar la concentración inicial de la muestra, la cual se determina a partir de la diferencia entre la concentración final determinada con el espectrofotómetro y con la concentración de la alícuota añadida.

3.4.7.4 Uso del adsorbente aniónico Na- clinoptilolita para cromo (III) y adsorbente catiónico Na- clinoptilolita modificada con surfactante (SMZ).

Las zeolitas son minerales porosos conocidos como un intercambiador aniónico, cuyas propiedades permiten ser usados como adsorbentes, adicional, presentan la ventaja de ser abundante en la naturaleza y posee una alta estabilidad química.

La superficie de la Na- clinoptilolita está cargada negativamente, es por esto que se conoce como adsorbente aniónico. Este material es ideal para retener el Cr (III), a diferencia de esta especie para el Cr (VI) es necesario realizar una modificación con surfactante (SMZ), de esta forma la superficie estará cargada positivamente y es denominado como adsorbente catiónico.

3.4.7.5 Parámetros tenidos en cuenta para la ejecución de la metodología

Tabla 4. Parámetros determinantes en la metodología

Parámetro		Método			
		Determinación espectrofotométrica de ultra traza para cromo hexavalente y trivalente mediante el análisis de inyección en flujo con micro-columna acoplada.		Especiación y determinación de cromo en agua potable mediante el análisis por inyección en flujo con micro-columna acoplada (FIA) y detección espectrofotométrica en el ultravioleta-visible (UV-Vis)	
		Cromo (III)	Cromo (VI)	Cromo (III)	Cromo (VI)
Físico	Tipo de adsorbente	Resinas de intercambio catiónico o iónico		Na-clinoptilolita	zeolita modificada con surfactante
	pH (unidades de pH)	1.8	5-6	4-5	5-7
	Flujo	0.5 mL/ min			
	Longitud de onda	548 nm	548 nm	542 nm	542 nm
	Tiempo	-	-	Pre-concentración y elución: 600 seg	
Químico - soluciones	Activación	No requiere	No requiere	NaCl/HCl	NaCl/HCl
				NaCl	NaCl
				Agua MilliQ	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
	Pre-concentración	H ₂ O ₂ + Buffer	NaNO ₃	H ₂ O ₂ +Buffer	DPC
		DPC	DPC	DPC	
	Elución	HCl/KCl	HCl/KCl	KCl	NaBr/NaOH
		H ₂ O ₂ + Buffer	DPC	H ₂ O ₂ +Buffer	DPC
		DPC		DPC	

Fuente: [22], elaboración propia.

4. REACTIVOS, MATERIALES Y METODOLOGÍA

4.1 Reactivos

- Solución patrón de cromo (VI) 1000 ppm
- Solución patrón de cromo (III) 1000 ppm
- Agua destilada
- Agua desmineralizada
- Solución ácido clorhídrico (HCl) 0.2 M
- Solución ácido sulfúrico (H₂SO₄)
- Solución cloruro de potasio (KCL) 0.5 M
- Solución hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 M
- Solución bromuro de sodio (NaBr) 0.5 M
- Solución cloruro de sodio (NaCl) 0.2 M- 0.5 M
- Solución de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTMA) 0.066 M
- Difenilcarbazida (DPC)

4.2 Materiales

Las micro-columnas que han sido mencionadas son el recubrimiento del adsorbente requerido para la pre-concentración de ambas especies de cromo, dicho material es conocido como zeolitas modificadas, el cual es un mineral sometido a una serie de procedimientos. A continuación se presenta una breve explicación de la transformación, aspectos de intercambio iónico y los materiales requeridos para la activación de este material.

4.2.1 Zeolita

Las zeolitas naturales son aluminosilicatos micro-porosos que han sido utilizadas en la remoción de metales pasados y otros cationes contaminantes debido a sus excelentes propiedades adsorbentes y como intercambiadores iónicos[25]. Además, estos materiales tienen la ventaja de ser muy abundantes en la naturaleza y poseer alta estabilidad química.

4.2.1.1 Aspectos del intercambio iónico

Se conoce como intercambio iónico al proceso en el que dos electrolitos intercambian iones y se obtienen nuevos compuestos, teniendo este concepto claro, se procede a explicar que características, cambios físicos y químicos ocurren en la zeolita Na-clinoptilolita y en la zeolita modificada con surfactante.

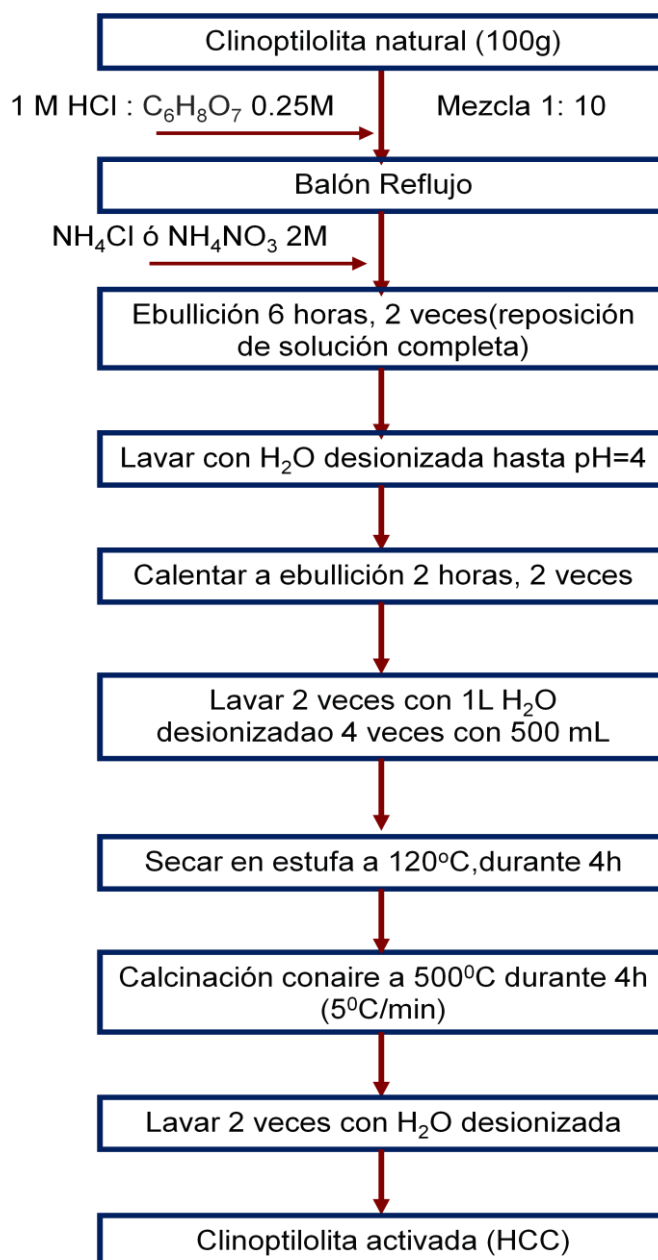
4.2.1.2 Transformación físico-química de la zeolita (HCC)

La estructura que presenta la clinoptilolita es una red de tetraedros SiO₄ y AlO₄, en el que los átomos de silicio y aluminio están en el centro y los oxígenos en los vértices [26]. La carga negativa generada por este tipo de estructura sobre

los tomos de oxígeno ligados al átomo de aluminio es compensada por cationes sodio, potasio, calcio y magnesio. Este tipo de compensación de carga iónica le confiere a la estructura una capacidad de intercambio iónico entre los cationes nativos y cationes en solución.

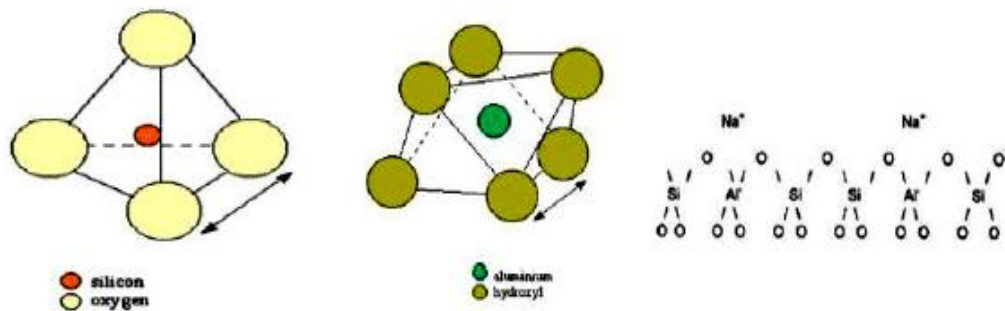
Dado que se requiere la retención de especies de cromo (III) a partir de soluciones acuosas, es necesario realizar una transformación físico-química, según el procedimiento que indica esquema 1.

Esquema 1. Transformación físico-química clinoptilolita



Fuente: [27]

Ilustración 2. Estructura química de la Na-clinoptilolita



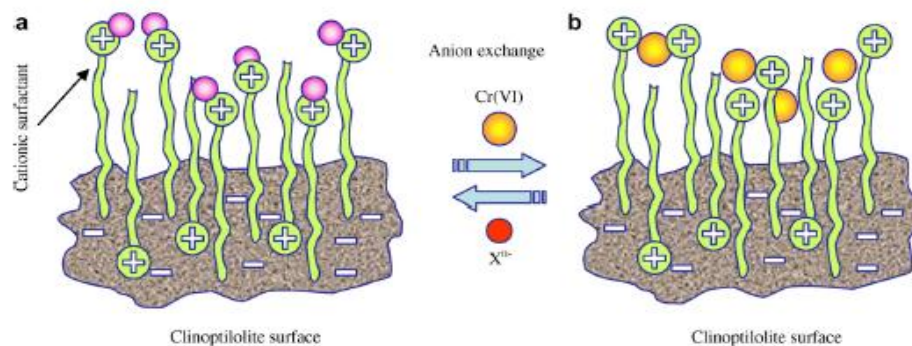
Fuente:[26]

4.2.1.2.1 Zeolita modificada con surfactante (SMZ)

A diferencia de la Na- clinoptilolita, al realizar la activación con bromuro hexadeciltrimetilamonio (HDTMA) la superficie de la zeolita queda cargada positivamente, puesto que el tensoactivo excede la capacidad de cationes en la superficie. [27]

Ahora bien, cada vez que se utilice este adsorbente catiónico será necesario hacer una activación con HDTMA, con el fin de cargar positivamente la superficie y se fije el cromo (VI) de la muestra.

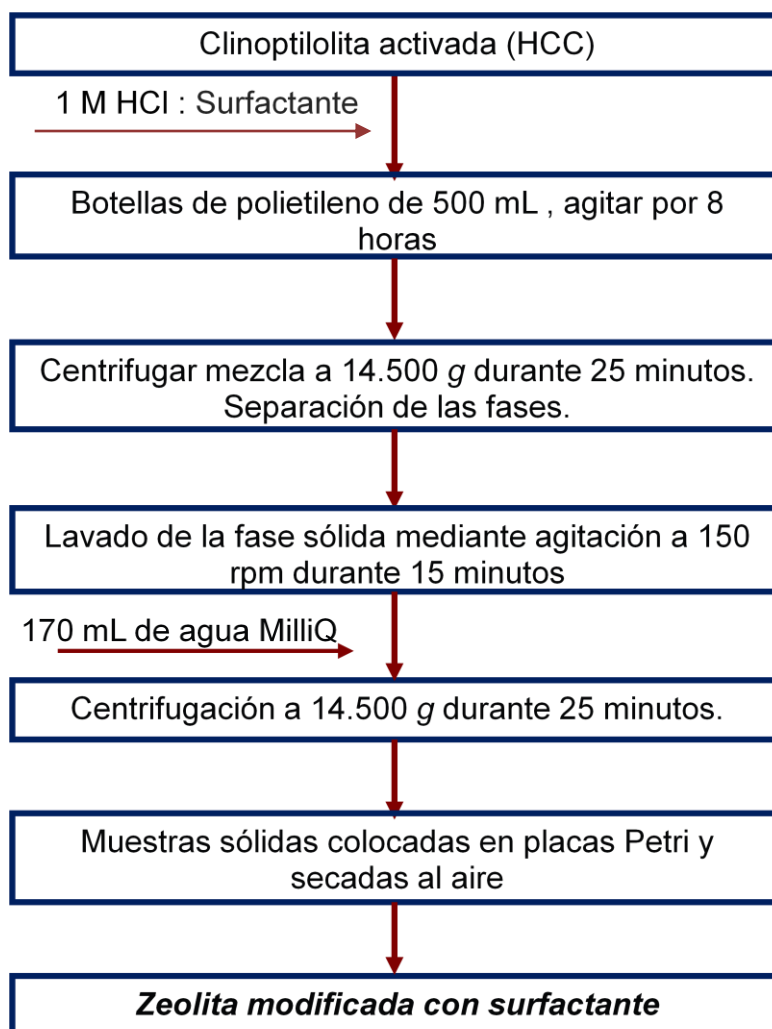
Ilustración 3.Activación de zeolita modificada con surfactante (SMZ)



Fuente: [27]

4.2.1.3 Transformación físico-química de la zeolita modificada con surfactante

Esquema 2. Transformación físico-química zeolita modificada con surfactante



Fuente: [27]

Materiales para la transformación de la zeolita

1. Balanza analítica.
2. Clinoptilolita natural (100 g)
3. Balón volumétrico 500 mL
4. Botella de polietileno 500 mL
5. Centrífuga
6. Agitador rotatorio
7. Placas Petri (2)
8. pH-metro
9. Agua milliQ
10. Quemador Bunsen
11. Estufa – 120°C

12. Mufla - 500°C –

Reactivos para la transformación de la zeolita

1. Zeolita natural (mineral granulado)
2. Ácido clorhídrico líquido
3. Ácido cítrico sólido
4. Cloruro de amonio sólido
5. Bromuro de hexadecil-trimetil amonio (HDTMA-Br)

4.2.2 Vidriería y equipos

- Volumétrico de 500 mL y 100 ml
- Probeta
- Pipeta y micro pipeta
- Bastón de vidrio
- Beakers 100mL y 500 mL
- Tubos Tygon
- Espectrofómeto UV/Visible
- Bomba peristáltica 8 canales

4.3 Sistema FIA

El sistema de inyección en flujo (FIA) cuenta con dos micro-columnas de plástico de 4 mm diámetro interno × 30 mm de longitud acopladas a tubos de teflón (PTFE) 1/16", cuyo diámetro externo (OD) y diámetro interno (ID) son de 0.03".

El sistema FIA consiste en un arreglo "manifold" sin válvula de inyección funcionando en tres secciones independientes. El arreglo FIA es montado a partir del kit de montaje S-2030 – Fialab-2500.

El diseño del sistema está compuesto en una sección independiente para la pre-concentración de las muestras de agua que consta de cuatro canales independientes de tubos Tygon[®], conectados a una bomba peristáltica (PP) Gilson Minipuls 3, para impulsión de líquidos.

Ilustración 4. Equipo GE Ultropsec 2100 Pro Spec UV Vis para la detección y determinación de Cr(VI) en las muestras de agua.



Fuente:[28]

Ilustración 5. Bomba peristáltica utilizada para el transporte de líquidos (soluciones y muestra).

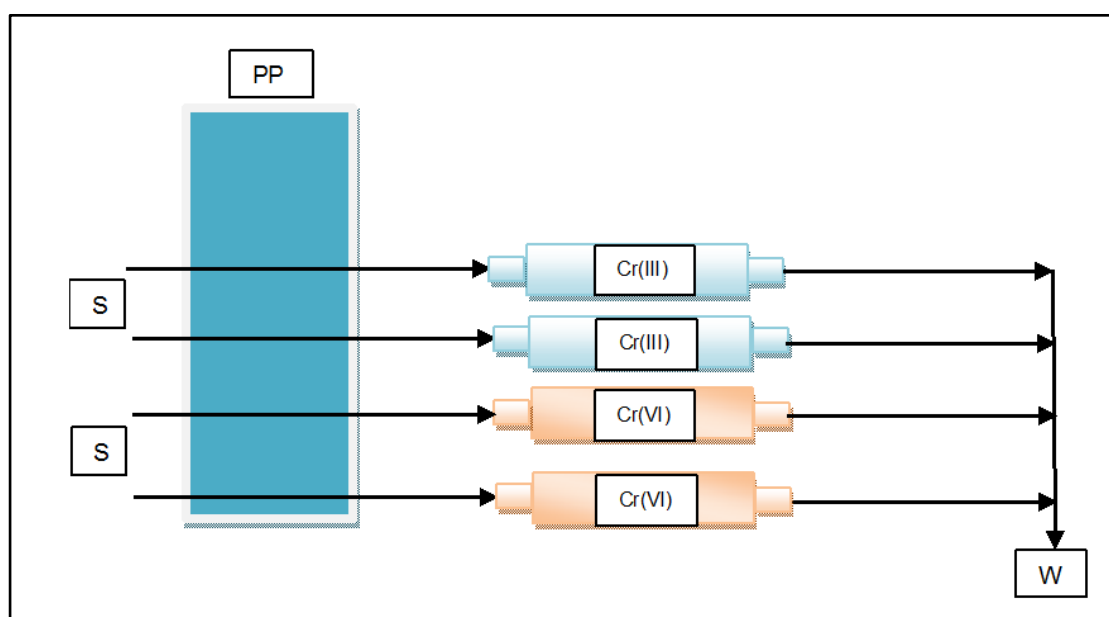


Fuente:[29]

4.3.1 Sección 1- Transporte de líquidos

Los tubos Tygon® fueron conectados a ambos lados de los tubos PTFE 1/16", mientras que el segmento anterior a la bomba, los tubos PTFE se introdujeron en la muestra de agua potable y en el lado posterior de la bomba estos tubos están directamente conectados a cuatro cápsulas (micro-columnas, MC), de las cuales dos fueron empacadas con el adsorbente aniónico Na-clinoptilolita para la pre-concentración de Cr(III) y dos cápsulas empacadas con adsorbente catiónico ("surfactant modified zeolite", SMZ) para la pre-concentración de Cr(VI). Las cuatro cápsulas o micro-columnas van en su parte posterior conectadas a tanques colectores de desechos líquidos (W).

Ilustración 6. Diseño del arreglo de transporte de líquidos FIA en el modo de pre-concentración en una sección.



Fuente: [Elaboración Propia]

En el modo de elución del Cr (III) de su micro-columna (Ilustración 5) solo funcionaron los nodos 1 y 2. En la elución del Cr (VI) solo funcionaron los nodos 3 y 4.

Adicional a esta primer parte del montaje, se tuvieron otras dos secciones diseñadas para la elución independiente (y no simultánea) de las muestras; una de estas secciones es la línea de elución del Cr (III), y en segunda se realizó la elución del Cr (VI).

4.3.2 Sección 2- Elución de Cr (III)

El montaje estuvo compuesto por tres canales de tubos tygon®, los cuales estaban instalados a la bomba peristáltica, simultáneo a esto, los tubos se conectaron en su parte anterior a tubos PTFE que fueron introducidos en una mezcla de eluyente KCl 0.5 M, una solución oxidante + buffer (H₂O₂ 0,22 mL al 50% + 10 mL NaOH/Na₂CO₃ 0.1 M) solución quelante 0.5 M de difenilcarbazida.

El canal del eluyente estaba directamente conectado a la micro-columna empacada con Na-clinoptilolita y a su salida, esta línea fue mezclada con el canal del oxidante (H_2O_2 + buffer) para la oxidación del Cr (III) a Cr (VI) en el interior de un enrollado ("coil") de oxidación (OC) de PTFE con 2.5 m de longitud.

La línea de la salida del líquido OC se unió al canal (tubo PTFE) que transportó el reactivo quelante (difenilcarbazida) y la mezcla entró en un enrollado ("coil") de reacción (RC), este procedimiento se llevó a cabo en un tubo de PTFE de 1.0 m de longitud donde ocurrió la formación del complejo Cr(VI)-difenilcarbazida.

La línea a la salida del RC transportó directamente a través de un tubo PTFE a una celda en flujo insertada en la porta muestras del detector del espectrofotómetro ultravioleta visible (UV-Vis), el cual fue el encargado de medir las especies de Cr (III) cuantificadas como Cr (VI).

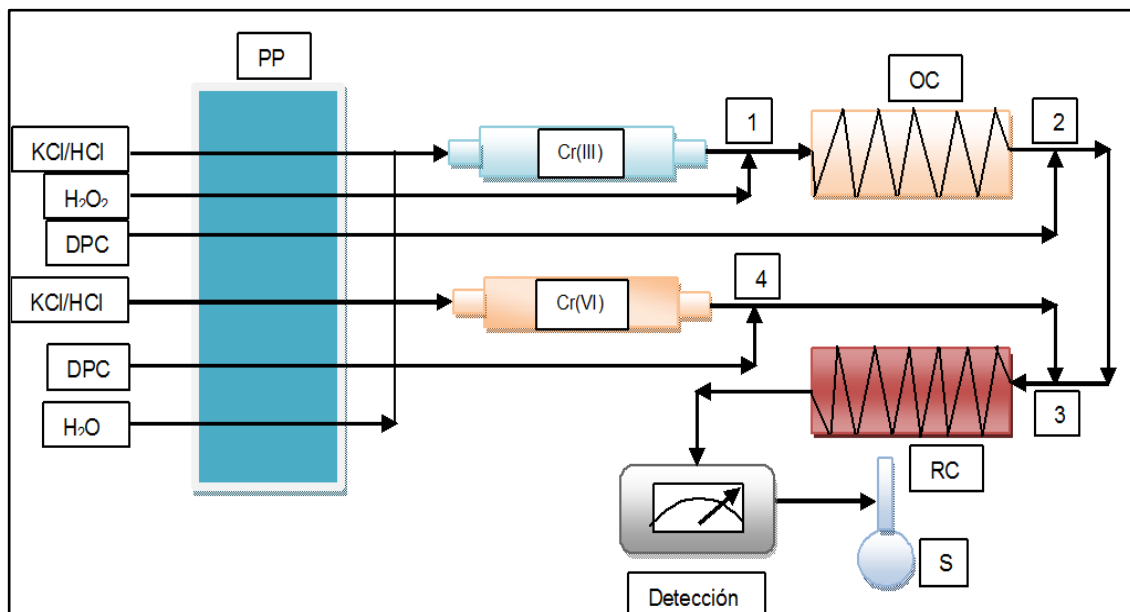
4.3.3 Sección 3- Elución del Cr (VI)

Consiste en dos canales de tubos Tygon[®] independientes que se conectaron en la parte anterior de la bomba peristáltica a tubos PTFE que fueron introducidos en contenedores con soluciones del eluyente (NaBr 0.5 M/ NaOH 0.1 M) y de difenilcarbazida.

En la parte posterior de la bomba peristáltica, los tubos PTFE transportaron el eluyente hacia la entrada de la micro-columna empacada con SMZ y solución de difenilcarbazida que se mezcló con el eluato a la salida de la micro-columna. Esta mezcla entró directamente en el enrollado ("coil") de reacción RC donde se formó el complejo Cr (VI)-difenilcarbazida. A la salida del RC, el complejo formado fue transportado en línea de tubo PTFE directamente hacia la celda en flujo situada en el porta muestras del espectrofotómetro UV-Vis.

En el modo de elución el espectrofotómetro UV-Vis es usado para la detección en flujo del complejo de Cr (VI)-difenilcarbazida, el cual registró una curva de ruptura gaussiana de absorbancia (o de concentración) con un máximo y una lectura mínima, próxima a cero, que indicó la descarga total de las micro-columnas para las dos especies de cromo.

Ilustración 7. Diseño del arreglo de transporte de líquidos FIA en el modo de elución en dos secciones.



Fuente: [Elaboración Propia]

En las dos secciones de elución los líquidos, consistentes en complejos Cr (VI)-difenilcarbazida, fueron colectados en probetas de 100 mL para la posterior determinación de las concentraciones de Cr (VI) primero en los eluatos y posteriormente, mediante ley de la volumetría, las concentraciones de Cr (VI) y de Cr (III) en las muestras de agua.

En el arreglo de transporte en el modo de pre-concentración (ilustración 4), la bomba peristáltica (PP) sólo transporta la muestra de agua hasta que estas se cargan en una fracción de cobertura del 30 y del 60% para el Cr (VI) y Cr (III), respectivamente. Este proceso fue controlado por un volumen $V_B = V_{muestra}$ y un tiempo de bombeo T_B .

4.4 Metodología

Con el fin de llevar a cabo la ejecución del método aquí planteado se han establecido tres etapas claves, estas son: La activación de las micro-columnas, la pre-concentración y la elución de las muestras.

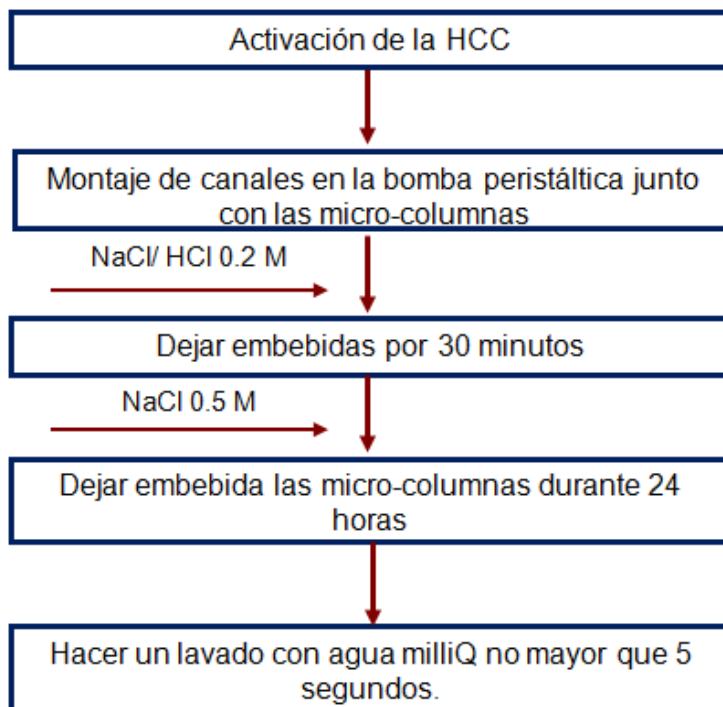
4.4.1 Cromo (III)

4.4.1.1 Activación de micro-columnas

La activación de las micro-columnas de Cr (III) se realizó con dos únicas soluciones, cloruro de sodio junto con ácido clorhídrico 0.2 M y una segunda cloruro de sodio 0.5 M, la función química de estas soluciones están relacionadas con el acondicionamiento de la superficie, es decir en medio ácido el HCl/ NaCl elimina los cationes que bloquean los sitios de intercambio iónico, posterior a esto se hace uso de cloruro de sodio 0.5M para sodificar la superficie, y alcalinizar la zeolita.

Estas soluciones no representan un alto riesgo para el medio ambiente ni para la salud de quien las manipula, dado que las concentraciones en las que se están empleando son bajas.

Esquema 3. Activación de la HCC



Fuente: [Elaboración Propia]

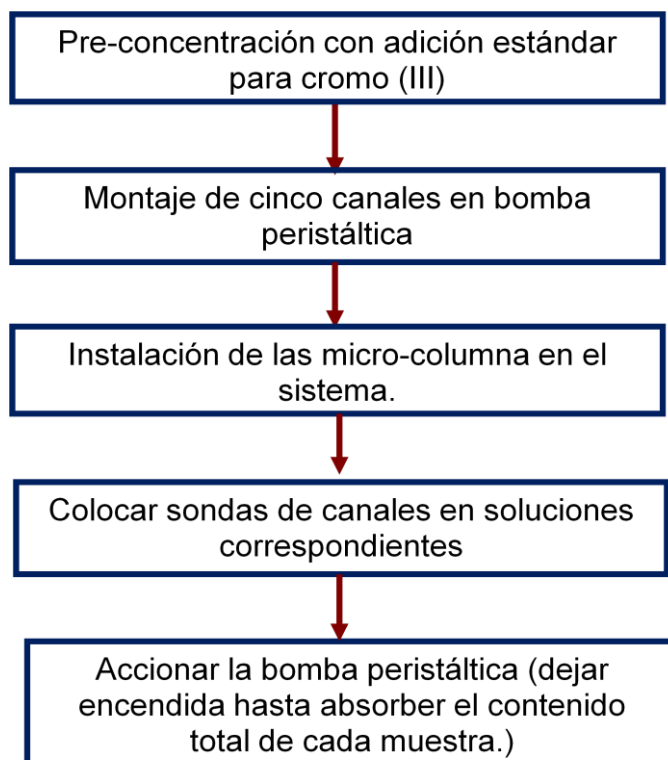
4.3.1.1 Pre-concentración con adición estándar para cromo (III)

Luego de la óptima activación de las micro-columnas es posible pasar la muestra a través del adsorbente aniónico, para ello se dividió la muestra del agua de grifo en cinco volumétricos diferentes, dado que a cada uno se le añadió una alícuota diferente del patrón de cromo (III) 10 ppm, es importante que todo el volumen sea absorbido y no dejar residuo de la muestra en el recipiente.

Se recomienda limpiar el sistema con HNO_3 0.05 M durante 5 min sin micro-columna a 10 rpm, luego una corrida con agua destilada durante 5 minutos sin micro-columna a 10 rpm.

Las alícuotas de cromo (III) que van a ser añadidas en cada volumétrico son: 0.408, 0.612, 0.816, 1.02 y 1.22

Esquema 4. Pre-concentración con adición estándar para cromo (III)



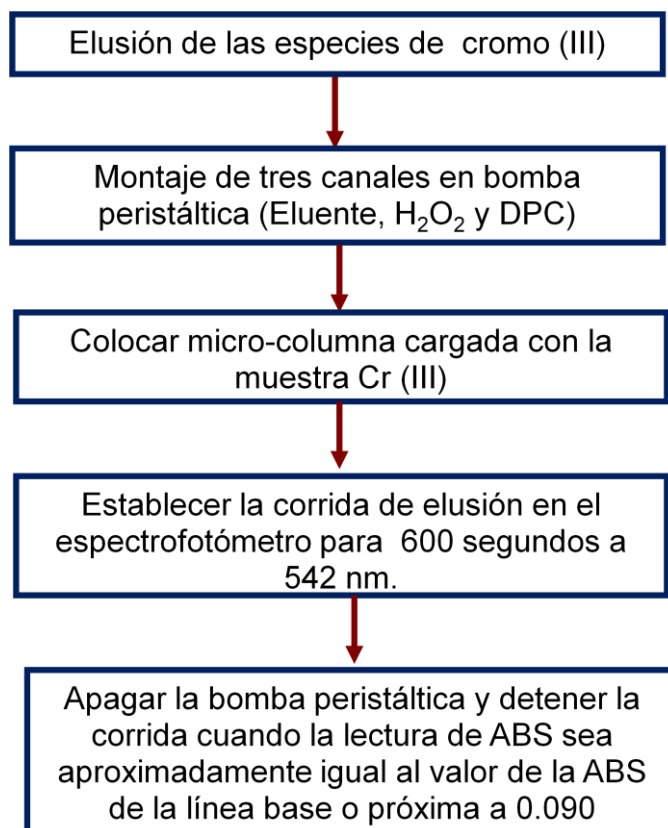
Fuente: [Elaboración Propia]

4.3.1.2 Elusión de Cr (III)

La elusión consiste en reemplazar el analito adsorbido por la micro- columna con un catión en este caso se eligió la solución cloruro de potasio, en el K^+ desplaza al Cr^3+ al tener un radio mayor.

Al salir el Cr (III) reacciona con la solución oxidante en el coil de oxidación, dado que, ya como se expuso anteriormente, el espectrofotómetro detecta únicamente cromo hexavalente, antes de ser conducido al espectrofotómetro ingresa al coil de reacción con la DPC para desarrollar color.

Esquema 5. Elusión de especies de cromo (III)



Fuente: [Elaboración Propia]

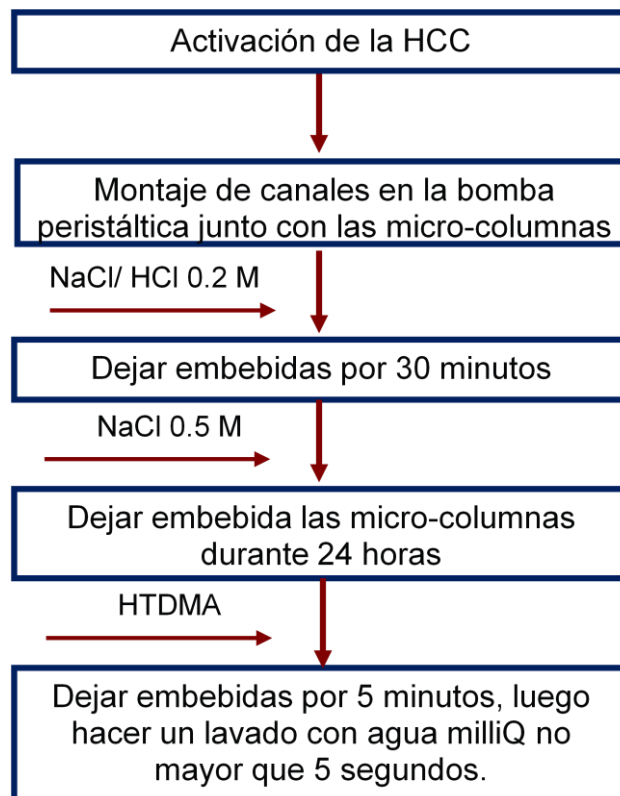
4.3.2 Cromo (VI)

4.3.2.1 Activación de Cromo (VI)

A diferencia de la activación de las micro-columnas de Cr (III), la MC de Cr (VI) requieren una solución adicional, es referente bromuro de hexadeciltrimetilamonio 0.2 M, el tensoactivo prepara la superficie de la zeolita modificada para que los iones de Cr⁺ se enlacen fácilmente.

El tensoactivo al enfriarse tiene a formar pequeños cristales, para esto se recomienda pasar la solución un poco tibia y luego hacer una corrida no mayor que 5 segundos para retirar el exceso del mismo.

Esquema 6. Activación de SMZ



Fuente: [Elaboración Propia]

4.3.1.1 Pre- concentración con adición estándar para Cr (VI)

La pre- concentración de las especies de Cr (VI) no difiere de la pre- concentración realizada para las especies de Cr (III), así que es el mismo procedimiento para ambos.

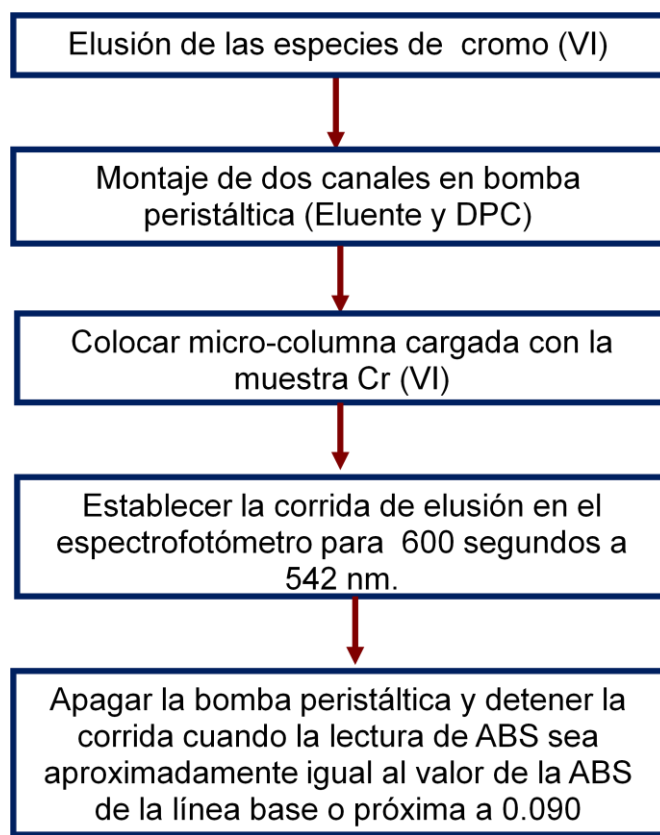
Las alícuotas de cromo (VI) que van a ser añadidas en cada volumétrico son: 0.24, 0.36, 0.48, 0.6 y 0.72

Se recomienda limpiar el sistema con HNO_3 0.05 M durante 5 min sin micro- columna a 10 rpm, luego una corrida con agua destilada durante 5 minutos sin micro- columna a 10 rpm.

4.3.1.2 Elusión de Cr (VI)

La solución eluyente para el cromo hexavalente es bromuro de sodio (NaBr) 0.5 M+ hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 M, en el que el Br^- reemplaza al Cr^- , este tiene características físico-químicas que hacen que el cromo se desplace totalmente de la MC, gracias a que tiene un mayor radio iónico y requiere menor energía de hidratación.

Esquema 7. Elusión de especies de cromo (VI)



Fuente: [Elaboración Propia]

4.3.2 Recobrado

La fase del recobrado se compone de la pre-concentración y la elución. El recobrado es determinado con el fin de establecer la capacidad de la micro-columna para retener únicamente el cromo (III o VI) presente en la muestra, y luego así proceder a la elución, la sumatoria de ambos resultados se comparan con el Cr inicial, este último es conocido dado que es preparado a partir de una solución patrón del analito.

4.3.2.1 Pre- concentración de Cr (III)

Esta etapa se lleva a cabo a partir de una solución patrón de cromo, en este caso para cada especie de cromo se realizó con una concentración de 10 ppm.

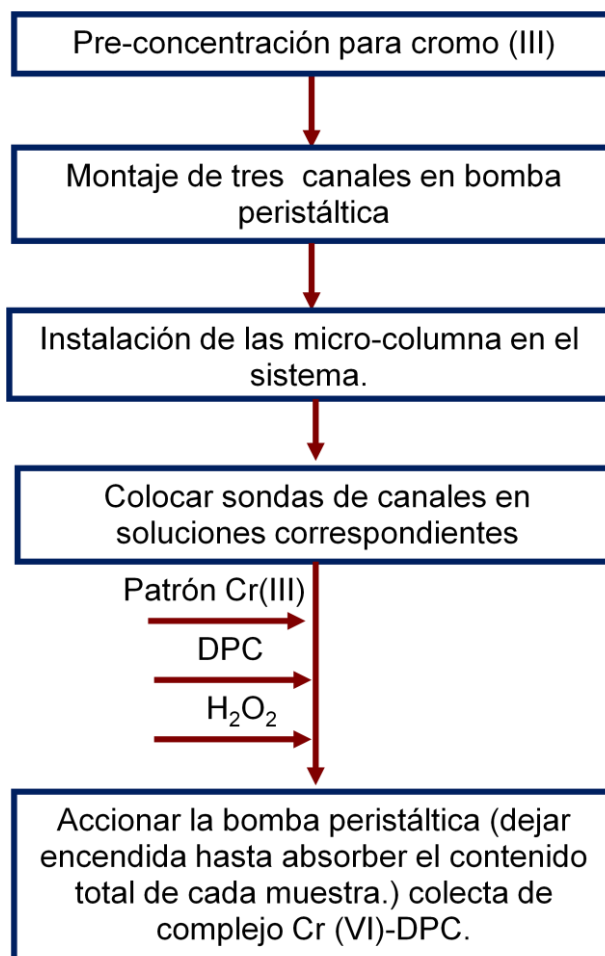
Es importante desarrollar esta etapa con el sistema limpio, para ello se emplea una solución de ácido nítrico 0.05 M y luego un paso rápido con agua destilada.

Para el cromo (III) es necesario tener una solución oxidante, la importancia de este radica en que el espectrofotómetro mide únicamente Cr (VI), siendo así el peróxido la solución que oxida al Cr (III) junto con una solución.

Se recomienda limpiar el sistema con HNO_3 0.05 M durante 5 min sin micro-columna a 10 rpm, luego una corrida con agua destilada durante 5 minutos sin micro-columna a 10 rpm.

La solución de Cr (III) será colocada en una probeta graduada ocupando exactamente un volumen de 25 mL. La sonda a la salida de la celda del detector espectrofotométrico será colocada en el interior de una segunda probeta graduada con 3 mL de solución 0.5 M de DPC para colecta del complejo Cr (VI)-DPC.

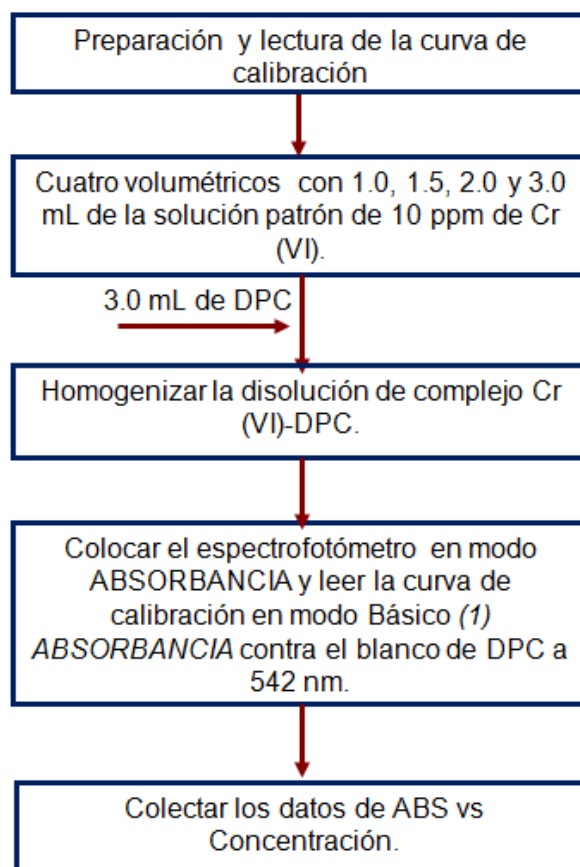
Esquema 8. Pre-concentración de cromo (III)



Fuente: [Elaboración Propia]

Es necesario elaborar una curva de calibración para determinar la concentración final del cromo no retenido, en el esquema 9 se da el paso a paso de la preparación y la lectura en el espectrofotómetro.

Esquema 9. Preparación curva de calibración



Fuente: [Elaboración Propia]

4.3.2.2 Pre- concentración de Cr (VI)

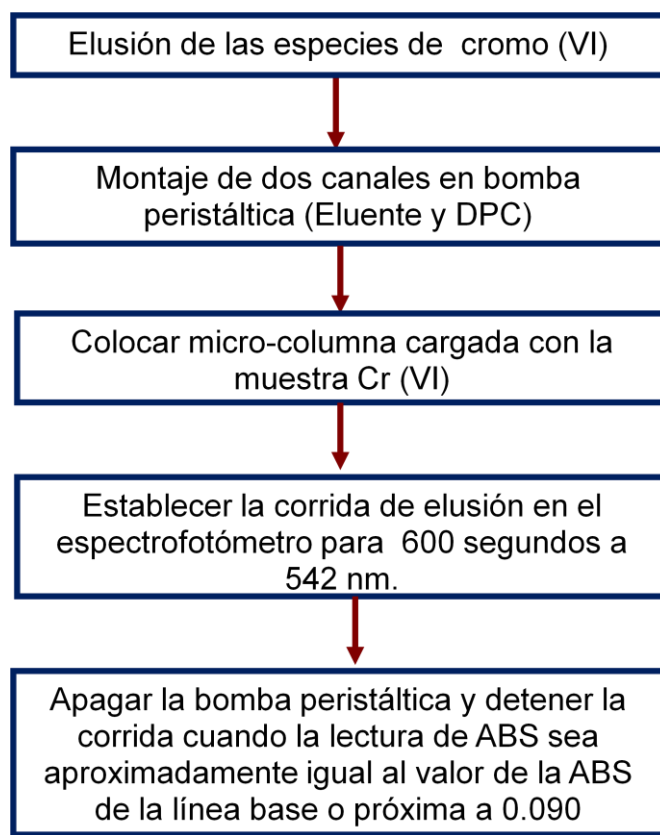
La pre- concentración de las especies de Cr (VI) no difiere de la pre- concentración realizada para las especies de Cr (III), así que es el mismo procedimiento para ambos.

La solución de Cr (VI) será colocada en una probeta graduada ocupando exactamente en un volumen de 25 mL. La sonda a la salida de la celda del detector espectrofotométrico será colocada en el interior de una probeta graduada con 3 mL de solución 0.5 M de DPC para colecta del complejo Cr (VI)-DPC.

4.3.2.3 Elusión de Cr (VI)

La sonda a la salida de la celda del detector espectrofotométrico será colocada en el interior de una probeta graduada con 3 mL de solución 0.5 M de DPC para colectar el complejo Cr (VI) -DPC.

Esquema 10. Elusión de especies de cromo (VI)



Fuente: [Elaboración Propia]

4.3.3 Preparación de curvas de calibración cromo (VI)

Serán preparados una serie de estándares de calibración (hasta seis niveles) mediante la dilución del analito en el estándar de dilución primario (PDS) en agua des-ionizada.

El estándar de calibración más bajo deberá estar en o por debajo de la concentración del mínimo valor reportable (MRL). Los estándares de calibración también podrán ser utilizados como estándares de calibración continua (CCCs).

1. RESULTADOS Y ANÁLISIS

A las muestras de agua tomadas del grifo de la Universidad Santo Tomas, Sede Chapinero- Bogotá se les realizó 3 réplicas $\times$ 3 medidas por réplica $\times$ 2 especies iónicas, las cuales fueron pre-concentradas en micro-columnas acopladas con zeolita.

Los volúmenes de muestras son de 120 a 50 mL y fueron contruidos mediante la adición a estas de alícuotas de soluciones estándar de Cr (III) y Cr (VI) de forma tal que la solución final se encuentre en intervalos de $4 - 80 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr + una muestra sin estándar. Las áreas de los picos de elución fueron graficadas contra las concentraciones de los estándares adicionados para cada una de las especies de Cr analizadas. Para el Cr (VI) el sistema se caracterizó por concentración inicial de Cr: 10 ppm, volumen final: 120 mL, número de adiciones + muestra sin adición (n): 6, sistema formador de complejo: solución de DPC 0.5 M, eluente: solución NaBr/NaOH 0.5:0.1M, masa de adsorbente: 0.030 – 0.080 g, velocidad de la bomba peristáltica: 8 rpm, tiempo máximo de corrida para la pre-concentración y elución: 600s. Para el Cr (III) se utilizaron condiciones idénticas de pre-concentración y elución pero utilizando solución 30 – 60 mM de H_2O_2 en solución buffer de $\text{NaCO}_3/\text{NaOH}$ 0.05:0.01 M, eluente solución 0.5 M KCl.

El área de los picos de elución de Cr (VI) y de Cr (III) fueron graficados contra la concentración de estándar adicionado y la concentración de Cr en las muestras fue determinada por extrapolación en el eje de las concentraciones (x) para el valor de área del pico (y) igual a cero. Los recobrados para la pre-concentración y la elución de Cr (III) y Cr (VI) con muestras sintéticas fueron estimados mediante la fórmula:

$$R(\%)_{\text{prec/elu}} = \frac{n_{\text{ini}} - n_{\text{noret}}}{n_{\text{elu}}} \times 100 \quad (1)$$

En la ecuación (1) n_{ini} , n_{noret} y n_{elu} son los números de moles de Cr (III) o Cr (VI) iniciales, no retenidos y eluidos en la pre-concentración y la elución, respectivamente. Los recobrados para los métodos de adición de estándar fueron estimados mediante la fórmula:

$$R(\%)_{\text{método}} = \frac{A_{S+Std} - A_S}{A_{Std}} \times 100 \quad (2)$$

En ecuación (2) A_{S+Std} , A_S y A_{Std} corresponden a las áreas de los picos de elución de la muestra + un estándar de Cr de concentración conocida, el área del pico correspondiente a la muestra (intercepto en los respectivos gráficos de calibración) y el área del pico del estándar sin la muestra, respectivamente. Este cálculo puede ser también realizado a partir de las correspondientes concentraciones calculadas.

Los límites de detección (LOD) y de cuantificación del método (LOQ) fueron estimados a partir de los datos de áreas de picos de Cr (III) y Cr (VI) en 50 mL de cuatro reactivos blancos igualmente preparados conteniendo todos los componentes de la elusión menos el analito y contruidos en agua desionizada. Los picos fueron integrados contra un blanco de agua desionizada y los respectivos LOD y LOQ fueron calculados a partir de $3\times\sigma$ y $10\times\sigma$ de los valores de las áreas de los blancos para Cr (III) y Cr (VI), respectivamente.

Tabla 5. Resumen de las condiciones de pre-concentración y elusión en flujo en el métodos FIA.

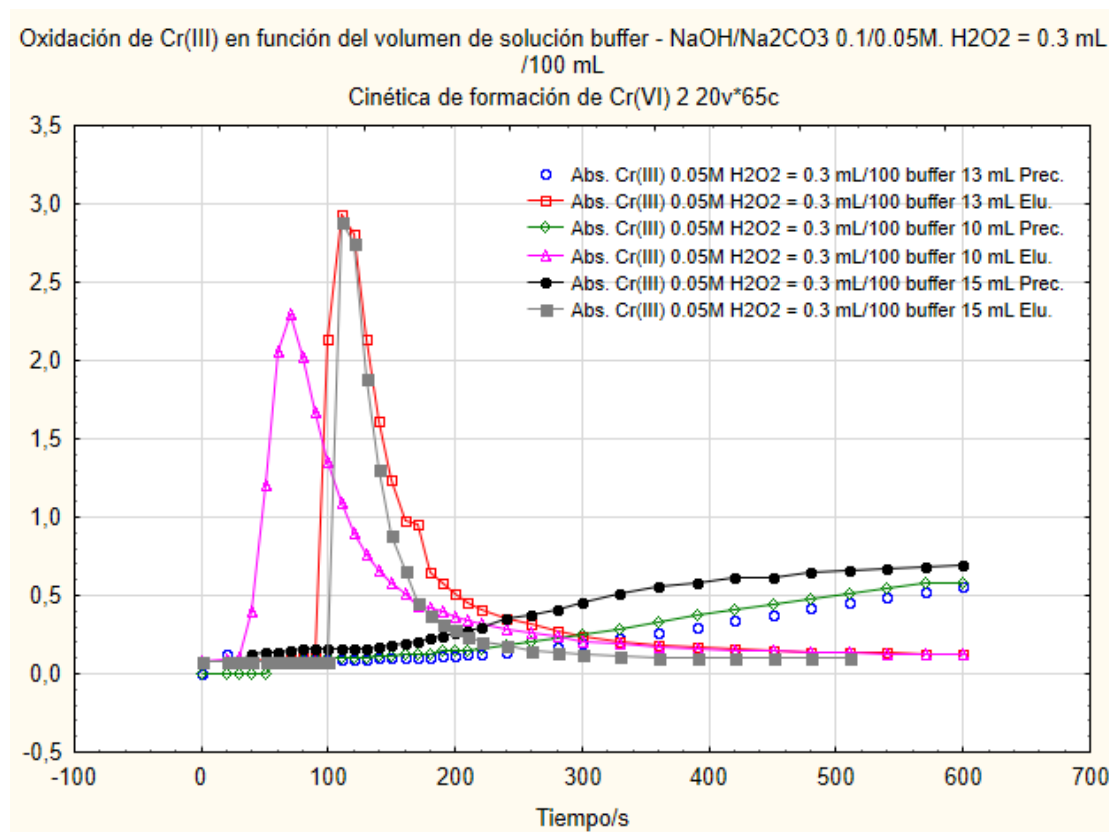
Condiciones pre-concentración/elusión	Cromo III	Cromo VI
Tiempo de pre-concentración equipo (seg)	600	600
Tiempo de elusión(seg)	400	300 - 600
Volumen colectado en pre-concentración(mL)	32	19
Flujo de pre-concentración	0.8 – 1.0 mL min ⁻¹	0.8 – 1.0 mL min ⁻¹
Velocidad de la bomba	8 rpm	8 rpm
Reactivo formador de complejo	DPC 0.5 M /H ₂ SO ₄ /Acetona	DPC 0.5 M /H ₂ SO ₄ /Acetona
Oxidante	H ₂ O ₂ /Na ₂ CO ₃ /NaOH 30 – 60 mM/0.05/0.01M	-
Eluente	KCl 0.5 M, pH 5 - 6	NaBr/NaOH 0.5/0.1 M
Tipo de adsorbente	Na-clinoptilolita 75 – 125 μ m	Na-SMZ 100 – 150 μ m
Masa de adsorbente, g	0.030 – 0.080	0.030 – 0.080
Soluciones de activación	NaCl/HCl 0.1 M, NaCl 0.5 M	NaCl/HCl 0.1 M, NaCl 0.5 M / Br-HDTMA 0.066 M

Fuente: [Elaboración Propia]

Los picos de elusión de Cr (III) asociados a la gráfica 1 muestran gran simetría y resultaron ser más estrechos que los picos obtenidos para el Cr (VI), siendo esto probablemente debido al diferente tipo de interacción de las especies iónicas con la matriz adsorbente. En el caso del Cr (III) la interacción iónica electrostática más débil con el sitio de intercambio permite al eluente un relativamente más fácil o menos energético reemplazo, además de una distribución

energéticamente homogénea de los tipos de sitio de intercambio en la Na-clinoptilolita.

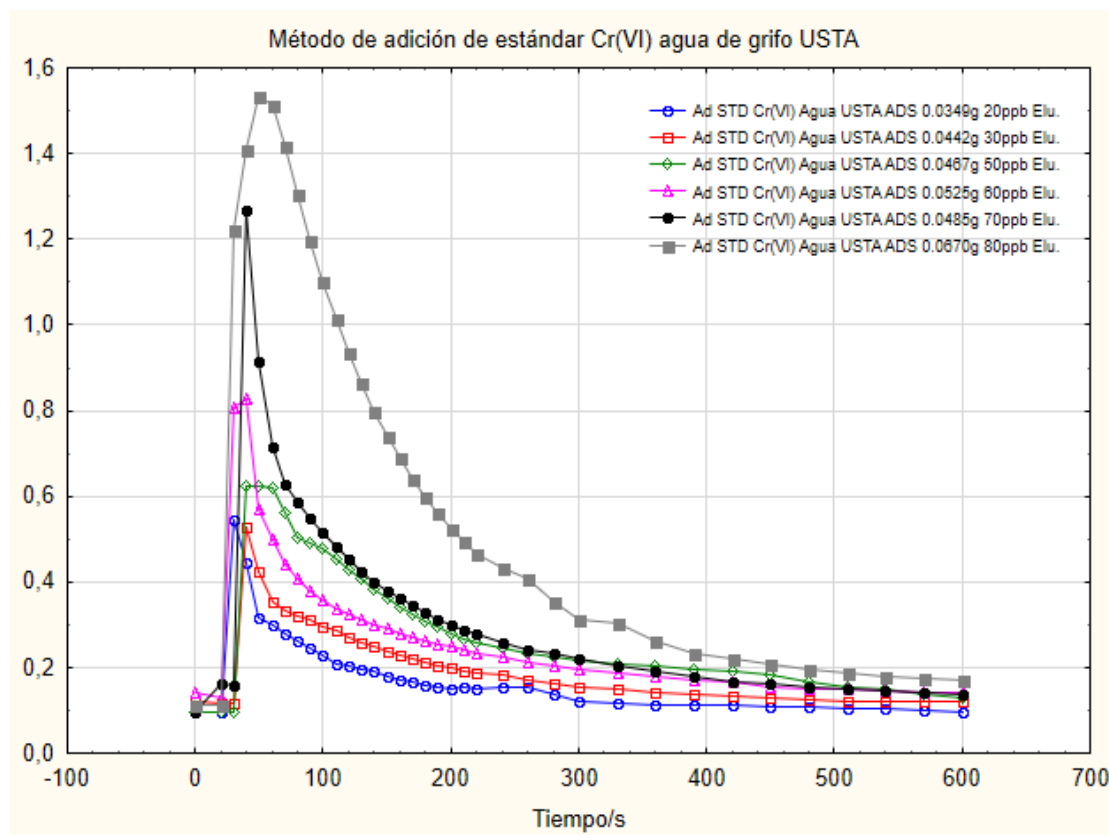
Gráfica 1. Pre-concentración y elución de Cr (III) 0.05 mg L⁻¹ en función del volumen de solución buffer (NaOH/Na₂CO₃ 0.1/0.05 M), H₂O₂ 50 mM.



Fuente: [Elaboración Propia]

Por otro lado, el anión cromato (CrO_4^{2-}) muestra a través de la asimetría de los picos de elución (gráfica 2) una mayor interacción con los sitios R_4N^+ del surfactante en la SMZ, más posiblemente formando un fuerte enlace N-O del surfactante y del cromato respectivamente.

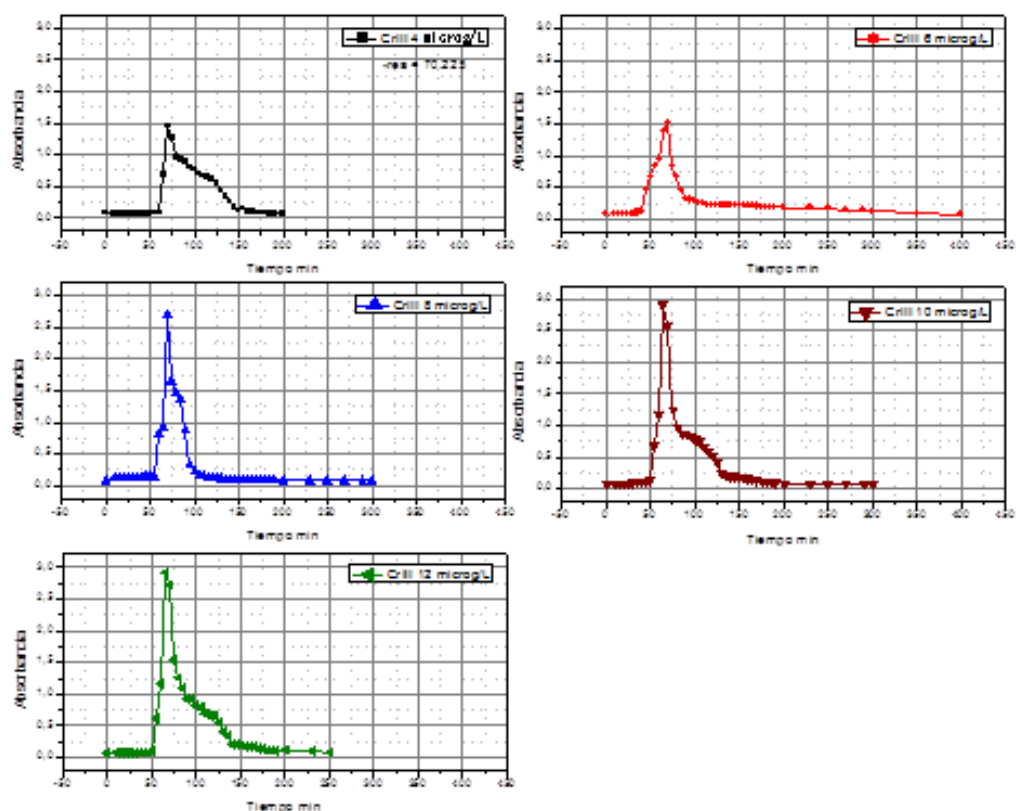
Gráfica 2. Curvas de elución en el método de adición de estándar para muestras de agua de grifo (USTA) para concentraciones de Cr (VI) de 20 – 80 $\mu\text{g L}^{-1}$.



Fuente: [Elaboración Propia]

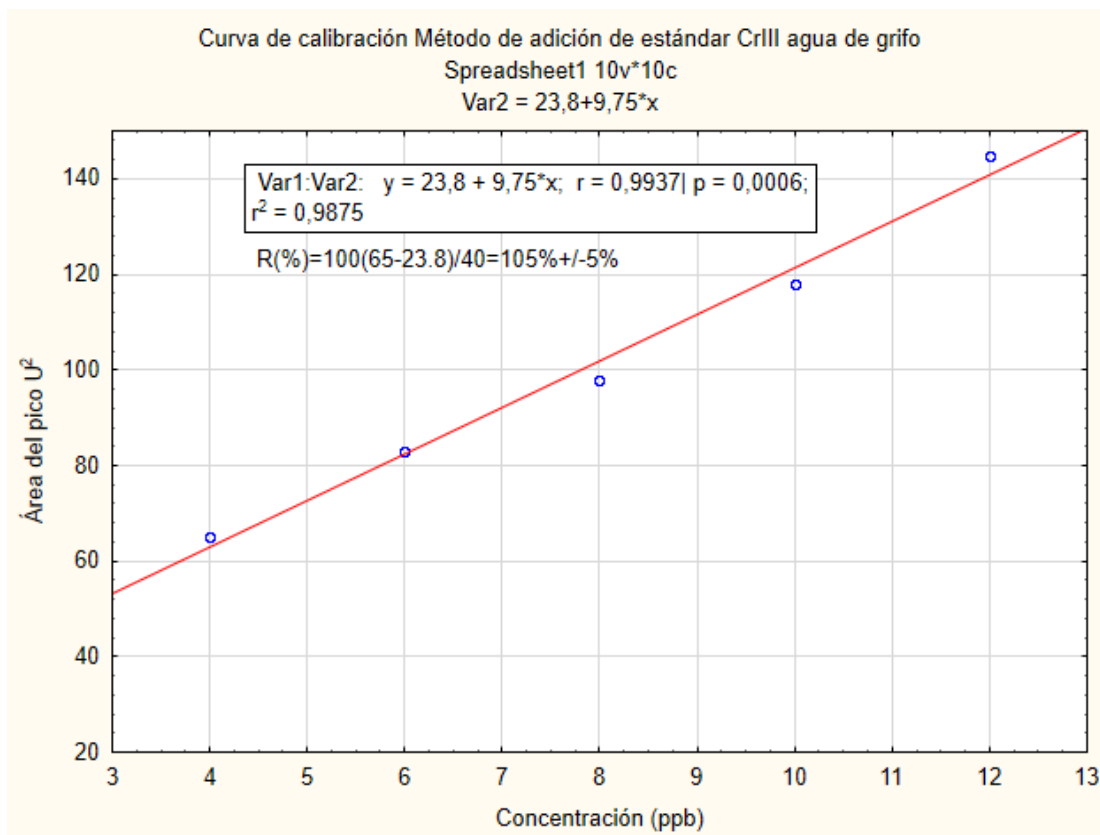
Los picos de elución (gráfica 3) y las curvas de calibración en el método de adición de estándar para el Cr (III) sobre muestras de agua de grifo de la USTA (gráfica 4) muestran una buena correlación entre las áreas de los picos y las concentraciones de Cr (III), lo cual permite una estimación bastante precisa de las concentraciones de Cr (III) estimadas para las muestras del estudio, a pesar de que la estimación de la concentración de esta especie en muestras de agua de grifo es fuertemente dependiente de eficiente eliminación del cloro desinfectante libre contenido en este tipo de muestra. En este estudio este tipo de especie fue eliminada mediante la adición de cantidades de amonio tales que formaran soluciones 3 mg L^{-1} en las muestra a ser pre-concentradas.

Gráfica 3. Picos de absorbancia contra tiempo de elución para concentraciones de Cr (III) entre las concentraciones 4–12 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cr en el método de adición de estándar para las muestras de agua sintética.



Fuente: [Elaboración Propia]

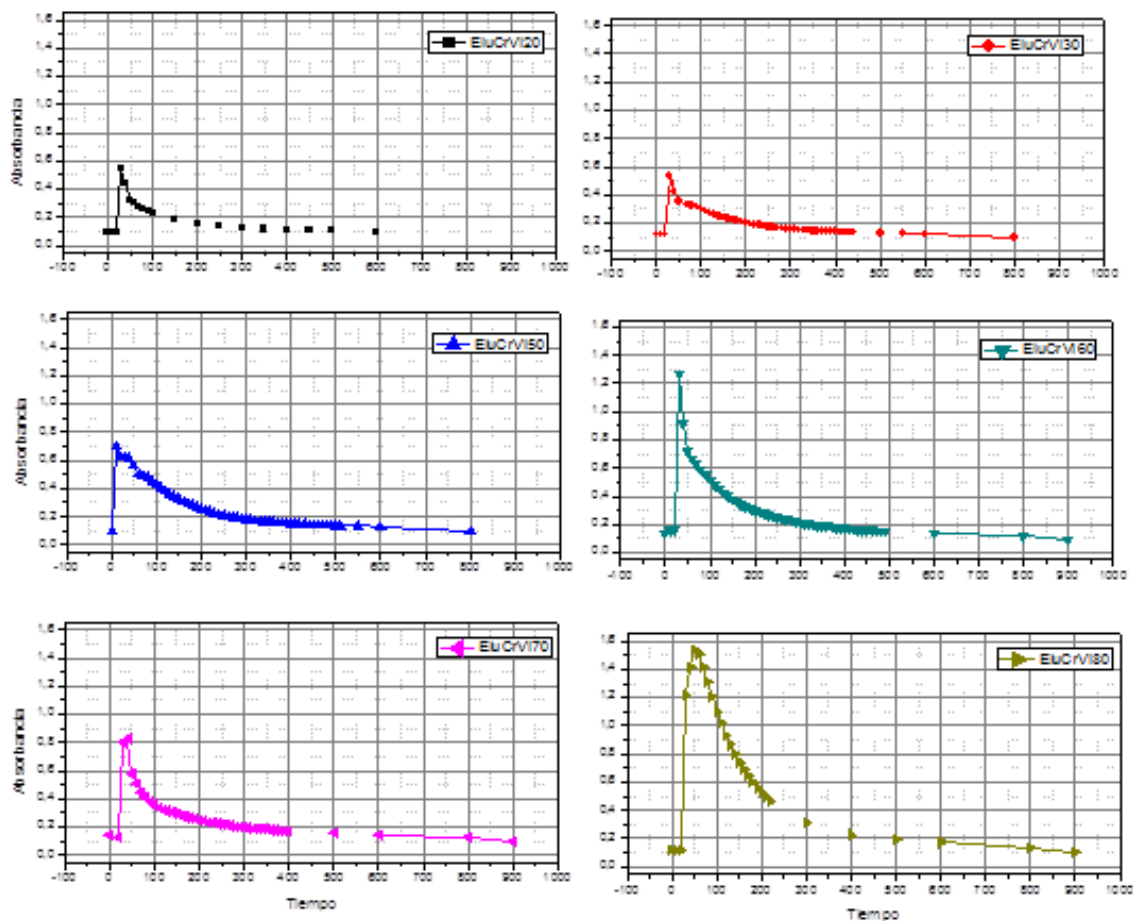
Gráfica 4. Curva de calibración de método de adición de estándar Cr (III) en muestras de agua de grifo.



Fuente: [Elaboración Propia]

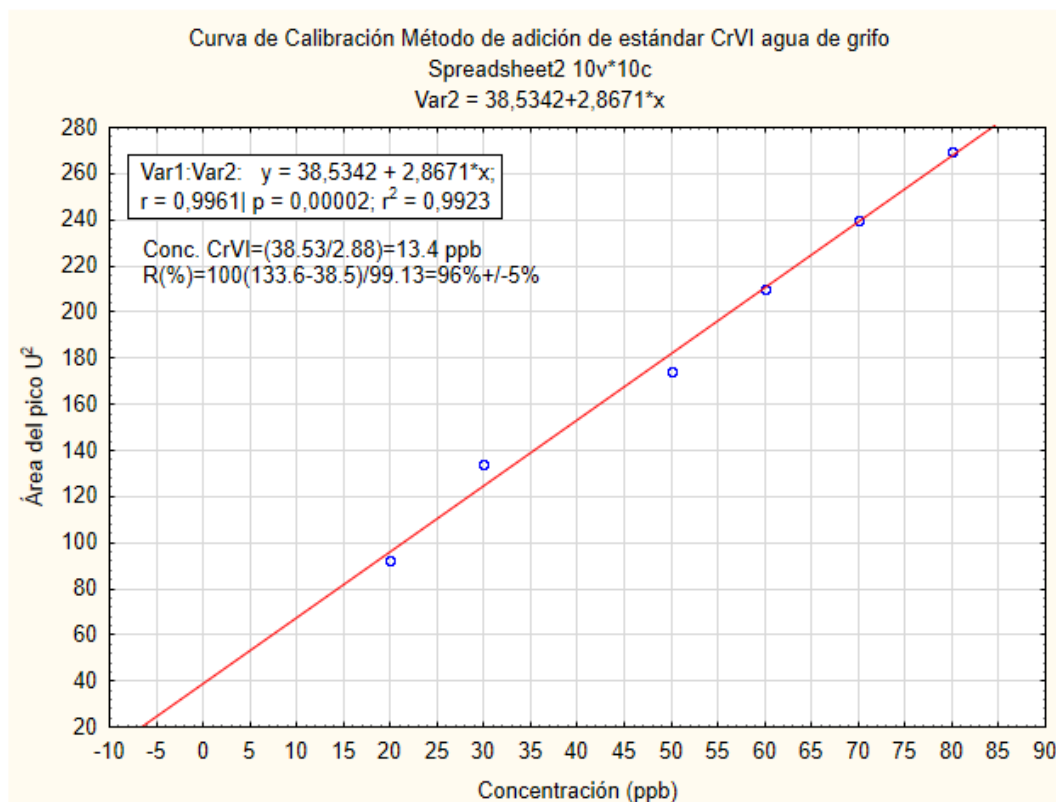
Las gráficas 5 y 6 muestran los resultados del método de la adición de estándar para la determinación de Cr (VI) en muestras de agua de grifo (USTA). Nuevamente y diferente al comportamiento del Cr (III), el Cr (VI) exhibe picos más anchos, lo cual implica mayores tiempos de elusión, aunque, por otro lado, mejores correlaciones entre las áreas de los picos y las concentraciones de los estándares adicionados, permitiendo esto una mayor precisión en la estimación de la concentración de esta especie en la muestra

Gráfica 5. Picos de absorbancia contra tiempo de elusión para concentraciones de Cr (VI) entre las concentraciones 20 - 80 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cr en el método de adición de estándar para las muestras de agua de grifo.



Fuente: [Elaboración Propia]

Gráfica 6. Curva de calibración de método de adición de estándar Cr (VI) en muestras de agua de grifo.



Fuente: [Elaboración Propia]

A continuación se hace una compilación de los datos obtenidos, en la que se establece el valor de recobrado del método para cada especie de cromo, la concentración asociada a las muestras tomadas del grifo de la universidad, el límite de detección y de cuantificación presentado por el método propuesto.

Tabla 6. Resultados de la estandarización de la pre-concentración y elusión y del método de adición de estándar para la determinación de Cr (III) y Cr (VI) en muestras sintéticas y de agua de grifo.

	Cr(III)	Cr(VI)
Recobrado pre-concentración/elusión (%)±SD, n=10, muestras sintéticas.	95±3	98±5
Concentración en agua potable ($\mu\text{g L}^{-1}$)±SD, n=4, agua de grifo	2.4±0.2	13.4±0.5
Recobrado del método (%)±SD, n=4, agua de grifo	105±5	96±4
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$), pre-concentración y elución de reactivo blanco	>0.2	>0.3
LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$), pre-concentración y elución de reactivo blanco	>2	>3

Fuente: [Elaboración Propia]

2. CONCLUSIONES

Al desarrollar el método analítico se obtuvo las condiciones experimentales óptimas para la ejecución del mismo, ya que se tenían como base conceptos de artículos científicos relacionados; mediante la práctica en el laboratorio se logró establecer parámetros que dan como resultado un bajo límite de detección, cuantificación y recobrado.

El método de determinación y especiación de cromo en muestras de agua aquí desarrollado utilizando la pre-concentración y elusión con micro-columnas de Na-Clinoptilolita y SMZ para Cr (III) y Cr (VI) y cuantificación mediante el método de adición de estándar (SAM) muestra a partir de resultados que las diferentes especies de Cr son pre-concentrables en las matrices adsorbentes diseñadas, en la que existe una razonable linealidad del área del pico y la concentración de la adición estándar para ambas especies.

A su vez se denota también las áreas menores obtenidas para Cr (III) que son probablemente resultante de la incompleta oxidación de Cr (III) a Cr (VI) con la concentración de solución de H_2O_2 seleccionada.

Los picos más anchos para el Cr (VI) dan un indicio de la fuerte retención del dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ o más exactamente HCr_2O_7^- a pH 5 - 6) al grupo $-\text{NH}_4^+$ del surfactante en la SMZ, lo que sugiere el uso de un eluyente más selectivo que el Br^- utilizado y en una mayor concentración para desplazar al Cr (VI) pre-concentrado.

Por otro lado, los picos de elución más estrechos para el Cr (III) se deben a la implementación de frecuencia de vibración en el ultrasonido en la etapa de pre-concentración de dicha especie buscando una rápida y cuantitativa salida de la especie de cromo del adsorbente.

Una minimización del efecto de las interferencias (NO_3^- , I^- , IO_3^- , BrO_3^- , SO_4^{2-} , S^{2-} , PO_4^{3-} , Cl^-) para el Cr (VI) y para el Cr (III) (metales alcalinos, alcalinos térreos, Fe^{3+}) fue realizada mediante el uso de agua desionizada MilliQ y ajustando el pH de las muestras entre 5 y 6.

3. BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. & S. Kotas, "Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation in Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation," *Environ Poll*, pp. 263-283, 1997.
- [2] R. Anderson, "Essentiallu of chromium in humans in Essentiallu of chromium in humans," *Tol environ*, pp. 75- 81, 1889.
- [3] World Health Organization, "Chromium in Drinking-water," Geneva, Health criteria and other supporting information. 1996.
- [4] N. I. o. P. H. a. E. Protection, "On the concentration of trace metals in precipitation," Bilthoven, 1989.
- [5] World Health Organization, "Chromium," vol. 61, 1988.
- [6] B. E. Shiller AM, "Variability of dissolved trace metals in the Mississippi Rive," 1987.
- [7] S Nakaya, H. Burton y T. Torii N. Masuda, "Trace element distributions in some saline lakes of the Vestfold Hills," Antarctica, 1988.
- [8] K. E. Janus JA, "Integrated criteria document chromium: effects," Netherland, 1990.
- [9] International Agency for Research on Cancer, "Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Some metals and metallic compounds," *Biologia Plantarum*, vol. 23, 1982.
- [1 R. G. Téllez, "Aspectos Toxicológicos Relacionados con la Utilización de 0] Cromo en el Proceso Productivo de Curtiembres," *Facultad de Medicina Universidad Nacional de Colombia*, pp. 50-61, 2014.
- [1 E. Cuberos, "Niveles de Cromo y Alteraciones de Salud en una Población 1] Expuesta a las Actividades de Curtiembres en Bogotá," *Revista Salud Pública*, pp. 278-289, 2009.
- [1 Centro Nacional de Producción más Limpia, "Diagnostico ambiental del sector 2] de curtiembres en Colombia," Colombia, 2004.

[1 CYTED Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, "Metodologías analíticas
3] para la determinación y especiación de arsénico en aguas y suelos," 2009.

[1 EPA, "METHOD 218.7: DETERMINATION OF HEXAVALENT CHROMIUM IN
4] DRINKING WATER BY ION CHROMATOGRAPHY WITH POST-COLUMN
DERIVATIZATION AND UV-VISIBLE SPECTROSCOPIC DETECTION,"
Documento de la EPA 2011. [Online]. <http://water.epa.gov/drink>

[1 Water Research Foundation, "Estado de la ciencia del cromo hexavalente en
5] agua potable," Water Research Foundation, Denver, Científico 2012.

[1 IDEAM, "LISTA DE LABORATORIOS AMBIENTALES ACREDITADOS POR
6] EL IDEAM EN LA MATRIZ AGUA," Colombia, 2015.

[1 Depósito de documentos de la FAO, "ESPECTROSCOPIA DE ABSORCION
7] ATOMICA,".

[1 De la Torre F, "ESPECTROMETRIA," Universidad Girona,.
8]

[1 Shukun Xu y Berhard Welz Michael Sperling, "Determinacion de cromo (III) y
9] cromo (VI) en agua usando flujo de inyeccion On- line preconcentracion con
absorbente selectivo y deteccion espectrofotométrica de absorcion atomica
de llama," Alemania,.

[2 P.P.Hormaza A H. D., "Estandarización de la difenilcarbazida como indicador
0] y acomplejante en la identificación de cromo hexavalente - Cr (VI)," *corporacion universitaria Lasallista*, 2013.

[2 O Boqué R., "EL LÍMITE DE DETECCIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO,"
1] Universidad Rovira i Virgil, Tarragona- España,.

[2 Hyun Woo Lim, Chul Ho Kang y Youg Wook Choi Sung Woon Jung,
2] "Spectrophotometric Determination of Ultra trace Tri & Hexavalent Chromium
by Using on-line Flow Injection Analysis with Dual Pre-concentration Column,"
vol. 32, 2011.

[2 H. Marquea, "Atomic Spectroscopy ," 2008.
3]

[2 J. Séby, "Atom. Spectrom," 2003.
4]

[2 B.F.Volodin, B.L.Kriukov N.F.Chelishchev, "Intercambio Iónico en Zeolitas
5] Naturales de Alta Sílice," 1988.

[2 Beyhan Cansever Erdogan, Cr (VI) REMOVAL WITH NATURAL,
6] SURFACTANT MODIFIED AND BACTERIA LOADED ZEOLITES, 2011.

[2 Maria Granda, Juan Carlos Torres Ana Perez, Characterization of the binding
7] site affinity distribution of a surfactant-modified clinoptilolite, 2008.

[2 Scientiis International. [Online].
8] http://scientiis.com/laboratorium/catalog/index.php?manufacturers_id=44&sort=2a&language=es

[2 Thermo Scientific. Bomba Peristaltica. [Online].
9] <http://www.directindustry.es/prod/thermo-fisher-scientific-fluid-handling/bomba-peristaltica-laboratorio-99629-905315.html>

[3 National Institute of Public Health and Environmental Protection,. Bilthoven,
0] Netherlands, 1989.

[3 World Health Organization, "Chromium," vol. 61, 1988.
1]

[3 Boyle EA Shiller AM, "Variability of dissolved trace metals in the Mississippi
2] River," 1987.

[3 Masuda N., "Trace element distributions in some saline lakes of the Vestfold
3] Hills," Antarctica, Hydrobiologia 165:103 114, 1988.

[3 R. M. Gonzalez,. Uruguay, 2013.
4]

[3 S. A. G.C. Vaca M,. Colombia, 2012.
5]

[3 FIALab, Manual del sistema FIA.
6]