



**UNSAM**

UNIVERSIDAD  
NACIONAL DE  
SAN MARTÍN

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN E INGENIERÍA AMBIENTAL**

**FUNCIONALIZACIÓN Y APLICACIONES ANALÍTICAS DE NANOMATERIALES  
BASE CARBONO**

Trabajo de Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencia y Tecnología  
Mención Química

**Por: Lic. María Belén Parodi**

Directora de Tesis: Dra. Patricia Nora Smichowski

Co-directora de Tesis: Lic. Griselda Inés Polla

Lugar de Trabajo: Departamento de Química Analítica, Gerencia Química y  
Departamento de Física de la Materia Condensada, Gerencia de Investigación y  
Aplicaciones, Centro Atómico Constituyentes, CNEA, Laboratorio de Tratamiento  
de Superficies, Grupo Biomateriales, Centro de Investigación y Desarrollo en  
Mecánica, INTI

### Resumen

Los nanomateriales y en particular los nanotubos de carbono (CNTs) han sido y continúan siendo ampliamente estudiados debido a sus propiedades inusuales y a su potencial aplicación en numerosas áreas del conocimiento. Desde el punto de vista sintético es posible pensar en hacerles diversas modificaciones para cada aplicación y así tener un material "a medida". Desde la perspectiva de la Química Analítica una interesante y valiosa alternativa surge al modificar su estructura con la incorporación de aminoácidos, que le otorgan una alta afinidad por especies metálicas. Por este motivo estos novedosos materiales fueron evaluados como posibles candidatos para ser utilizados como sorbentes, aportando selectividad y especificidad a las determinaciones.

El objetivo de este trabajo de Tesis doctoral fue la búsqueda e implementación de un sistema de pretratamiento de muestras mediante la separación en fase sólida utilizando CNTs, oxidados y funcionalizados, como sustratos específicos. El sistema implementado y optimizado se utilizó para la retención y preconcentración de Cu(II), Hg(II) y Bi(III) que luego se eluyeron y determinaron cuantitativamente utilizando un acoplamiento en línea alcanzándose límites de detección del orden de los  $\text{ng ml}^{-1}$ . Estos resultados son un valioso aporte para la Química Analítica ya que demuestran que con la utilización de estos materiales es posible determinar diferentes tipos de metales a nivel de trazas y ultratrazas en aguas naturales, cabe destacar que estos niveles solo podrían ser alcanzados por técnicas analíticas de elevado costo de adquisición y operación.

En este trabajo, se emplearon como sustrato, nanotubos de carbono de pared múltiple oxidados y funcionalizados con aminoácidos. Se utilizó al Cu(II) como ión modelo para implementar un sistema de separación en fase sólida en

línea. Se estudió cuidadosamente la geometría de la microcolumna donde se confinaron los nanotubos, los distintos acoplamientos y mezclas de relleno para optimizar la respuesta del sistema. Como parte de la implementación se estudió la influencia de los distintos parámetros analíticos como pH de carga, caudal de carga y elución, masa de sorbente, capacidad de retención dinámica y efecto de iones concomitantes. Luego, el sistema desarrollado se aplicó a la optimización de la retención y preconcentración de Hg(II) y Bi(III), con aplicación a su determinación en aguas naturales. Se evaluaron distintos volúmenes de carga para conseguir los límites de detección adecuados y se realizó un exhaustivo estudio de medios de carga para controlar las interferencias. Se lograron retenciones cuantitativas y límites de detección compatibles con la presencia de los analitos estudiados en aguas naturales. Cabe remarcar que los nanotubos de carbono mantuvieron su estructura después de ser usados en más de 690 ciclos de preconcentración/elución.

La caracterización de los materiales obtenidos se realizó por SEM, TEM, EDS, TGA, XRD y FTIR.

El sistema implementado permitió la utilización de una mínima cantidad de sustrato debido a la especificidad que la funcionalización le confiere a los nanotubos. El empleo de una mezcla de nanotubos de carbono con una cera de polietileno de bajo peso molecular fue un hallazgo que permitió resolver de una manera sencilla e innovadora los problemas de compactación que presentan las microcolumnas rellenas con nanocompuestos y de esta forma el sistema se pudo reutilizar repetidamente sin sobrepresión y sin cambiar la microcolumna.

### **Abstract**

Nanomaterials and especially carbon nanotubes (CNTs) have been, and continue being extensively studied due to their unusual properties, and their potential application in many areas of knowledge. From the point of view of their synthesis, it is possible to think on doing several modifications to prepare a new material for different applications and in this way to have a tailored material. From the Analytical Chemistry perspective an interesting and valuable alternative arises from the modification of the CNTs surface with the incorporation of aminoacids, which confer them high affinity for metal species. For this reason, these novel materials are evaluated as possible candidates to be used as sorbents, providing selectivity and specificity to the determinations.

The objective of this Doctoral thesis was the search and implementation a sample pretreatment system based on solid phase extraction using oxidized and functionalized CNTs as specific substrates. The implemented and optimized system was used for the retention and preconcentration of Cu(II), Hg(II) and Bi(III) that then were then eluted and determined quantitatively using an on-line system, reaching detection limits in the range of  $\text{ng ml}^{-1}$ . These results are a valuable contribution to Analytical Chemistry since they demonstrate that with the use of these materials it is possible to determine different metals at trace and ultratrace levels in natural waters. It should be noted that these levels could only be reached by analytical techniques of high cost of acquisition and operation.

In this work, multiwalled carbon nanotubes oxidized and functionalized with aminoacids were used as sorbents. The Cu(II) was used as a model ion to implement an on line solid phase extraction system. The geometry of the microcolumn where the carbon nanotubes were packed, the different couplings

and fill mixtures were carefully studied to optimized the system response. As part of implementation, the influence of different analytical parameters such as sample pH, loading flow rate, elution flow rate, sorbent mass, dynamic retention capacity and concomitant ion effect were studied. Then, the developed system was applied to optimize the retention and preconcentration of Hg(II) and Bi(III), with the application to their determination in natural waters. Different load volumes were evaluated to achieve the appropriate detection limits and an exhaustive study of the sample media was carried out to control the interference. Quantitative retention and detection limits compatible with the presence of studied analytes studied in natural waters were accomplished. It should be noted that nanotubes conserved their structure after being used in more than 690 preconcentration/elution cycles.

The characterization of obtained materials was carried out by SEM, TEM, EDS, TGA, XRD and FTIR.

The implemented system allowed the used of a minimum amount of substrate due to the specificity that the functionalization conferred to nanotubes. The use of a mixture of carbon nanotubes with a low molecular weight polyethylene wax was a finding that allowed to solve in a simple and innovative way the compaction problems presented by microcolumns filled with nanocomposites and in this way the system could be reused repeatedly without overpressure and without changing microcolumn.

## Agradecimientos

A las Instituciones Públicas y sus autoridades que me permitieron desarrollar este trabajo de Tesis con el cual alcancé un gran sueño personal: la Universidad de San Martín, la Comisión Nacional de Energía Atómica y el Instituto Nacional de Tecnología Industrial. En particular el 3iA (UNSAM), el Departamento de Química Analítica de la Gerencia Química (CNEA), el Departamento de Física de la Materia Condensada de la Gerencia de Investigación y Aplicaciones (CNEA) y el Centro de Investigación y Desarrollo en Mecánica (INTI).

A las personas que me acompañaron durante estos años:

A mis Directoras, Patricia y Griselda, que me acompañan desde el 2003 cuando hice mi Tesis de grado. Gracias por acompañarme durante tantos años, guiarme, soportarme y comprender todas mis idas y vueltas. Hacer la Tesis *part time* fue un desafío enorme que requirió mucho esfuerzo pero la decisión valió la pena!! Su presencia ha sido y continuará siendo lo que hace la gran diferencia.

A Jorge y Leo, mis Jefes en INTI-Mecánica que se jugaron apoyando una Tesis un poco distinta. Gracias por pensar que valía la pena y hacer el esfuerzo por entender la Química Analítica y a los nanotubos.

A Laura Davidowski por su buena predisposición para firmar los Informes.

A los grupos de trabajo tanto de INTI como de CNEA que me brindaron su apoyo para poder realizar este trabajo. En CNEA: Agustín Londonio, tantas horas midiendo que hasta tenemos un tema propio!, Gonzalo Zbihlei (gracias por las horas mirando al TEM y sacar fotos tan lindas!), Eleonora Freire, Facundo Giles, María Rosa Eppis, Alicia Petragalli y Daniel Vega por los XRD. Mariel Reinoso y Betty Halac gracias por la paciencia haciendo Raman de los nanotubos. Mariano Bruno por enseñarme a hacer el BET.

En INTI: Lafo (unas columnitas hermosas, y gracias por controlar los nanotubos el finde cuando quedaban limpiándose), Dany Egidi (conexiones extrañas para experimentos locos!), Leito Lebedev (gracias por el cierre de las bolsas de diálisis y el poster de NT11). Mimí Caldiroli (tus trámites me permitieron ir a todos los lugares que fueron necesarios). Sole Pereda, Mechi Pianetti, Carlos Serpi, Gisela Maxia, Gustavo Gimenez (INTI) y Claudia Marchi (CMA-FCEyN-UBA) que me ayudaron a ver los nanotubos al SEM. CAVA (por la edición de gráficos). Gabi

Ybarra por hacer los FTIR aunque fuera difícil. Todos me ayudaron proponiendo ideas para hacer mi vida más fácil. Unos genios!!

Al grupo de Química Analítica de San Luis, Luis Dante Martinez, Raúl Gil y Marianela Savio, por haberme recibido y compartido conmigo su trabajo para que pudiera desarrollar un sistema similar en CNEA.

A todos los chicos de Biomateriales que me han bancado con su tiempo y trabajo para que pudiera hacer esta Tesis!! Gracias, Leo Pazos, Noe Carrizo, Mauro Pisano, Cristian Pereiro, Mariana Bahnyckyj y Ezequiel Perez.

A las personas que me acompañan siempre:

A mis amigos, afectos y familiares que me acompañan en esta y en todas las aventuras en las que me embarco. Gracias por acompañarme y apoyarme siempre. A mis padres por su crianza en libertad que me permite poder elegir.

Chicas, (Gabi, Evange, Ale, Machu, Lau) su presencia, con un llamado, una salida o un mate es lo que hace la diferencia. Gracias por estar siempre!!

Chicos, son lo más porque tienen una paciencia, infinita!! Gracias, Agus Londonio, Dani Egidi, Leo Pazos, Gustavo Lafo, Leito Lebedev, Claudio Berterreix, Jorge Scheneebeli, Pablito Torres.

A todos los que siempre recuerdan que estoy metida en este lío de ser doctora y preguntan: Reyes, Coco, Toti, Gustavo Florio, Juan Szombach, Diego Russo, Gisela Cañal, Gustavo Elvira, DMK, Pichi, Quique.

A Luis Galófar y Alicia Labarta por su apoyo, su interés y estar.

A mi familia, que no deja de preguntar cuando termino de estudiar!!! Espero que nunca!! Gracias por sentirse orgullosos. Abuela Olga, soy doctora, aunque creo que no era este tipo de doctora el que querías, estoy segura que donde estés estarás orgullosa. A mi tíos Graciela y Mario, tía gracias por preguntar y compartirme palabras de aliento. Mis primos, todos!! Y todos los niños de la familia que son una alegría. Mi padrino, Guille, que aunque lejos, sé que puedo contar con vos.

A mis sobrinos y ahijada que siempre están presentes, Ariana, Iara, Matilda, Victorio, Lucas y Juanita.

A mis sobrinas que son las que me sacan una sonrisa cuando todo sale mal, por quienes me levanto temprano un domingo o comparto un chocolate. Son cuatro soles: Valen, Lola, Emi, Luli y el año que viene Eluney. Las amo con toda mi alma. A mis hermanos, Paula y Martín, que son generosos y me permiten estar con ellas y compartir sus vidas.

A mi bisabuela, Luisa, hermosa persona. Lo que me dijiste la última vez que nos vimos inspira mi camino "Cómo estás abue? Jodida, pero contenta". Ojalá yo pueda decir eso a los 96 años.

---

## Índice de Contenido

Motivación del Trabajo de Tesis Doctoral	1
Referencias	4
Capítulo 1 Pretratamiento de Muestras: Separación en fase sólida	5
1. Introducción	7
2. Principios Básicos	10
3. Dispositivos	15
4. Ventajas de la Separación en Fase Sólida	16
5. Materiales usados como sorbentes	17
6. Metodología	19
7. Cuantificación en sistemas SPE	27
8. Microseparación en fase sólida	28
9. Conclusiones	29
Referencias	29
Capítulo 2 Nanotubos de Carbono como Material Sorbente	35
1. Introducción	38
2. Elección del tipo de CNTs para su uso en SPE	41
3. Métodos de síntesis de MWCNTs	45
4. Modificación de la superficie de los MWCNTs	47
4.1. Modificaciones covalentes – Oxidación	49
4.2. Funcionalización con aminoácidos	51
5. Técnicas de caracterización	54
Referencias	56

---

Capítulo 3 Obtención y Caracterización de Nanotubos de Carbono modificados	65
1. Introducción	68
2. Técnicas de caracterización	68
3. Materiales y reactivos utilizados	71
4. Caracterización de los MWCNTs comerciales	72
5. Metodología utilizada para la oxidación de los MWCNTs	79
6. Caracterización de los MWCNT-COOH	82
7. Metodología de funcionalización con aminoácidos	88
8. Caracterización de los MWCNTs funcionalizados con aminoácidos	89
9. Observaciones generales	94
Referencias	96
 Capítulo 4 Desarrollo del Sistema de Preconcentración: el Cu(II) como analito modelo	 99
1. Introducción	101
2. Técnicas para la determinación de Cu	103
3. Analito modelo	105
4. Materiales, reactivos e instrumentos utilizados	106
5. Metodología utilizada	107
5.1. Experimentos preliminares, materiales y métodos	107
5.2. Condiciones operativas	109
5.3. Preparación de la columna	109
5.4. Procedimiento general	110
5.5. Optimización de variables	111
5.5.1. Efecto del pH	111
5.5.2. Efecto del caudal de carga	112
5.5.3. Efecto de la concentración y caudal del eluyente	113
5.5.4. Volumen de elución	113

---

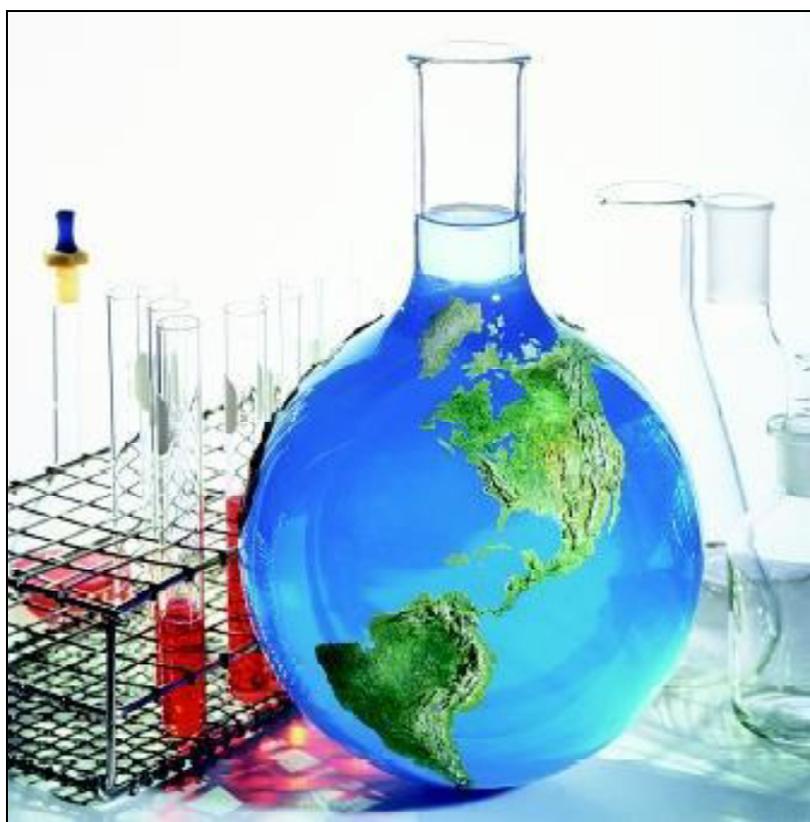
5.6. Capacidad y re-utilización de la microcolumna	113
6. Desempeño Analítico	114
7. Efecto de iones concomitantes	116
8. Análisis de aguas naturales	116
9. Conclusiones	117
Referencias	118
Capítulo 5 Retención, preconcentración y determinación de Hg(II) en aguas naturales	121
1. Introducción	124
2. Técnicas para la determinación de Hg	128
3. Materiales, reactivos e instrumentos utilizados	129
4. Metodología utilizada	131
4.1. Materiales y métodos	131
4.2. Condiciones de operación	132
4.3. Preparación de la microcolumna	132
4.4. Procedimiento general	134
4.5. Características y tratamiento de las muestras a analizar	135
4.6. Optimización de variables	136
4.6.1. Características de la microcolumna y material de relleno	136
4.6.2. Efecto del pH	139
4.6.3. Efecto de la concentración del eluyente	141
4.6.4. Efecto del caudal de carga y elución	141
4.6.5. Volumen de elución	143
4.6.6. Capacidad de retención de la microcolumna	143
4.7. Capacidad de re-utilización de la microcolumna	144
5. Efecto de iones concomitantes	145
6. Desempeño analítico	146
7. Análisis de aguas naturales	149

---

8. Conclusiones	150
Referencias	150
Capítulo 6 MWCNT-pro para un analito poco estudiado como el Bismuto	156
1. Introducción	159
2. Elección del Bi	161
3. Técnicas para la determinación de Bi	162
4. Materiales, reactivos e instrumentos utilizados	163
5. Metodología utilizada	165
5.1. Materiales y métodos	165
5.2. Condiciones de operación	166
5.3. Preparación de la microcolumna	166
5.4. Procedimiento general	167
5.5. Características y tratamiento de las muestras a analizar	168
5.6. Optimización de variables	169
5.6.1. Estrategia de optimización	169
5.6.1.1. Caudal de carga y elución	169
5.6.1.2. Diseño Factorial	171
5.6.2. Volumen de elución	171
5.6.3. Capacidad de retención de la columna	171
5.6.4. Efecto del pH de carga y concentración del eluyente	173
6. Efecto de iones concomitantes	176
7. Desempeño analítico	179
8. Análisis de aguas naturales	180
9. Conclusiones	183
Referencias	184
Conclusiones y Perspectivas	187
Producción Científica	192

# Motivación

## del Trabajo de Tesis Doctoral



Se presentan a continuación los desafíos que motivaron la realización de este trabajo de Tesis doctoral. Se describe brevemente la problemática abordada y su aporte significativo en el campo de la química analítica para la determinación de metales y metaloides en solución, a nivel de trazas y ultratrazas.

El agua tiene un papel esencial en los procesos geoquímicos y bioquímicos siendo el principal vehículo de transporte entre distintos compartimentos como sistemas de agua, aire y suelos. Para caracterizar los distintos sistemas acuosos es necesario determinar los elementos que naturalmente se encuentran presentes y muy especialmente los potenciales contaminantes. Entre los contaminantes posibles, los metales y metaloides en solución en muy baja concentración son una parte esencial [Krawczyk, M. y col. 2015]. Estos metales, aún a muy bajos niveles ( $\text{ng ml}^{-1}$  o menor), tienen un gran impacto en la calidad del ambiente y la salud de seres humanos, animales y biota [Duffus, J. H. 2002]. Otro interés reside en su utilización como marcadores químicos de procesos de contaminación presentes o futuros. Desde hace tiempo y de forma sostenida existe en la sociedad un interés indiscutido en temas ecológicos enfocados en la contaminación del ambiente y en su impacto en la salud pública [Tchounwou, P. B. y col. 2012]. Los niveles de contaminantes varían y dependen fuertemente de las condiciones locales, estacionales y particularmente de la actividad antropogénica que se desarrolle en la zona.

Poder determinar metales y metaloides a niveles tan bajos supone un desafío para la mayoría de las técnicas analíticas actuales, muchas de ellas de elevado costo de adquisición y mantenimiento [Krawczyk, M. y col. 2015, Kabata-Pendia, A. 2001]. Esto es especialmente importante en laboratorios de análisis químicos de servicios y de investigación donde no siempre se encuentran disponibles equipos de última generación para realizar estas determinaciones. Asimismo, la complejidad de las matrices actuales y la diversidad de contaminantes que presentan las muestras naturales debido a la diversificación de las actividades antropogénicas hacen que sea imprescindible contar con desarrollos y soluciones eficientes e innovadoras para abordar esta problemática.

Las principales motivaciones de este trabajo de Tesis doctoral han sido:

- i) desarrollar métodos de pretratamiento como paso previo a la cuantificación de especies químicas en solución,
- ii) desarrollar un material sorbente con gran capacidad de retención de especies metálicas en forma selectiva,
- ii) desarrollar métodos selectivos y de alta sensibilidad que permitan alcanzar los niveles a los que se encuentran los metales y metaloides tóxicos o potencialmente tóxicos en aguas naturales.

Al definirse la implementación de un sistema de pretratamiento surgen desafíos en cuanto a la elección de un sustrato con características adecuadas para la problemática abordada y la forma de realizar su acoplamiento a una técnica de determinación cuantitativa tradicional. Conceptos como "Nanomateriales" y "Química Verde" deben ser tenidos en cuenta a la hora de la elección del sustrato y la metodología general.

Para alcanzar el objetivo propuesto, se estudiaron nanotubos de carbono comerciales, oxidados y funcionalizados con aminoácidos como sustratos innovadores para abordar la retención selectiva de especies cargadas que se encuentren en bajas concentraciones en distintas categorías de aguas naturales no contaminadas.

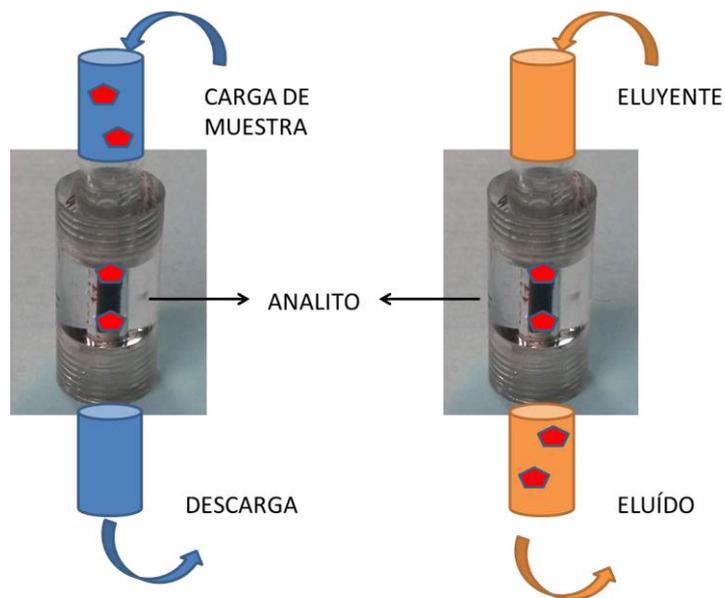
Con el material sorbente elegido, modificado y caracterizado se desarrollaron sistemas de determinación cuantitativa en línea aplicados a la retención y preconcentración de analitos de interés ecotóxico a nivel de trazas y ultratrazas.

## Referencias

- Duffus, J. H. (2002). Heavy metals-a meaningless term?. *Pure Appl Chem.*, 74, 793–807.
- Kabata- Pendia, A. (Eds). (2001). Trace Elements in Soils and Plants. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Krawczyk, M. y Stanisz, E. (2015). Silver nanoparticles as a solid sorbent in ultrasound-assisted dispersive micro solid-phase extraction for the atomic absorption spectrometric determination of mercury in water samples. *J. Anal. At. Spectrom.*, 30, 2353-2358.
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., K Patlolla, A. K. y Sutton, D. J. (2012). Heavy Metals Toxicity and the Environment. En Luch, A. (Eds). *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*. 133-164, Springer Basel.

# Capítulo 1

## Pretratamiento de Muestras: Separación en fase sólida



En este capítulo se presenta el método de Separación en Fase Sólida como Pretratamiento de Muestras, para retener y preconcentrar analitos de forma de alcanzar mejores límites de detección. Este tipo de pretratamiento permite utilizar equipamiento analítico de menor sofisticación aún para muestras complejas (ej. alto contenido salino en agua de mar).

### Abreviaturas

<i>CE</i>	Capillary electrophoresis (Electroforesis capilar)
<i>CNTs</i>	Carbon nanotubes (Nanotubos de carbono)
<i>ET AAS</i>	Electrothermal atomic absorption spectroscopy (Espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica)
<i>FA AAS</i>	Flame atomic absorption spectrometry (Espectrometría de absorción atómica con llama)
<i>GC</i>	Gas chromatography (Cromatografía gaseosa)
<i>GF AAS</i>	Graphite furnace atomic absorption spectroscopy (Espectrometría de absorción atómica con horno de grafito)
<i>HPLC</i>	High pressure liquid chromatography (Cromatografía Líquida de Alta Resolución)
<i>ICP MS</i>	Inductively coupled plasma mass spectrometry (Espectrometría de Masas con fuente de Plasma Acoplado Inductivamente)
<i>ICP OES</i>	Inductively coupled plasma atomic optical spectrometry (Espectrometría de Emisión Óptica con fuente de Plasma Acoplado Inductivamente)
<i>LLE</i>	Liquid liquid extraction (Extracción líquido-líquido)
<i>MWCNTs</i>	Multi-walled carbon nanotubes (Nanotubos de carbono de pared múltiple)
<i>REEs</i>	Rare earth elements (Tierras raras)
<i>SPE</i>	Solid phase extraction (Separación en fase sólida)
<i>SPME</i>	Solid phase microextraction (Microseparación en fase sólida)

## 1. Introducción

Como un proceso continuo, los sectores industriales y académicos se encuentran en la búsqueda de mejorar el desempeño, confiabilidad y velocidad del proceso de análisis químico, tanto para los métodos tradicionales de determinación de contaminantes en muestras ambientales (aire, aguas naturales, suelos y sedimentos) como para la detección y cuantificación de drogas o metabolitos en muestras biológicas. El objetivo sigue siendo el mismo: análisis más rápidos y a menores precios, mejorando la sensibilidad y selectividad. Esto se ha expandido a áreas no tan habituales, incorporando analitos que en otros momentos no se tenían en cuenta o se consideraban no relevantes, debido a nuevos hallazgos que los ponen en el centro de atención por sus efectos sobre la salud humana o en el ambiente [Augusto, F. y col. 2010].

Dependiendo del analito a determinar se selecciona el método y la técnica instrumental de cuantificación más adecuada. En este sentido, un eficaz pretratamiento de la muestra permite la determinación de numerosos analitos inclusive a niveles extremadamente bajos. La incorporación de una etapa de pretratamiento de muestra es vital para el eficiente desempeño de muchas técnicas analíticas [Fonseca, M. C. y col. 2016]. Generalmente, cada técnica analítica está asociada con un determinado proceso de pretratamiento que en muchos casos está relacionado con la forma de introducir la muestra en el sistema o cómo se pueden alcanzar menores límites de detección o cómo eliminar/reducir interferencias. Por ejemplo, para métodos que utilizan la cromatografía gaseosa (GC), la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o la electroforesis capilar (CE) los métodos tradicionales de preparación de muestras incluyen extracciones basadas en la sorción selectiva del analito o de los interferentes sobre sustratos, seguido del análisis directo o de la desorción de las especies retenidas. Ejemplos de estas técnicas son la extracción Soxhlet

(para sedimentos o matrices sólidas), la extracción líquido-líquido (LLE) (para agua o muestras acuosas) o tubos de carbono adsorbente (para compuestos orgánicos volátiles en aire) [Augusto, F. y col. 2010]. Sin embargo, deben ser tenidos en cuenta aspectos tales como reducir la cantidad de volúmen de solventes utilizados (grandes volúmenes son necesarios para el LLE tradicional o el Soxhlet). Esto hizo que la separación en fase sólida (SPE) haya ganado popularidad como técnica para la preparación de muestras [Türker, A. R. 2007].

El pretratamiento de muestras busca la transferencia del analito de interés desde la matriz de la muestra a un nuevo medio. Las características fisicoquímicas de este medio deben ser compatibles con la técnica instrumental que se va a utilizar y la estabilidad del analito a medir. Este trabajo de Tesis doctoral esta enfocado en la implementación de un sistema de pretratamiento de muestras de agua basado en la SPE utilizando nanotubos de carbono como sustrato. En este sentido, se han propuesto a los nanotubos modificaciones que les confieren carga, y los hacen apropiados para el desarrollo de metodologías más específicas enfocadas en la preconcentración de especies metálicas en solución.

Un relevamiento de las técnicas que habitualmente se utilizan para cuantificar especies metálicas en solución muestra que las espectroscopías de absorción atómica han sido extensamente utilizadas, ya que son técnicas selectivas y sensibles [de Godoi Pereira, M. y col. 2003]. Sin embargo, es necesario conocer las limitaciones de cada sistema analito/muestra/técnica de cuantificación, como por ejemplo, la escasa sensibilidad para algunos analitos y/o matrices de la espectroscopia de absorción atómica con llama (FA AAS) [Naghmush, A. M. y col. 1995; Matusiewicz, H. y col. 1991, de Godoi Pereira, M. y col. 2003] o la problemática del alto contenido de sales en la muestra para las espectroscopías de masa con plasma acoplado inductivamente (ICP MS) y de emisión con plasma acoplado inductivamente (ICP OES) [Beauchemin, D. 1991].

Es por ello que los procesos de pretratamiento se vuelven tan importantes [Türker, A. R. 2007].

La SPE consiste en la retención de especies en un sustrato sólido para su posterior desorción utilizando eluyentes inorgánicos u orgánicos. Se encuentra reportado que estos métodos acoplados con técnicas espectroscópicas atómicas presentan ventajas como: simplicidad, alta frecuencia de análisis y altos factores de preconcentración [Pyrzyńska, K. y col. 1999]. De esta forma surge el interés de desarrollar y caracterizar nuevos materiales para ser utilizados como sorbentes que sean fáciles de producir y económicos, que presenten alta capacidad de adsorción y gran versatilidad en las condiciones de adsorción, que sean reutilizables o en su defecto que puedan ser sometidos a tratamientos de reciclado para realizar la degradación del contaminante en fase sólida, que presenten mayor selectividad (inclusive especificidad hacia un analito en particular), que permitan la utilización de medios de extracción enmarcados en los principios de la "Química verde", y con mayor estabilidad térmica, química y/o mecánica. Con esto último se aumenta la vida útil del dispositivo utilizado como sorbente [Krawczyk, M. y col. 2016].

La necesidad de utilizar un sistema de SPE es especialmente relevante para muestras de aguas naturales donde las especies se encuentran a niveles del orden de los  $\text{ng ml}^{-1}$  [Tseng, W-C. y col. 2015]. Asimismo, la alta concentración de otras especies que usualmente acompañan a los analitos de interés hace necesario la utilización de los métodos de pretratamiento. La implementación del sistema SPE en línea tiene como ventajas adicionales, la posibilidad de automatización [Acebal, C. C. y col 2016; Saçmaci, Ş. Y col. 2014; Zagatto, E. A. G., y col. 1993], mejoras en la precisión y exactitud, minimización de la producción de residuos tóxicos y consumo de reactivos y muestra. También al ser sistemas cerrados disminuye la posibilidad de contaminación de las muestras. La miniaturización es otra de las posibilidades que conlleva la utilización de estos sistemas.

Se encuentran reportados en la bibliografía una importante cantidad de sistemas de pretatamiento de SPE para el análisis de distintas sustancias y/o elementos en una variedad de matrices. A modo de ejemplo, se encuentra reportado la determinación de Pb y Cd en muestras cosméticas utilizando nanopartículas de TiO<sub>2</sub> [Panigati, M. y col. 2002], y W(VI) en muestras de agua y sedimentos [Li, S. y y col. 2003], también se han utilizado nanopartículas de poli(4-vinilanilina) para la determinación de Cr(VI) en efluentes líquidos [Wang, L. y col. 2004].

## **2. Principios Básicos**

En forma general la técnica comprende la transferencia del analito desde la muestra original a un nuevo medio compatible tanto con el analito como con la técnica instrumental que se utilizará para su determinación cuantitativa [Baltussen, E. y col. 2002]. Para que esto ocurra se realiza el pasaje de una muestra líquida a través de un material sorbente que retiene al analito. Existen, en menor medida, sistemas que retienen una matriz compleja, liberando así al analito. El material sorbente puede confinarse dentro de distintos dispositivos, como: columnas, cartuchos, tubos o discos [Camel, V. 2003]. En este trabajo de Tesis doctoral se utilizaron microcolumnas fabricadas con un material inerte. Las columnas, en general, pueden contener desde 50 mg hasta 10 g de material sorbente, sin embargo menores y mayores cantidades también son posibles. La utilización de cantidades menores depende de la capacidad del material sorbente de retener el analito de interés. El sorbente se coloca seco, molido en distintas granulometrías por el método de empaquetamiento en seco dentro de la columna o por otras metodologías donde se prepara un "slurry" que se hace pasar por la columna. Para evitar la migración del material sorbente al sistema en línea se coloca un disco permeable (fritas, lana de vidrio) en cada uno de los

extremos de la columna. Su objetivo es mantener el material sorbente confinado en la columna, permitiendo el paso del líquido.

La metodología de la SPE consiste en hacer pasar un volumen determinado de muestra,  $V_{\text{muestra}}$ , por la microcolumna produciéndose la retención del analito por el material sorbente para luego ser eluido en un volumen menor ( $V_{\text{elución}}$ ) por un eluyente apropiado. Durante este proceso es posible pasar por la microcolumna grandes cantidades de muestra (inclusive litros) conteniendo muy bajas concentraciones del analito y eluir en un volumen mucho menor lo que permite alcanzar muy buenos factores de enriquecimiento. La mayoría de los procedimientos buscan pasar la menor cantidad de muestra posible para reducir el tiempo de análisis.

Los sistemas SPE pueden implementarse en línea o en batch (discontinuo). Aquí centraremos la atención en los sistemas en línea ya que los sistemas en batch no presentan tantas ventajas y solo se utilizan en este trabajo al principio del desarrollo experimental en el capítulo 4 para evaluar la retención de los nanotubos de carbono hacia algunas especies metálicas en solución.

Un sistema de SPE convencional puede tener tres o cuatro etapas sucesivas (Figura 1).

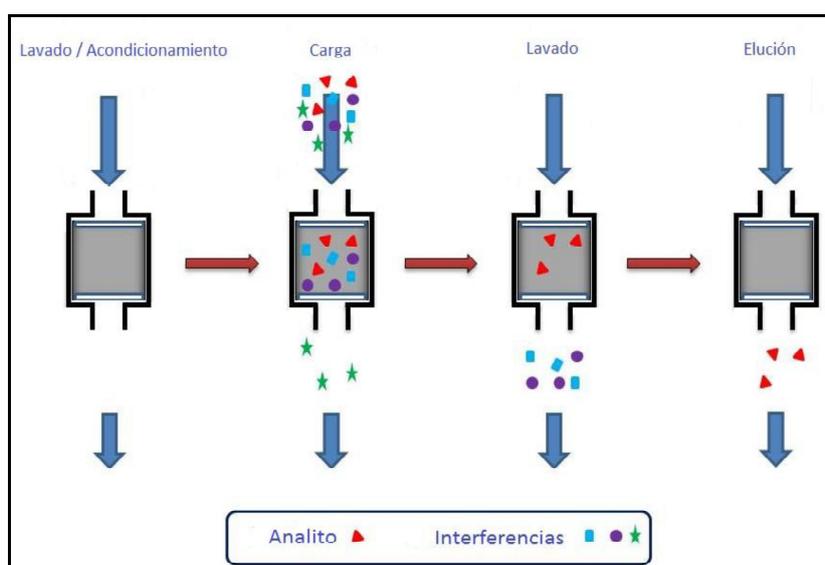


Figura 1. Sistema genérico de SPE.

Durante la etapa indicada como lavado/acondicionamiento, la microcolumna es lavada para extraer posibles restos originados durante el proceso de síntesis del material sorbente y acondicionada con el medio apropiado para la retención del analito respectivo. Esta etapa es fundamental para solvatar el sorbente, conferirle a los grupos funcionales la polaridad adecuada y remover el aire que hubiera podido quedar retenido en la microcolumna. La elección del medio de acondicionamiento en esta etapa depende de la naturaleza del sorbente y de la estabilidad del analito en ese medio.

La segunda etapa es el pasaje de la muestra a través de la microcolumna. Este proceso puede realizarse de diferentes formas: gravedad, bombeo, aspiración con vacío o a través de un sistema en línea automatizado. Este trabajo aprovecha las ventajas del proceso automatizado en línea. El caudal de carga de la muestra a través de la microcolumna se debe estudiar para encontrar el valor apropiado que permita la eficiente retención de los analitos, evitando excesivos tiempos de análisis. En esta etapa ocurre la concentración de los analitos en el sorbente. Si bien algunos componentes de la matriz pueden quedar retenidos en la microcolumna, muchos de ellos pasan a través de la misma, permitiendo la purificación de la muestra. El diseño de sorbentes "a medida" permite maximizar este proceso otorgándole selectividad a los mismos [Tseng, W-C. y col. 2015].

En una tercera etapa puede lavarse la microcolumna con un solvente que posea un bajo poder de elución (hacia el analito de interés). Esta etapa puede realizarse para eliminar componentes de la matriz que hubiesen podido quedar retenidos en la microcolumna.

La etapa final consiste en la elución del analito de interés con un eluyente apropiado evitando remover componentes de la matriz que pudieran haber quedado retenidos en la microcolumna. El volumen del eluyente debe ser ajustado para obtener una recuperación cuantitativa del analito evitando el

efecto de dilución que ocurre cuando los volúmenes son excesivamente grandes. Sin embargo, en sistemas en línea acoplados al sistema de detección este volumen se encuentra limitado por los sistemas automatizados de los equipos utilizados para la medición y son en general relativamente pequeños. El caudal de elución es otro parámetro a tener en cuenta en el proceso de optimización para asegurar una eficiente desorción.

Para lograr la separación del analito de la matriz es necesario que ocurra la retención del mismo en el sorbente. Los mecanismos de retención dependen de la naturaleza del sorbente. Los analitos que se encuentran en la muestra a nivel de trazas pueden adsorberse en sustratos sólidos a través de fuerzas de van der Waals o interacciones hidrofóbicas. Las interacciones hidrofóbicas ocurren en presencia de sorbentes altamente no-polares (ej. C<sub>18</sub>-silica) y no nos referiremos a ellas ya que no participan en la retención de especies cargadas. En cambio, para lograr la retención de especies cargadas se realizan modificaciones a los sustratos para conferirles carga ya sea mediante oxidaciones y/o diversas derivatizaciones [Savio, M. y col 2011; Wadhwa, S. K. y col. 2013]. Estas "funcionalidades" pueden incorporarse a través de interacciones físicas o por uniones químicas. Estas modificaciones le confieren a los sorbentes, grupos capaces de aportar carga y especificidad hacia distintos analitos cargados.

Varios átomos que forman parte de grupos funcionales son capaces de interactuar con analitos en baja concentración. Los átomos utilizados con mayor frecuencia son: el nitrógeno (ej. presente en aminas, grupos azo, amidas, nitrilos), el oxígeno (ej. presente en grupos carboxilo, hidroxilo, fenilo, éter carbonilo) y azufre (ej. presente en tioles, tiocarbamatos, tioeteres). Para que estos grupos puedan introducirse en el sorbente sólido es necesario modificarlos mediante: i) unión química de los grupos funcionales sobre el sustrato (funcionalización de sorbentes), ii) unión física de los grupos sobre el sorbente por impregnación de la matriz sólida con una solución que contenga

el ligando con el grupo funcional (lo que suele llamarse: impregnación, recubrimiento o carga del sorbente).

Para obtener una eficiente retención de especies iónicas metálicas, los grupos funcionales deben ser accesibles a las especies sin que ocurran impedimentos estéricos. En la práctica algunos grupos funcionales presentes en la superficie del sorbente pueden permanecer inactivos durante el proceso de retención.

Algunas de las funcionalidades que se unen a los sorbentes actúan como intercambiadores iónicos. Éstos actúan intercambiando con el contra-ión correspondiente, poseen sitios de intercambio fuertes y débiles. Entendiendo por sitios de intercambio fuertes aquellos que no se afectan por el pH del medio y débiles a los que sólo son activos a valores de pH mayores o menores al  $pK_a$ . Sitios de intercambio fuertes son los grupos ácidos sulfónicos (intercambio de cationes) y las aminas cuaternarias (intercambio de aniones) mientras que los sitios de intercambio débiles son grupos de ácidos carboxílicos (intercambio de cationes) y aminas primarias, secundarias y terciarias (intercambio de aniones).

Cuando la retención ocurre en microcolumnas hay que tener en cuenta la distribución del ión en el sorbente, las constantes de estabilidad de los complejos en solución, la cinética de intercambio y la presencia de iones concomitantes. Los sorbentes pueden retener iones hidratados, complejos con carga y complejos iónicos mediante ligandos lábiles, sin embargo hay que tener en cuenta que pueden presentar poca selectividad.

Para que la retención ocurra en forma eficiente hay que tener en consideración una serie de cosas como la capacidad de un compuesto específico de encontrarse en forma iónica y para ello debe elegirse el solvente de carga de muestra apropiado. El medio de carga debe contemplar la estabilidad del analito de interés, sus interacciones con el solvente de carga y el sorbente, de forma tal de promover la retención del analito. El estudio debe

realizarse de manera integral teniendo en cuenta la naturaleza química tanto del analito como del solvente y sorbente.

Para lograr una eficiente elución se debe realizar una cuidadosa elección del solvente de elución o eluyente. El solvente apropiado deberá exhibir una fuerte afinidad por el analito retenido para asegurar la ruptura de su interacción con el sorbente. La elución puede realizarse mediante el uso de ácidos que rompan la interacción y liberen al analito. Asimismo, debido a las interacciones presentes, la dependencia del pH permite el uso de eluyentes con diferentes valores de pH.

### 3. Dispositivos

El material sorbente puede alojarse como relleno en distintos sistemas: columnas, cartuchos, jeringas y discos (Figura 2). El diseño de las columnas y cartuchos puede variar para adaptarse a distintas características de cada sistema, por ejemplo, volumen de muestra, sistema de circulación del solvente o automatización. El material para la fabricación de dispositivos no debe liberar compuestos al medio por lo que en muchos casos se suele utilizar polipropileno y polietileno de grado médico para su fabricación.



Figura 2. Dispositivos convencionales en SPE.

Asimismo, en la bibliografía reciente se reportan nuevos sistemas como: los multijeringa en distintas variedades y los sistemas integrados en válvula. El libro del Dr. Víctor Cerdá (Universidad de las Islas Baleares, España) presenta una excelente revisión de los más novedosos sistemas integrados en línea [Cerdá, V. y col. 2014].

En este trabajo de Tesis doctoral se implementó un sistema de SPE en línea utilizando microcolumnas como dispositivo contenedor. Las microcolumnas permiten explorar distintos tamaños (diámetros y longitudes) y de esta forma variar la masa de sorbente contenida en las mismas. También permiten el pasaje de grandes volúmenes de muestra con lo cual hacen posible la preconcentración de analitos presentes a muy bajos niveles.

Las microcolumnas están pensadas para su re-utilización por lo cual el sistema debe permitir una correcta limpieza de la microcolumna previo a un nuevo ciclo de preconcentración para evitar contaminaciones cruzadas. Asimismo, las microcolumnas pueden utilizarse en sistemas de SPE en línea acopladas con distintas técnicas analíticas de detección. Para diseñar el sistema de SPE de forma eficiente debe prestarse especial atención al diseño de la microcolumna, el material sorbente y a los parámetros propios de la técnica analítica con la cual se acoplará.

#### **4. Ventajas de la Separación en Fase Sólida**

Algunas de las ventajas de esta metodología son: la disminución de los tiempos de procesamiento, disminución del uso de solventes y por lo tanto una menor exposición a los mismos, y menores costos de disposición final [Karadjova, I. y col. 2016; Huck, C. W. 2016]; realizando una adecuada optimización de parámetros (selección del sorbente, tipo de eluyente, etc.) es posible mediante la SPE obtener recuperaciones cuantitativas [Das, D. y col. 2012]. Asimismo, utilizando estos sistemas de pretratamiento se puede alcanzar

de forma simultánea la preconcentración de analitos y el control de interferentes. Están reportados factores de enriquecimiento extremadamente altos con una implementación eficiente del sistema de SPE (~ 1000) [Camel, V. 2003]. La técnica es muy versátil ya que al poder elegir entre una gran cantidad de sorbentes es posible abarcar un amplio espectro de aplicaciones.

La SPE permite realizar una separación selectiva del analito de interés evitando la presencia de iones mayoritarios. Esto es fundamental en muchos casos y en particular en sistemas acoplados con detecciones espectrométricas. La posibilidad de fabricar el sorbente y conferirle por ejemplo, mayor resistencia mecánica, mayor resistencia a los interferentes y mayor selectividad es otra ventaja fundamental del sistema de SPE [Tseng, W-C. y col. 2015].

El método permite la automatización mediante sistemas comerciales o *ad hoc* y de esta forma acoplarse en línea con las técnicas de cuantificación [Das, D. y col. 2012; Zagatto, E. A. G. y col. 1993]. El procesamiento de muestras en línea evita la manipulación de la muestra entre las etapas de preconcentración y análisis, esto permite minimizar el riesgo de pérdida y contaminación del analito [Huck, C. W. 2016] obteniendo alta reproducibilidad.

## 5. Materiales usados como sorbentes

Los materiales utilizados como sorbentes en sistemas SPE pueden ser clasificados según diferentes criterios:

- Basados en la naturaleza del material: inorgánicos porosos, inorgánicos porosos con una superficie funcionalizada con compuestos orgánicos, polímeros orgánicos sintéticos, polímeros orgánicos naturales y otros materiales.
- Basados en el tipo de compuesto a ser procesado: no-polar, polar, intercambio iónico, afinidad e inmuoafinidad, polímeros impresos, y otros tipos de sorbentes.

- Basados en el método de SPE: convencional, microextracción, *head space* y otras metodologías.

La clasificación de los sorbentes es arbitraria y compleja debido a que tienen más de un tipo de funcionalidad en su estructura e interactúan mediante más de un tipo de interacción con el analito.

Además, desde los '90 se han reportado trabajos que demuestran que es posible modificar los sorbentes mediante la inmovilización de compuestos orgánicos sobre su superficie [Emteborg, H. y col. 1993; Emteborg, H. y col. 1995]. Estas modificaciones se realizan usualmente mediante la incorporación de grupos funcionales para obtener una mayor selectividad en la separación. La selectividad de los sorbentes sólidos modificados hacia ciertos iones metálicos se atribuye a factores como: 1) el tamaño del compuesto orgánico utilizado para modificar el sorbente, 2) la actividad de los grupos funcionales sobre la superficie, y 3) el tipo de interacción de los grupos funcionales. Sin embargo, la retención selectiva de un único analito presente en muy baja concentración o de una especie específica del analito es un gran desafío ya que requiere encontrar un sorbente con la suficiente afinidad para retener selectivamente a esa especie metálica [Karadojova, I. y col. 2016].

A modo de ejemplo, Shakerian, F. y col. presentan a los polímeros iónicos impresos (materiales poliméricos avanzados), como sorbentes selectivos en SPE para la extracción, separación y detección de iones metálicos en distintas matrices: agua, corrientes de desecho, sedimentos y alimentos. Presentan a la impresión iónica como un proceso de modificación con el cual mejorar la selectividad de los polímeros y conferirles sitios específicos de unión [Shakerian, F. y col. 2016]. Otro ejemplo de la utilización de sorbentes modificados encontramos en el artículo de Pourjavid, M. R. y col. donde utilizaron un agente quelante (1-fenil-3-(2-tienil metil) tiourea) para modificar una columna de grafeno oxidado para separar de Mn(II), Fe(III) y Cu(II) que luego se

determinaron por FAAS en muestras de hojas de espinaca, miel, cabello, sangre y agua [Pourjavid, M. R. y col. 2016].

Teniendo en cuenta la gran potencialidad de estos sistemas en este trabajo de Tesis doctoral se propusieron como sustratos a los nanotubos de carbono modificados mediante oxidación seguida de un proceso de derivatización. En el siguiente capítulo se desarrollan las características fisicoquímicas generales de los nanotubos, sus antecedentes en aplicaciones como sorbentes y el aumento de sus capacidades al funcionalizarlos.

## **6. Metodología**

Dependiendo de la naturaleza del compuesto a determinar y el sorbente, los mecanismos de retención incluyen principalmente la adsorción, intercambio iónico, complejación y afinidad iónica. Sin embargo, los mecanismos de retención y elución en sistemas de SPE suelen ser mucho más complejos que los mecanismos analizados en forma individual y numerosos efectos pueden influenciar el proceso de retención y elución [Moldoveanu, S. y col. 2015].

La eficacia de un sistema de SPE está determinada por una adecuada implementación y un estricto control de los parámetros involucrados. Para ello, es necesario estudiar detalladamente todos los parámetros que intervienen en el proceso. Algunos de éstos son: la naturaleza química de la funcionalización y de la estructura de los sorbentes, selectividad, poder de separación, rango de estabilidad de pH, contenido de impurezas, características de los poros, área superficial, dimensión y geometría de las partículas, distribución de tamaño de partícula, material con que se fabrica la columna, estabilidad física, química y biológica de los sorbentes.

Debe elegirse el sorbente más apropiado según el analito a determinar, la matriz en la cual se encuentra, la técnica de detección a emplear y cualquier otro aspecto que pudiera condicionar la elección del sorbente. Luego, debe

realizarse la optimización de los parámetros que influyen en la retención del analito. En una primera etapa la optimización debe realizarse con soluciones preparadas a partir de estándares del analito a preconcentrar, luego deben utilizarse materiales de referencia certificados o muestras reales con o sin agregado del analito (enriquecidas) para poder evaluar la capacidad del método en condiciones reales. Esto es necesario debido a que la presencia de otros iones puede afectar la retención del analito en el material sorbente.

La naturaleza y propiedades del material sorbente son muy importantes para la retención eficiente de especies metálicas. Una cuidadosa elección del sorbente es vital para el exitoso desarrollo de un sistema de SPE. En forma genérica, los principales requisitos de un sorbente sólido son: 1) la posibilidad de retener un gran número de analitos en muy baja concentración en un amplio rango de pH, 2) rápida y cuantitativa sorción/elución, 3) alta capacidad de retención, 4) accesibilidad de sitios activos, y 5) posibilidad de regeneración. En este sentido, los sorbentes que retienen en poco tiempo al analito son preferidos ya que permiten una extracción más rápida y el incremento del caudal de carga.

En relación al tamaño de partícula hay que tener en cuenta dos factores en forma simultánea. Si bien tamaños de partícula chicos proporcionan una mayor área superficial y mejores propiedades de sorción, también pueden producir un aumento de presión en el sistema. Este aumento de presión puede tener una influencia negativa en los sistemas de SPE requiriendo de mayores tiempos de procesamiento y la aplicación de mayor presión (o vacío) para lograr el pasaje de la muestra a través del sorbente. Este aumento de presión junto con varios ciclos de retención/elución producen un aumento en la compactación del sorbente logrando en muchos casos bloquear el sistema de SPE.

Luego de elegido el sorbente y optimizado el proceso se necesita conocer la capacidad de retención del mismo. La capacidad de retención se

define como la máxima concentración de analito que es capaz de ser retenido por una determinada cantidad de sorbente.

Dentro de los parámetros que se estudian para la optimización del proceso encontramos los: a) de acondicionamiento, b) de carga, y c) de elución.

Durante la etapa de lavado/acondicionamiento se pueden eliminar posibles contaminantes remanentes en el sorbente y aire. Las características del solvente de acondicionamiento deben estar en concordancia con la naturaleza del material sorbente para asegurar una buena interacción con los grupos funcionales presentes. Asimismo, es aconsejable que el solvente de acondicionamiento sea de naturaleza similar a la muestra. En muchos casos en esta etapa puede usarse un mismo solvente que cumpla ambos requisitos. En general para muestras acuosas es aconsejable que el solvente utilizado tenga el mismo pH y fuerza iónica que la muestra a procesar. Cuando se utiliza la SPE mediada por procesos de intercambio iónico es posible utilizar soluciones reguladoras de pH (buffers) para el acondicionamiento del sorbente al pH deseado.

Dentro de los parámetros de carga encontramos el volumen de corte (*breakthrough*), es decir, el volumen máximo de muestra que puede pasar a través de una determinada masa de material sorbente colocado en la microcolumna antes que el analito comience a eluirse de la misma y no se obtengan recuperaciones cuantitativas (Figura 3).

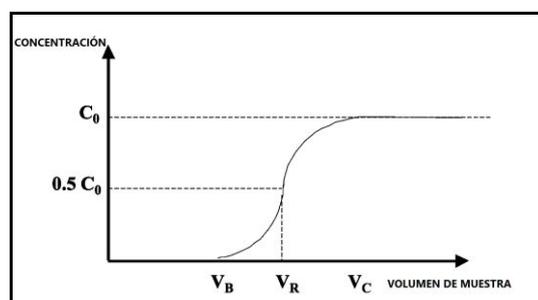


Figura 3. Concentración de analito ( $C/C_0$ ) en el efluente en función del volumen de muestra que atraviesa la columna de SPE.

El volumen de *breakthrough* depende tanto del tipo de sorbente y analito estudiado como de la masa de sorbente considerada y la concentración del analito en la muestra. También depende del tipo de dispositivo donde se encuentre confinado el material sorbente y del caudal de carga. Como este volumen está asociado a la pérdida del analito por la columna se busca que sea grande. Se define el punto  $V_B$  al volumen de muestra para el cual se empieza a observar la presencia del analito en el efluente. Generalmente se mide  $V_B$  al 1% de la concentración inicial de analito ( $C/C_0=1\%$ ) [Hennion, M-C. 1999]. Al continuar pasando muestra por la columna el valor de concentración del analito en el eluvato  $c$  se incrementa hasta alcanzar su máximo que es equivalente a la concentración inicial de la muestra  $C_0$ . El volumen de muestra eluída con un 99% de concentración de la concentración inicial ( $C/C_0=99\%$ ) se denomina  $V_c$ . La curva de *breakthrough* presenta un punto de inflexión cuyo valor corresponde al volumen de retención  $V_r$ .

Conocer el volumen de *breakthrough* para un sistema particular de SPE, un analito específico y en condiciones de operación conocidas es muy útil para asegurar que el analito de interés no se pierde de la columna durante la preconcentración de las muestras. Si el analito no se retiene apropiadamente en la columna el porcentaje de recuperación será bajo y posiblemente no reproducible. La retención de los analitos en la columna de SPE debe realizarse tal que el volumen de muestra a analizar se encuentre por debajo del volumen de *breakthrough*.

La determinación experimental del volumen de *breakthrough* es compleja y es por ello que se han desarrollado métodos para estimarlo [Poole, C. F. y col. 2000]. Para esta determinación debe tenerse en cuenta la naturaleza de la muestra y la posible presencia de ligandos que podrían provocar una disminución en el volumen de corte. En el desarrollo de esta Tesis doctoral se utiliza la capacidad de retención dinámica para poder estimar este parámetro.

El caudal de carga debe ser optimizado para asegurar una retención cuantitativa junto con la disminución del tiempo requerido para el procesamiento de las muestras. Este parámetro tiene un efecto directo sobre el volumen de *breakthrough* ya que caudales de carga elevados reducen este volumen [Poole, C. F. y col. 2000].

El pH de la muestra es un parámetro fundamental para lograr una eficiente retención de los analitos por el material sorbente y su influencia es muy dependiente de la naturaleza del sorbente. El valor de pH al cual se encuentre la solución de carga definirá la forma en la cual se encontrarán los grupos funcionales presentes en el sorbente y de esta manera es posible conseguir la retención de especies cargadas [Poole, C. F. y col. 2012]. Este parámetro debe ser cuidadosamente optimizado y es crucial para asegurar la retención cuantitativa del analito y en algunos casos la retención selectiva. El mecanismo de retención de especies iónicas está gobernado mayormente por el intercambio iónico en el sorbente. Este intercambio está basado en la capacidad del compuesto de encontrarse en forma iónica, retenerse, y ser eluído luego, por ejemplo, de la modificación del pH del solvente de elución, modificando de esta forma, su interacción por el sorbente [Moldoveanu, S. y col. 2015]. Por ejemplo, en el caso de los intercambiadores catiónicos, muy bajos pHs usualmente producen pobres extracciones debido a la competencia entre los protones y las especies catiónicas. Otro ejemplo, es el rol que tiene el pH en la retención de especies metálicas sobre la superficie de los nanotubos de carbono (CNTs) debido a que la carga que adquiere su superficie depende de la acidez del medio en que se encuentre [Pyrzynska, K. 2010]. Cuando el valor del  $\text{pH} > \text{pH}_{\text{pzc}}$  (pH de carga cero), los cationes metálicos pueden retenerse en la superficie de los CNTs oxidados, y es por ello que la retención de los iones metálicos aumenta al aumentar el valor del pH. Como el desempeño de los CNTs oxidados depende mayormente de la cantidad de especies conteniendo grupos funcionales oxigenados, diferentes valores de pH están reportados

como óptimos, por ejemplo para la retención de tierras raras (REEs), desde 1,5 [Jerez, J. y col. 2014] hasta 4,0 [Cho, J. y col. 2012].

La presencia de ligandos en la muestra es otra característica que debe estudiarse ya que puede afectar la retención del analito al poder formarse complejos estables, con lo cual el analito estaría menos disponible para su retención en el sorbente. La presencia de iones concomitantes también puede causar problemas/interferencias durante la SPE y es motivo de estudio para cada sistema de extracción. En particular, deben estudiarse los iones que se encuentran en altos niveles de concentración ya que pueden competir con el analito en el proceso de retención sobrecargando el sorbente o causando interferencias durante la etapa de análisis. También debe estudiarse el efecto de los distintos iones sobre las técnicas utilizadas para la cuantificación.

La etapa final del proceso de SPE es el pasaje de un solvente apropiado a través de la columna para eluir cuantitativamente el analito. La recuperación del analito depende de las propiedades del solvente (y su interacción con el analito) y de las interacciones específicas del analito con el sorbente.

El tipo de eluyente utilizado es fundamental para conseguir eficiencia y selectividad. Una alta afinidad del analito por la superficie del sorbente involucra una alta retención, lo cual *a priori* es deseable, sin embargo puede influenciar negativamente el proceso de elución y provocar una baja recuperación del analito. Es por ello que se debe seleccionar adecuadamente el solvente de modo de satisfacer los requerimientos específicos de su aplicación, es decir, eluir al analito sin eluir la matriz (donde se pueden encontrar retenidos los interferentes), o eluir la matriz sin afectar el analito retenido. Asimismo para obtener altos factores de enriquecimiento se busca que la elución completa del analito se consiga utilizando el menor volumen posible. Los eluyentes pueden ser orgánicos, inorgánicos o agentes complejantes [Camel, V. 2003]. Es posible modificar su identidad, concentración, pH y fuerza iónica para realizar experiencias secuenciales que permitan la elución cuantitativa de un analito

específico [Moldoveanu, S. 2015]. En algunos casos la elución puede ser selectiva y permitir la desorción de un analito frente a otros como en el caso de Bi(III) en presencia de Pb(II) y Cu(II), donde Yamini, Y. y col. utilizaron HCl 1 mol l<sup>-1</sup> para lavar Pb(II) y HCl 1,5 mol l<sup>-1</sup> para lavar Cu(II), ambos retenidos en una resina de C<sub>18</sub>-silica modificada con Cyanex 301 y luego se eluyó el analito de interés, Bi(III), utilizando HNO<sub>3</sub> 3 mol l<sup>-1</sup> [Yamini, Y. y col. 2002]. Otro caso donde se hace uso de la selectividad del eluyente, es para conseguir la especiación, es decir, la determinación selectiva de una especie. Por ejemplo, la utilización de HCOOH para remover selectivamente el Se(IV) de una resina de intercambio dejando retenido el Se(VI) que luego se eluye con HCl 2 mol l<sup>-1</sup> [Gomez-Ariza, J. L. y col. 1999]. También se encuentra reportado un sistema en línea que permite la especiación de Sb(V) y Sb(III) utilizando un eluyente reductor en una primera etapa para determinar Sb total y luego la elución selectiva de Sb(III), ambos retenidos sobre levaduras, para luego determinar la concentración de las especies por diferencia [Menagário, A. A. y col. 2006]. Tuzen, M. y col. desarrollaron un sistema de SPE utilizando como sorbente una resina comercial modificada con *Staphylococcus aureus* para la retención de metilHg y Hg(II), realizaron una elución secuencial y observaron que eluyendo con HCl 0,1 mol l<sup>-1</sup> conseguían la elución selectiva de metilHg en presencia de Hg(II). Encontraron también, que la elución cuantitativa del Hg(II) sólo era posible al utilizar concentraciones de HCl mayores a 2 mol l<sup>-1</sup> [Tuzen, M. y col. 2009]. La elución secuencial sigue siendo relevante encontrándose experiencias más recientes como, por ejemplo su aplicación a la determinación y cuantificación de drogas junto con sus metabolitos. En este caso, la sustancia de interés se retiene con sorbentes hidrofóbicos, luego las sales y compuestos polares se lavan con un solvente adecuado. Se acondiciona la columna con un eluyente ácido para protonar las bases presentes aumentando la retención por el mecanismo de intercambio iónico para luego eluir con un solvente orgánico y de esta forma separar las fracciones neutras de las ácidas [Poole, C. F. y col. 2012]. Otro

ejemplo lo encontramos en la separación de nanopartículas de Au de iones de Au. Para ello Su, S. y col. propusieron una novedosa estrategia basada en una separación en fase sólida magnética mediante la utilización de iones de Al(III) inmobilizados en nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ @ácido iminoacético como sorbente. Luego de la retención los iones de Au y las nanopartículas de Au fueron eluidos selectivamente con  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  y  $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ , respectivamente [Su, S. y col. 2014]. Finalmente, y no menos importante, el eluyente seleccionado debe ser compatible con las técnicas de análisis a utilizar para la cuantificación del analito.

En muchos casos, por cuestiones de practicidad las etapas de carga de muestra y elución son operadas de forma similar. Sin embargo, para evitar una adsorción irreversible, compactación del sorbente y asegurar recuperaciones cuantitativas se recomienda realizar la elución en contracorriente. Esto significa hacer pasar el eluyente en sentido opuesto al sentido de carga de la muestra.

Durante la optimización del caudal de elución se debe buscar una velocidad tal, que minimice el tiempo de esta etapa del proceso y a su vez permita la recuperación cuantitativa del analito estudiado [Camel, V. 2003]. Por ejemplo, eluciones cuantitativas de iones de Fe se obtienen con un caudal de 1 a  $3,5 \text{ ml min}^{-1}$  cuando se encuentra retenido en discos de  $\text{C}_{18}$ -silica [Shamsipur, M. y col. 2001]. En el caso de sorbentes alojados en cartuchos, están reportados caudales de elución típicos entre  $0,5$  y  $5 \text{ ml min}^{-1}$  y en el caso de sorbentes alojados en discos, entre 1 y  $20 \text{ ml min}^{-1}$  [Shamsipur, M. y col. 2000]. A modo general, encontramos que a mayores caudales de elución, mayores volúmenes de eluyente se necesitarán para lograr la elución completa [Shamsipur, M. y col. 2001; Shamsipur, M. y col. 2000; Shamsipur, M. y col. 2000]. Sin embargo, hay que encontrar una relación de compromiso entre estos dos factores, ya que menores volúmenes de elución son necesarios para obtener altos factores de enriquecimiento. Al igual que para el volumen de *breakthrough* es posible determinarlo experimentalmente o por estimaciones teóricas [Poole, C. F. y col.

2000]. La etapa de elución comprende la difusión de las especies metálicas retenidas en la superficie/poros del sorbente y para ello debe contar con tiempo suficiente. En algunos casos se pueden realizar eluciones en más de una etapa para mejorar el porcentaje de desorción [Camel, V. 2003]. También puede disminuirse el volumen de elución incrementando la concentración del eluyente (un ejemplo clásico es cuando se utilizan ácidos para eluir); sin embargo, como se mencionó hay que tener en cuenta los posibles inconvenientes que ello podría tener con las técnicas analíticas de cuantificación acopladas (por ejemplo, FA AAS) [Camel, V, 2003]. Otra alternativa para disminuir el volumen de elución es utilizar microdispositivos, como microcolumnas o microdiscos que permitan reducir el volumen de eluyente [Thurman, E. M. y col. 2000].

## 7. Cuantificación en sistemas SPE

La preconcentración alcanzada mediante SPE conduce a cambios en la concentración del analito al comparar su concentración en la muestra original y en la muestra procesada. Entre los parámetros que caracterizan el cambio en la cantidad y concentración de analito encontramos la recuperación  $R$  (Ecuación 7.1.) y el factor de enriquecimiento  $F$  (Ecuación 7.2.) ya mencionados anteriormente.

$$R = \frac{q_p}{q_i} \quad \text{Ecuación 7.1.}$$

Donde  $q_p$  es la cantidad de analito en la muestra procesada y  $q_i$  es la cantidad de analito en la muestra inicial.

$$F = \frac{c_p}{c_i} \quad \text{Ecuación 7.2.}$$

Donde  $c_p$  es la concentración en la muestra procesada y  $c_i$  es la concentración en la muestra inicial.

Durante la optimización del sistema de SPE se busca obtener recuperaciones cercanas al 100%. El parámetro  $R$  se puede evaluar aplicando la metodología optimizada a soluciones de concentración conocida preparadas por dilución de soluciones estándar. Las concentraciones deben elegirse cercanas a la concentración en la que se espera encontrar al analito en la muestra real.

Cuando se utilizan muestras líquidas, la Ecuación 7.2 puede expresarse en términos de volumen (Ecuación 7.3.) donde,  $V_{muestra}$ , es el volumen de muestra y  $V_{elución}$ , volumen de eluyente.

$$F = \frac{V_{muestra}}{V_{elución}} R \quad \text{Ecuación 7.3.}$$

La recuperación,  $R$ , considera el rendimiento tanto de la etapa de retención del analito en el sorbente como la elución del mismo.

## 8. Microseparación en fase sólida

Al igual que en otros campos de la ciencia, la miniaturización, recibe gran interés de la comunidad científica, ya sea para aprovechar los beneficios de nuevas propiedades que solo se manifiestan en materiales de dimensiones diminutas o para disminuir la cantidad de reactivos con fines de sustentabilidad. Los sistemas de SPE no escapan a esta realidad y la utilización de muy poca cantidad de sorbente para la retención de analitos de interés recibe el nombre de microseparación en fase sólida (SPME). La técnica requiere columnas de menor tamaño para alojar menor cantidad de sorbente pero el proceso se lleva a cabo con gran eficiencia. La SPME tiene la ventaja de ser fácilmente adaptable a los sistemas en línea convencionales. El fundamento de la técnica es el mismo que para la SPE convencional ya que consiste en exponer una pequeña cantidad

de sorbente a la solución de muestra con el propósito de que el analito se retenga en el sorbente.

## 9. Conclusiones

En este capítulo se han resumido las características más importantes del sistema de pretratamiento de SPE implementado en el desarrollo de esta Tesis doctoral. En los siguientes capítulos se aborda el uso de los nanotubos de carbono como material sorbente y sus modificaciones para finalmente presentar tres desarrollos concretos de la cuantificación de especies metálicas presentes en muy baja concentración en muestras de aguas de diversos orígenes, que no podrían haberse cuantificado a esos niveles con gran parte de las técnicas analíticas disponibles sin aplicar un sistema de preconcentración de la muestra.

## Referencias

- Acebal, C. C., Grünhut, M., Llamas, N. E., Insausti, M., Zelená, L., Sklenářová, H., Solich, P. y Fernández Band, B. S. (2016). An integrated on-line method for the preconcentration and simultaneous determination of metsulfuron methyl and chlorsulfuron using oxidized carbon nanotubes and second order fluorescent data. *Microchemical Journal*, 129, 90–97.
- Augusto, F., Carasek, E., Gomes Costa Silva, R., Rivellino, S. R., Domingues Batista, A. y Martendal, E. (2010). New sorbents for extraction and microextraction techniques. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2533–2542.
- Baltussen, E., Cramers, C. A. y Sandra, P. J. F. (2002). Sorptive sample preparation -- a review. *Anal. Bioanal. Chem.*, 373, 3-22.
- Beauchemin, D. (1991). Inductively coupled plasma mass spectrometry in hyphenation: a multielemental analysis technique with almost unlimited potential. *Trends in Anal. Chem.*, 10, 71-76.

- Camel, V. (2003). Solid phase extraction of trace elements. *Spectrochimica Acta Part B*, 58, 1177-1233.
- Camel, V. (2003). Solid-phase extraction. En Mester y Sturgeon (Eds). *Sample Preparation for Trace Element Analysis*. 393-453. Elsevier Science.
- Cerdá, V., Ferrer, L., Avivar, J. y Cerdá, A. (2014). Evolution and Description of the Principal Flow Techniques. *Flow Analysis A Practical Guide*. (pp. 1-64). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
- Choa, J., Chunga, K-W., Choia, M. S. y Kima, H-J. Analysis of rare earth elements in seawater by inductively coupled plasma mass spectrometry after pre-concentration using TSK™-HD-MW-CNTs (highly dispersive multi-walled carbon nanotubes). *Talanta*, 99, 369–374.
- Das, D., Gupta, U. y Das, A. K. (2012). Recent developments in solid phase extraction in elemental speciation of environmental samples with special reference to aqueous solutions. *Trends in Analytical Chemistry*, 38, 163-171.
- de Godoi Pereira, M. y Zezzi Arruda, M. A. (2003). Trends in Preconcentration Procedures for Metal Determination Using Spectrometry Techniques. *Microchim. Acta*, 141, 115-131.
- Emteborg, H., Baxter, D. C. y Frech, W. (1993). Speciation of mercury in natural waters by capillary gas-chromatography with a microwave-induced plasma emission detector following preconcentration using a dithiocarbamate resin microcolumn installed in a closed flow-injection system. *Analyst*, 118, 1007–1013.
- Emteborg, H., Baxter, D. C., Sharp, M. y Frech, W. (1995). Evaluation, mechanism and application of solid phase extraction using a dithiocarbamate resin for the sampling and determination of mercury species in humic-rich natural waters. *Analyst*, 120, 69–77.
- Fonseca, M. C., Nascimento, C. S. Jr. y Borges, K. B. (2016). Theoretical investigation on functional monomer and solvent selection for molecular imprinting of tramadol. *Chemical Physics Letters*, 645, 174–179.

- Gomez-Ariza, J. L., Pozas, J. A., Giraldez, I. y Morales, E. (1999). Use of solid phase extraction for speciation of selenium compounds in aqueous environmental samples. *Analyst*, 124, 75-78.
- Hennion, M-C. (1999). Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 856, 3-54.
- Huck, C. W. (2016). Recent Developments in Solid-Phase Extraction for Near and Attenuated Total Reflection Infrared Spectroscopic Analysis. *Molecules*, 21, 633.
- Jerez, J., Isaguirre, A. C., Bazán, C., Martinez, L. D. y Cerutti, S. (2014). Determination of scandium in acid mine drainage by ICP-OES with flow injection on-line preconcentration using oxidized multiwalled carbon nanotubes. *Talanta*, 124, 89-94.
- Karadjova, I., Dakova, I., Yordanova, T. y Vasileva, P. 2016. Nanomaterials for elemental speciation. *J. Anal. At. Spectrom.*, 31, 1949-1973.
- Krawczyk, M. y Stanisz, E. (2016). Ultrasound-assisted dispersive microsolid-phase extraction with nano-TiO<sub>2</sub> as adsorbent for the determination of mercury species. *Talanta*, 161, 384-391.
- Li, S., Deng, N., Zheng, F. y Huang, Y. (2003). Spectrophotometric determination of tungsten(VI) enriched by nanometer-size titanium dioxide in water and sediment. *Talanta*, 60, 1097-1104.
- Matusiewicz, H., Sturgeon, R., Luong, V. y Moffatt, K. (1991). Determination of copper, iron, manganese and zinc in river and estuarine water by atom trapping-flame atomic absorption spectrometry. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 340, 35-40.
- Menegário, A. A., Silva, A. J. Pozzi, E., Durrant, S. F. y Abreu, C. H. Jr. (2006). On-line determination of Sb(III) and total Sb using baker's yeast immobilized on polyurethane foam and hydride generation inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 61, 1074-1079.

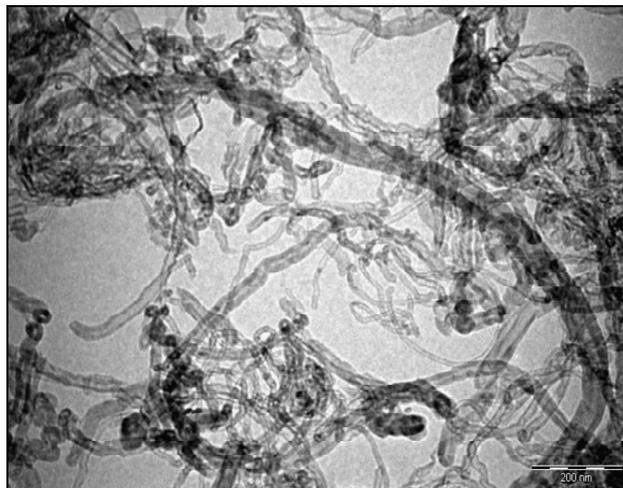
- Moldoveanu, S. y David, V. (2015). Solid phase extraction. Modern Sample Preparation for Chromatography. 191-286, Elsevier Science.
- Naghmush, A. M., Pyrzyńska, K. y Trojanowicz, M. (1995). Flame AAS determination of lead in water with flow-injection preconcentration and speciation using functionalized cellulose sorbent. *Talanta*, 42, 851-860.
- Panigati, M., Piccone, M., D'Alfonso, G., Orioli, M. y Carini, M. (2002). Determination of lead and cadmium in titanium dioxide by differential pulse anodic stripping voltammetry. *Talanta*, 58, 481-488.
- Poole, C.F., Gunatilleka, A.D. y Sethuraman, R. (2000). Contributions of theory to method development in solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A*, 885, 17-39.
- Poole, C. F. y Poole, S. K. (2012). Editor-in-Chief: Janusz Pawliszyn. Principles and Practice of Solid-Phase Extraction. Comprehensive Sampling and Sample Preparation. Volume 2: Theory of Extraction Techniques. 273-297. Elsevier Science.
- Pourjavid, M. R., Arabieh, M., Yousefi, S. R. y Sehat, A. A. (2016). Interference free and fast determination of manganese(II), iron(III) and copper(II) ions in different real samples by flame atomic absorption spectroscopy after column graphene oxide-based solid phase extraction. *Microchemical Journal*, 129, 259-267.
- Pyrzyńska, K. (2010). Carbon nanostructures for separation, preconcentration and speciation of metal ions. *Trends Anal. Chem.*, 29, 718-727.
- Pyrzyńska, K. y Trojanowicz, M. (1999). Functionalized Cellulose Sorbents for Preconcentration of Trace Metals in Environmental. *Analysis Crit. Rev. Anal. Chem.*, 29, 313-321.
- Saçmacı, Ş., Şahan, S., Şahin, U., Kartal, Ş. Y Ülgen, A. (2014). On-line solid-phase separation/preconcentration for the determination of copper in urine by flame atomic absorption spectrometry. *Materials Science and Engineering C*, 44, 240-245.

- Savio, M., Parodi, B., Martinez, L. D., Smichowski, P. y Gil, R. A. (2011). On-line solid phase extraction of Ni and Pb using carbon nanotubes and modified carbon nanotubes coupled to ETAAS. *Talanta*, 85, 245–251.
- Shamsipur, M., Avanes, A., Rofouei, M. K., Sharghi, H. y Aghapour, G. Solid phase extraction and determination of ultra trace amounts of copper (II) using octadecyl silica membrane disks modified by 11-hydroxynaphthacene-5, 12-quinone and flame atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 54, 863-869.
- Shamsipur, M., Ghiasvand, A. R., Sharghi, H. y Naeimi, H. (2000). Solid phase extraction of ultra trace copper(II) using octadecyl silica membrane disks modified by a naphthol-derivative Schiff's base. *Anal. Chim. Acta*, 408, 271-277.
- Shamsipur, M. y Mashhadizadeh, M. H. (2000). Preconcentration of trace amounts of silver ion in aqueous samples on octadecyl silica membrane disks modified with hexathia-18-crown-6 and its determination by atomic absorption spectrometry. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 367, 246-249.
- Shamsipur, M., Raoufi, F. y Sharghi, H. (2000). Solid phase extraction and determination of lead in soil and water samples using octadecyl silica membrane disks modified by bis-hydroxy-9,10-anthraquinone-2-methylsulphide and flame atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 52, 637-643.
- Shakerian, F., Kim, K-H., Kwon, E., Szulejko, J. E., Kumar, P., Dadfarnia, S. y Shabani, A. M. H. (2016). Advanced polymeric materials: Synthesis and analytical application of ion imprinted polymers as selective sorbents for solid phase extraction of metal ions. *Trends in Analytical Chemistry*, 83, 55-69.
- Su, S., Chen, B., He, M., Xiao, Z. y Hu, B. (2014). A novel strategy for sequential analysis of gold nanoparticles and gold ions in water samples by combining magnetic solid phase extraction with inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, 29, 444-453.
- Thurman, E. M. y Snavely, K. (2000). Advances in solid-phase extraction disks for

- environmental chemistry. *Trends Anal. Chem.*, 19, 18-26.
- Tseng, W-C., Hsu, K-C., Shiea, C. S. y Huang, Y-L. (2015). Recent trends in nanomaterial-based microanalytical systems for the speciation of trace elements: A critical review. *Analytica Chimica Acta*, 884, 1-18.
- Türker, A. R. (2007). New Sorbents for Solid-Phase Extraction for Metal Enrichment. *Clean*, 35, 548 – 557.
- Tuzen, M., Karaman, I., Citak, D. y Soylak, M. (2009). Mercury(II) and methyl mercury determinations in water and fish samples by using solid phase extraction and cold vapour atomic absorption spectrometry combination. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 1648–1652.
- Wadhwa, S. K., Tuzen, M., Gul Kazi, T. y Soylak, M. (2013). Graphite furnace atomic absorption spectrometric detection of vanadium in water and food samples after solid phase extraction on multiwalled carbon nanotubes. *Talanta*, 116, 205–209.
- Wang, L., Wang, L, Xia, T., Dong, L., Chen, H. y Li, L. Selective fluorescence determination of chromium(VI) with poly-4-vinylpyridine nanoparticles. *Spectrochim. Acta A*, 60, 2465–2468.
- Yamini, Y., Chaloosi, M. y Ebrahimzadeh, H. (2002). Solid phase extraction and graphite furnace atomic absorption spectrometric determination of ultra trace amounts of bismuth in water samples. *Talanta*, 56, 797-803.
- Zagatto, E. A. G., Brienza, S. M. B., Arruda, M. A. Z. y Jacinto, A. O. (1993). Sistemas de análises químicas por injeção em fluxo envolvendo troca-íonica: configurações básicas. *Quim. Nova*, 16, 130-132.

# Capítulo 2

## Nanotubos de Carbono como Material Sorbente



En este capítulo se desarrollan conceptos relacionados con los nanotubos de carbono, fundamentalmente: sus características y su utilización en sistemas de separación en fase sólida. Se hará hincapié en sus aplicaciones y la posibilidad de funcionalización para ser empleados como sorbente con alta selectividad.

### Abreviaturas

<i>CNTs</i>	Carbon nanotubes (Nanotubos de carbono)
<i>CVD</i>	Chemical vapor deposition (Deposición química en fase vapor)
<i>DCC</i>	N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (N,N'diciclohexilcarbodiimida)
<i>EDC</i>	N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimida
<i>EDS</i>	Energy dispersive spectroscopy (Espectroscopía dispersiva en energías)
<i>FTIR</i>	Fourier transform infrared spectroscopy (Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier)
<i>GCB</i>	Graphitized carbon black (Carbón grafitizado)
<i>LA</i>	Ablación laser
<i>MWCNTs</i>	Multi-walled carbon nanotubes (Nanotubos de carbono de pared múltiple)
<i>MWCNT-COCl</i>	Cloruro de acilo de MWCNTs
<i>MWCNT-COOH</i>	Nanotubos de carbono de pared múltiple oxidados
<i>PAHs</i>	Polycyclic aromatic hydrocarbons (Hidrocarburos aromáticos policíclicos)
<i>PGC</i>	Porous graphitic carbon (Carbón poroso grafitizado)
<i>SEM</i>	Scanning electron microscopy (Microscopía electrónica de barrido)
<i>SOCl<sub>2</sub></i>	Cloruro de tionilo
<i>SPE</i>	Solid phase extraction (Separación en fase sólida)
<i>SWCNTs</i>	Single-walled carbon nanotubes (Nanotubos de carbono de pared única)
<i>TEM</i>	Transmission electron microscopy (Microscopía electrónica de transmisión)

<i>TGA</i>	Thermogravimetric analysis (Análisis termogravimétrico)
<i>XPS</i>	X-ray photoelectron spectroscopy (Espectroscopia de fotoelectrones)
<i>XRD</i>	X-ray diffraction (Difracción de Rx)

## 1. Introducción

Los nanotubos de carbono (CNTs) fueron reportados por primera vez por Sumio Iijima en 1991 [Iijima, S. 1991] y desde entonces han despertado el interés de científicos del área de la química, física y materiales. Los CNTs pueden clasificarse como nanotubos de carbono de pared única (SWCNTs), formados por una única capa de grafeno (el grafeno es el nombre que se le dio a la monocapa de grafito, Novoselov, K. S. 2004, con diámetros de entre 1-2 nm, y nanotubos de pared múltiple (MWCNTs), formados por varias capas de grafeno enrolladas una sobre la otra en forma concéntrica con diámetros de entre 5 a 50 nm [Davis, J.J. y col. 2003]. Debido a su estructura, los CNTs han despertado gran interés en el ambiente científico por sus propiedades de transporte, alto módulo elástico, alta estabilidad térmica y gran área superficial disponible [Cai, Y. Q. y col. 2003], que les confieren múltiples aplicaciones tales como microscopías de sonda [Wu, Z. y col. 2015], sensores electroquímicos [Yang, J. y col. 2015], transistores de efecto de campo [Wang, M. y col. 2014], catálisis [Tourani, S. y col. 2015], medio para el almacenamiento de hidrógeno [Naresh Muthu, R. y col. 2016.], etc. Como consecuencia de la gran área superficial, la habilidad para establecer interacciones  $\pi$ - $\pi$  y su excelente estabilidad química, mecánica y térmica, los CNTs son muy atractivos como material sorbente en sistemas de separación en fase sólida (SPE).

Como se mencionó en el capítulo anterior, en los procesos de SPE se pueden utilizar numerosos tipos de sorbentes, entre ellos, el carbón activado ha sido uno de los primeros en utilizarse para esta aplicación. El carbón activado presenta una gran capacidad de sorción debido principalmente a su alta porosidad y su amplia disponibilidad de áreas superficiales que se encuentran en el rango de los 300 a 2500 m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup> [Efremenko, I. y col. 2006]. La estructura general del carbón activado consiste en pequeños cristales de grafito altamente desordenados, irregulares, con alta rugosidad y con una superficie heterogénea.

Las propiedades de sorción del carbón activado se encuentran fuertemente influenciadas por su área superficial específica, distribución de tamaño de poros y el contenido de elementos inorgánicos. La estructura superficial es muy compleja y depende del material de partida utilizado y de su método de producción, así como también de su pretratamiento. Los pretratamientos más usuales se basan en ataques ácidos oxidantes que causan la reorganización de la estructura, sus poros y su superficie y pueden afectar la capacidad de interacción con los iones metálicos [Boehm, H. P. 2002]. Si bien el carbon activado ha sido utilizado como sorbente [Cerutti, S. y col. 2005], presenta la desventaja de la heterogeneidad de su superficie cuyos grupos funcionales provocan que haya muy baja reproducibilidad del material sintetizado. Asimismo, dependiendo del origen del carbón, su naturaleza hidrofóbica puede impedir la difusión de las especies iónicas metálicas hacia el interior del sorbente, lo que hace más dificultoso su uso en condiciones dinámicas (estudios en línea) debido a que no se obtienen intercambios a la velocidad compatible con la metodología en línea [Terada, K. 1991].

En la búsqueda de sorbentes que combinaran las buenas propiedades de sorción del carbón activado y buscando superar sus limitaciones podemos nombrar la aparición del carbón grafitizado (GCB) que presenta una estructura más homogénea y por lo tanto mayor reproducibilidad y del carbón poroso grafitizado (PGC) que presenta mayor estabilidad que el GCB. El GCB ha sido muy utilizado en SPE de contaminantes orgánicos polares en muestras de agua [Forgács, E. y col. 2000] pero su uso para elementos traza es escaso [Ferri, T. y col. 1989]. Más recientemente se han empezado a utilizar fullerenos, moléculas cerradas de carbono con arreglo de anillos pentagonales y hexagonales y CNTs para la retención selectiva de especies metálicas en solución [Castro Grijalba, A. y col. 2015, Parodi, B. y col. 2015, Peña Crecente, R.M. y col. 2014] con resultados alentadores. En la Figura 1 se presentan las distintas estructuras de los materiales base carbono mencionadas.

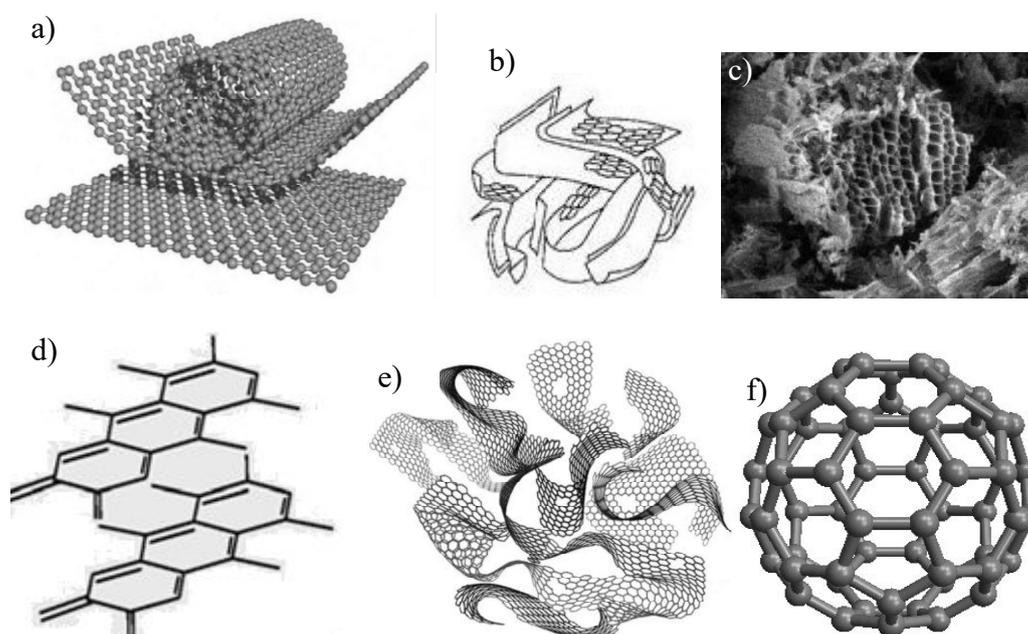


Figura 1. a) Esquema de una única capa de grafeno y la forma en que se enrolla para formar CNTs, b) microestructura del carbon activado, c) imagen SEM de un carbon activado (Air-n-Water Inc.<sup>®</sup>), d) estructura de un GCB, e) esquema de una estructura 3D de PGC, f) fullereno.

Cuando analizamos algunas de las excelentes propiedades de los CNTs, que ya se mencionaron, y se encuentran presentadas con profundidad en exhaustivas recopilaciones [Valcárcel, M. y col. 2007, Ravelo-Pérez, L. M. y col. 2010; Ren, X. y col. 2011;], encontramos que la propiedad más importante desde el punto de vista de la Química Analítica es que poseen la capacidad de establecer diferentes tipos de interacciones con analitos orgánicos e inorgánicos [Herrera-Herrera, A. V. y col. 2012] lo cual les confiere numerosas aplicaciones [Valcárcel, M. y col. 2005, Agui, L. y col. 2008, Wanekaya, A. K. 2011]. Asimismo, encontramos que los SWCNTs y los MWCNTs han sido señalados en numerosas ocasiones como los materiales más investigados del siglo XXI [Ying, L. S. y col. 2011] y como resultado del esfuerzo realizado por la comunidad científica

internacional numerosos logros que involucran estos materiales se han conseguido en diferentes campos, incluida la Química Analítica.

En esta Tesis doctoral se utilizan los CNTs para separar y preconcentrar iones metálicos presentes en matrices naturales/aguas a muy bajas concentraciones, por lo tanto el capítulo se desarrollará mencionando los aspectos más relevantes de los CNTs haciendo foco en esta aplicación.

Como se mencionó, los CNTs son los sorbentes de base carbono más estudiados recientemente [Pyrzynska, K. 2007]. Esto se debe, si los comparamos con el carbón activado, a que los CNTs poseen una estructura atómica bien definida y por lo tanto pueden obtenerse resultados reproducibles al preconcentrar iones metálicos. Asimismo, los arreglos atómicos hexagonales de cada una de las capas de grafeno que forman los CNTs son ideales para las interacciones fuertes con otras moléculas. Además, su gran área superficial los hace excelentes candidatos para la preconcentración de compuestos orgánicos e iones de metales de interés [Azevedo Lemos, V. A. y col. 2008, Pyrzynska, K. 2010]. Sin embargo, los CNTs sin modificar son insolubles y muy difíciles de dispersar en casi cualquier solvente, esto ocurre debido a las fuertes interacciones de van der Waals que obstaculizan la retención de iones metálicos. De allí surge la necesidad de modificar su superficie para mejorar la dispersión, la retención de iones metálicos y conferirles selectividad cuando se los quiere utilizar en estudios de SPE.

### **2. Elección del tipo de CNTs para su uso en SPE**

En la introducción se presentaron los dos tipos más importantes de CNTs: SWCNTs y MWCNTs. Se presenta un breve análisis de los mismos para comprender el motivo de la elección de los MWCNTs para el desarrollo de este trabajo.

Definimos a los SWCNTs como una única capa de grafeno enrollada formando un tubo cilíndrico sin costura y a los MWCNTs como un arreglo de estos nanotubos enrollados en forma de anillos concéntricos (Figura 2) [Baughman, R. H. y col. 2002]. La única capa de grafeno que forma los SWCNTs posee propiedades distintas a las esperables; por ejemplo, mientras el grafeno es un semiconductor donde el ancho de banda prohibida es cero, los SWCNTs pueden presentar comportamiento metálico o de semiconductor. La diferencia en el comportamiento depende de la dirección en la cual la capa de grafeno se enrolla para formar el tubo cilíndrico. Las propiedades electrónicas de los MWCNTs con estructura perfecta son similares a las de los SWCNTs con estructura perfecta ya que la interacción entre los cilindros que forman los MWCNTs es muy débil. La presencia de varias capas de grafeno dispuestas en forma concéntrica una alrededor de la otra en los MWCNTs le confieren una mayor área específica [Peigney, A. y col. 2001] y una mayor capacidad de adsorción [Yang, K. y col. 2007] debido a su superficie extremadamente hidrofóbica y su estructura única de cavidad tubular interna [Cai, Y.Q. y col. 2003]. Uno de los motivos de implementar sistemas de SPE está enfocado en el desarrollo y optimización de metodologías analíticas que permitan utilizar instrumentación menos sofisticada, esto redundaría en menores costos y la posibilidad de realizar los análisis en laboratorios que no posean la instrumentación mencionada. En este sentido cabe destacar que los MWCNTs son mucho más económicos que los SWCNTs [Liang, X. y col. 2014].

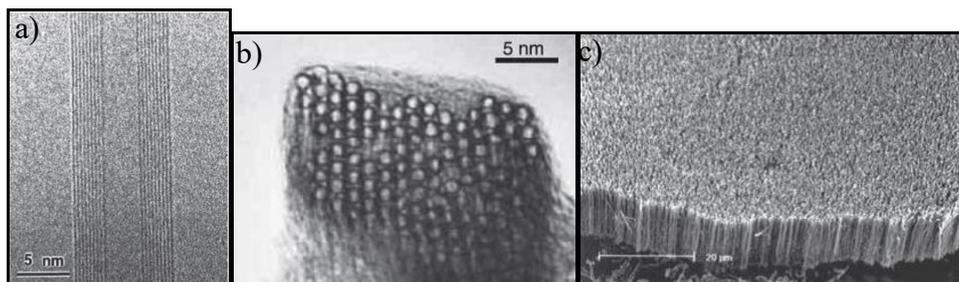


Figura 2. a) Imagen TEM de un MWCNT conteniendo nueve SWCNTs enrollados en forma concéntrica, b) imagen TEM de un manajo de SWCNTs de 1,4 nm de diámetro, c) imagen SEM de MWCNTs crecidos en forma de bosque. Adaptado de Baughman, R. H. y col. 2002.

En los últimos años los MWCNTs sin modificar han sido utilizados exitosamente en SPE para la extracción de diferentes compuestos orgánicos no polares como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), pesticidas, agentes químicos con fines bélicos, drogas, compuestos fenólicos, tioles, materia orgánica disuelta y cobalaminas [Liang, X. y col. 2014].

Los iones metálicos en solución se encuentran en forma hidratada o formando complejos con aniones sencillos y no se adsorben sobre los MWCNTs sin modificar. Para que ocurra la retención debería formarse un complejo hidrofóbico y de esa forma interactuar mediante fuerzas de van del Waals o interacciones hidrofóbicas con la superficie de los nanotubos. Para formar estos complejos hidrofóbicos se eligen agentes quelantes teniendo en consideración la velocidad con la que reaccionan con el metal, la solubilidad en agua y la estabilidad en el rango de pH. Por lo tanto, la utilización de MWCNTs sin modificar para la retención de especies metálicas requiere la formación de complejos hidrofóbicos como tratamiento previo a la carga de la muestra en la columna. Este procedimiento hace más compleja la técnica separativa y requiere mayores tiempos de procesamiento.

Como estrategia para lograr mejores condiciones de retención de especies metálicas, la modificación de MWCNTs se ha vuelto cada vez más

popular. Encontramos MWCNTs modificados mediante su oxidación y MWCNTs funcionalizados con diversos compuestos. Los MWCNTs oxidados se consiguen realizando oxidaciones fuertes con ácidos inorgánicos que introducen funciones hidroxilo, carbonilo y carboxilo sobre la superficie de los nanotubos y les confiere la habilidad de retener especies metálicas cuando el pH de la muestra se encuentra por encima del punto isoeléctrico adquirido por los MWCNTs oxidados. Asimismo, los MWCNTs funcionalizados se consiguen mediante la derivatización de MWCNTs oxidados. De esta forma es posible inmovilizar moléculas biológicas que le otorguen un alto grado de control y selectividad [Chen, R. J. y col. 2001].

Es imposible realizar un relevamiento de toda la bibliografía disponible y analizar exhaustivamente las características de cada uno de los sustratos y procedimientos involucrados, es por ello que mencionaremos a dos grupos de trabajo muy activos en la utilización de MWCNTs funcionalizados covalentemente para la retención de especies metálicas en solución. El grupo de Soyak, M. y col. ha utilizado MWCNTs modificados con polipirroles para formar un nanocompuesto que le permitió separar y preconcentrar Pb(II) a nivel de trazas en muestras de agua [Sahmetlioglu, E. y col. 2014]; también ha utilizado MWCNTs funcionalizados con 2-((3-sililpropilimino)metil fenol para la retención de Cu(II), Pb(II), Fe(II), Ni(II) y Zn(II) en muestras alimenticias (puerro, rábano, ananá y bananas) [Ghaedi, M. y col. 2013]; y MWCNTs funcionalizados con *Pseudomonas aeruginosa* para la retención de Co(II), Cd(II), Pb(II), Mn(II), Cr(III) y Ni(II) en muestras de relevancia ambiental [Tuzen, M. y col. 2008]. Asimismo, el grupo de Teixeira-Tarley, C. R. y col. ha utilizado MWCNTs funcionalizados con 3-mercaptopropiltrimetoxisilano para preconcentrar Cd(II) en muestras de agua y cigarrillo [Corazza, M. Z. y col. 2012] y Pb(II) en muestras de agua y sedimentos [Somera, B. F. y col. 2012]; MWCNTs oxidados se utilizaron para preconcentrar U(VI) en distintas muestras de agua [do Lago, A. C. y col. 2012], Sn(II y IV) también en muestras de agua [Costa, H. H. V. y col. 2011], y Co(II) en

muestras de agua y orina [Souza, J. M. O. y col. 2009]; sistemas de inyección en línea acoplados con espectrofotometría molecular UV-visible utilizando MWCNTs oxidados para la preconcentración de Cu(II) para su monitoreo en muestras de agua [de Fátima Lima, G. y col. 2010]; también ha utilizado MWCNTs oxidados para la preconcentración de Pb(II) en aguas (agua corriente, agua mineral, suero fisiológico y agua de mar sintética) y plantas medicinales (ajo y Ginkgo Biloba) [Barbosa, A. F. y col. 2007]; un nanocompuesto de alúmina sobre MWCNTs fue utilizado para preconcentrar Ni(II) en muestras de agua [Amais, R. S. y col. 2007]; utilizaron espectroscopia de absorción atómica con llama de termospray para determinar Cd(II) luego de preconcentrarlo con SPE utilizando MWCNTs oxidados en muestras de agua, de cigarrillo y material biológico de referencia (hígado bovino y centeno) [Teixeira-Tarley, C. R. y col. 2006].

El grupo de trabajo en el cual se desarrolló esta tesis utilizó MWCNTs para preconcentrar y especiar V(IV y V) en muestras de agua [Gil, R. A. y col. 2007], se utilizaron MWCNTs funcionalizados con L-tirosina para la retención de Co(II) [Pacheco, P. H. y col. 2009], MWCNTs se utilizaron para la preconcentración de Tl(I y III) [Gil, R. A. y col. 2009, Pacheco, P. H. y col. 2009], Cd(II) [Parodi, B. y col. 2011], Ni(II) y Pb(II) [Savio, M. y col. 2011], Hg(II) [Parodi, B. y col. 2014], Mo(VI) [Bazán, C. y col. 2014] y Bi(III) [Parodi, B. y col. 2015].

### **3. Métodos de síntesis de MWCNTs**

Se comentarán las técnicas más utilizadas para la obtención de MWCNTs haciendo foco en las características de los nanotubos como producto final y en los procesos de post tratamiento para obtener un producto de calidad suficiente y reproducible. No pretende ser una descripción exhaustiva sino un breve resumen que ayude a entender la necesidad de los procesos de purificación y caracterización con el fin de detectar posibles contaminantes que

puedan provenir del proceso de síntesis. Este conocimiento es necesario para evaluar posibles interferencias en el desarrollo del proceso de SPE.

Los MWCNTs pueden prepararse utilizando el método de evaporación de descarga por arco que se ha utilizado previamente para la obtención de fullerenos [Ebbesen, T. W. y col. 1992]. En la actualidad es posible obtener moderadas cantidades de MWCNTs con una relativa precisión en el número de capas utilizando procesos de descarga por arco [Keidar, M. 2007], ablación laser (LA) [Kusaba, M. y col. 2006] y la deposición química en fase vapor (CVD) [Flahaut, E. y col. 2005]. Además, la creciente demanda internacional de MWCNTs estimula la investigación en este campo para la búsqueda de nuevas tecnologías de síntesis, por ejemplo, el método del catalizador flotante o distintos tipos de forma de arco [Ying, L. S. y col. 2011].

Las características finales de los MWCNTs dependen fuertemente del proceso de síntesis utilizado. Por consiguiente, es posible obtener MWCNTs con los extremos cerrados o MWCNTs con los extremos abiertos, Figura 3; dimensiones (diámetro y largo), arreglo atómico (forma de unión entre láminas: zig-zag, armchair o quiral) y el número de paredes concéntricas, que se requiera, Figura 4.

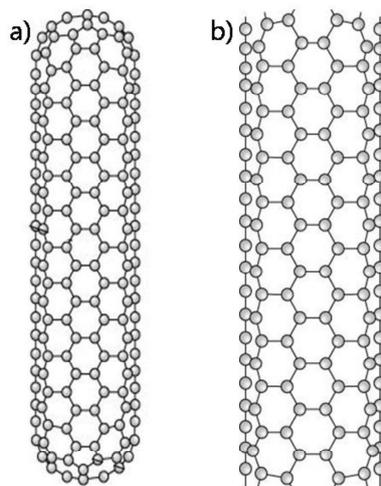


Figura 3. Esquema de un CNTs con a) extremos cerrados y, b) extremos abiertos.

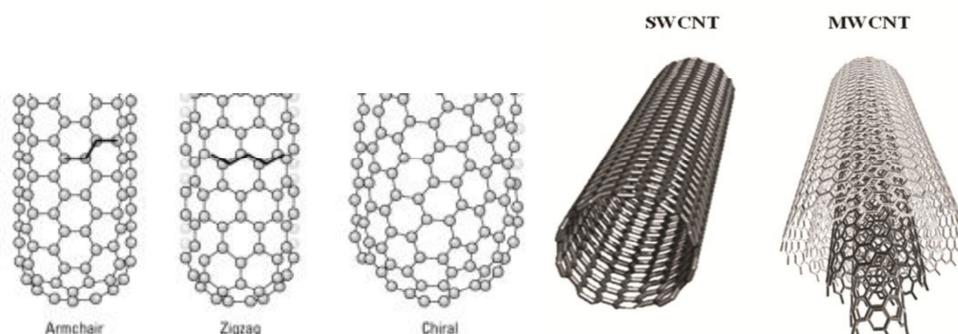


Figura 4. Esquema de los arreglos atómicos posibles y número de paredes en los CNTs.

Otro desafío de los procesos de síntesis es la cantidad de impurezas presentes en los MWCNTs, ya que es inevitable encontrar restos de carbono amorfo, fullerenos, nanopartículas de carbono y partículas metálicas utilizadas como catalizador. La presencia de estas impurezas pueden afectar las propiedades de los nanotubos. Para abordar esta problemática es necesario realizar post tratamientos de purificación [MacKenzie, K. y col. 2009] y utilizar técnicas de caracterización que nos ayuden a seguir el proceso [Belin, T. y col. 2005]. Existen métodos de purificación químicos, físicos y combinaciones de ambos que han sido ampliamente utilizados. Afortunadamente, debido a la demanda creciente, es posible encontrar en el mercado proveedores de MWCNTs de diferentes dimensiones, tipos y pureza.

#### 4. Modificación de la superficie de los MWCNTs

La necesidad de modificar la superficie de los MWCNTs ya se puso de manifiesto en este capítulo al revisar la forma de interacción que deben mostrar los nanotubos para conseguir interactuar con especies metálicas en solución y al mencionar la necesidad de remover impurezas que pudieran estar presentes en el material. También existen otros motivos que justifican la modificación de los MWCNTs, entre ellos podemos mencionar: modificar la baja dispersión que

presentan naturalmente los nanotubos hacia la mayoría de los solventes debido a las fuertes interacciones de van der Waals que existen entre los distintos manojos de tubos, remover los extremos que pudiesen estar cerrados por estructuras tipo fullerenos que no permiten el acceso al interior de los tubos y conferirle selectividad a los MWCNTs.

La estructura carbonada de los nanotubos los hace atractivos a los distintos procesos de modificación química. Cada reacción química sobre su estructura se utiliza para conferirles características particulares que pueden ser empleadas para una función específica. Si bien existen numeros procesos con el agregado de surfactantes para conseguir, por ejemplo, la dispersión en medios acuosos [López-Feria, S. y col. 2009.], vamos a hacer foco en los métodos de funcionalización de las paredes de los MWCNTs [Merkoci A. 2006] y tratamientos oxidativos en volumen [Valcárcel, M. y col. 2005].

Podemos separar las modificaciones como de carácter covalente y no-covalente [Meng, L. y col. 2009].

El cambio en la selectividad de los MWCNTs debido a la funcionalización covalente de su superficie ocurrirá en primer lugar en los extremos de los tubos, sobre la estructura tipo fullereno, que es más reactiva que las paredes de los nanotubos [Ravelo-Pérez, L. M. y col. 2010]. Para lograr la incorporación de grupos hidroxilo, carboxilo o carbonilo en las paredes de los nanotubos deben utilizarse condiciones severas de oxidación química debido a la alta estabilidad de la estructura [Wang, Y. y col. 2005]. En la bibliografía encontramos numerosas modificaciones químicas, como reacciones de halogenación, hidrogenación, adición de radicales, adición nucleofílica y cicloadiciones [Hirsch, A. y col. 2005]. Asimismo, las funcionalizaciones no-covalentes de la pared de los MWCNTs también producen cambios en la selectividad. Este tipo de funcionalización incluye interacciones iónicas (ej., dipolo-dipolo), acoplamiento de electrones  $\pi$ - $\pi$ , uniones por puentes de hidrógeno, fuerzas electrostáticas, fuerzas de van der Waals, uniones dativas e interacciones hidrofóbicas.

Esta breve introducción nos permite vislumbrar la gran cantidad de posibilidades que existen en función de las necesidades y la imaginación. Se profundizará en las modificaciones covalentes (oxidación y funcionalización con aminoácidos) que son las que se utilizaron para modificar los sustratos utilizados en el desarrollo de esta Tesis doctoral.

### **4.1. Modificaciones covalentes - Oxidación**

Las modificaciones covalentes generalmente se inician con una primera etapa de oxidación. Los procesos de oxidación se han vuelto populares por su simpleza y versatilidad, siendo posible utilizar ácidos, ozono o plasma. La utilización de condiciones severas de tratamiento, ácidos inorgánicos fuertes ( $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) y temperatura, provoca la remoción de las estructuras tipo fullereno que se encuentran en los extremos de los nanotubos, además generan defectos en las paredes de los CNTs que sirven de anclaje a los grupos  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$  y  $-\text{C}=\text{O}$  [Wepasnick, K. A. y col. 2010] (Figura 5), generan una superficie más hidrofílica [Xiaojing, L. y col. 2014], e inclusive llegan a cortar los nanotubos disminuyendo su largo. Asimismo, el tratamiento con ácidos es el más utilizado para remover carbono amorfo y partículas de óxidos metálicos provenientes del proceso de síntesis de los MWCNTs [Pyrzynska, K. 2010]. La incorporación de estos grupos aporta átomos con pares de electrones libres capaces de formar complejos con los iones metálicos a retener [Sitko, R. y col. 2012] y la presencia de grupos con oxígeno facilita la exfoliación de los manojos de CNTs y por lo tanto aumenta su dispersión en medios polares. Los grupos introducidos son la base para posteriores derivatizaciones que le conferirán a los nanotubos selectividades particulares.

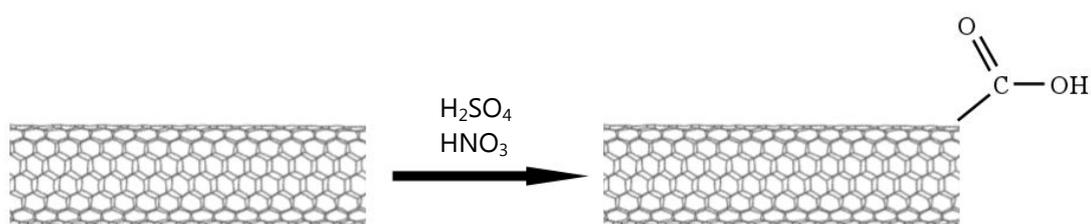


Figura 5. Proceso de oxidación de CNTs.

Los grupos funcionales formados sobre la superficie de los MWCNTs hacen que exista un valor de pH llamado “punto de carga cero” [Boehm, H. P. 2002] o “punto isoeléctrico”, es decir que habrá un valor de pH para el cual la carga de los MWCNTs sea cero. Cuando el valor de pH de la solución en contacto con la superficie del nanotubo se encuentre por encima del punto isoeléctrico la superficie adquirirá una carga negativa y sus interacciones electrostáticas se estabilizarán al sorber especies catiónicas. La presencia de sitios activos sobre la superficie, el interior de los nanotubos y el espacio internanotubo contribuyen a la capacidad de retención de especies metálicas de los MWCNTs. Por el contrario, cuando el valor del pH disminuye por debajo del punto isoeléctrico los protones compiten con las especies catiónicas por los mismos sitios y la capacidad de sorción de los nanotubos hacia las especies catiónicas disminuye. En este sentido, debido a que las especies metálicas son pobremente retenidas a pHs ácidos, soluciones conteniendo HCl o HNO<sub>3</sub> son utilizadas para eluir ya que el protón desplazará a la especie retenida. El efecto del pH es fundamental y debe ser cuidadosamente estudiado en los sistemas de SPE para la retención de especies metálicas [Ravelo-Pérez, L. M. y col. 2010].

Como se mencionó, la funcionalización covalente requiere de condiciones severas de oxidación debido a la estabilidad de la estructura de los MWCNTs lo que puede provocar alteraciones en su superficie, modificando sus propiedades y pudiendo afectar la capacidad de sorción de los MWCNTs [Herrera-Herrera, A. V. y col. 2012]. El estudio de Wang, S. reporta que la

funcionalización covalente no debería superar el 10% de la superficie del nanotubo, siendo este un porcentaje de compromiso entre los beneficios aportados por la funcionalización y el deterioro de la estructura [Wang, S. 2009]. Sin embargo, estos aspectos deben verificarse utilizando técnicas que nos permitan cuantificar el grado de funcionalización y por otro lado observar microscópicamente el efecto sobre la estructura del nanotubo.

Los tratamientos de oxidación producen una mejora significativa en la dispersión de los MWCNTs debido a la disminución de la atracción de las fuerzas de van der Waals y la repulsión que se establece entre los grupos funcionales. Como consecuencia adicional, la dispersión facilita la utilización de varias técnicas de caracterización.

#### **4.2. Funcionalización con aminoácidos**

Es posible derivatizar los grupos formados durante el proceso de oxidación de forma de inmovilizar biomoléculas sobre los MWCNTs y así lograr un sustrato con mayor selectividad [Azevedo Lemos, V. y col. 2008] (Figura 6). La mayoría de las derivatizaciones se realizan a partir de la formación de amidas y ésteres. Estos grupos presentan alta reactividad pudiendo reaccionar con una gran cantidad de moléculas.

Los aminoácidos y péptidos han demostrado ser de gran interés como nuevos sustratos en la preconcentración y/o especiación de especies metálicas en solución debido a la afinidad que poseen para ligar metales. Han sido utilizados en diferentes campos de la nanotecnología [Schiffrin, A. y col. 2007], estudios de la interacción metal-aminoácido [Stair, J. L. y col. 2007] y separación y preconcentración de metales [White, B. R. y col. 2007].

Los aminoácidos poseen diferentes grupos funcionales con diferente afinidad para unir metales, su selectividad, fuerte capacidad de unión e inocuidad ambiental son algunas de las propiedades que los hacen biomoléculas ideales para ser utilizadas en la preconcentración de metales traza

[Wildgoose, G. G. y col. 2005]. Asimismo, al inmovilizar estas moléculas se les confiere una orientación específica con la cual deben lograr la formación del complejo con el metal a retener.

Ante la presencia de aminoácidos tenemos que tener en cuenta tanto la retención de las especies metálicas por la formación del complejo como las interacciones no-covalentes que pueden presentar con el metal. Los aminoácidos actúan como ligandos bidentados haciendo uso de su grupo carboxílico y del átomo de nitrógeno del grupo amino.

La forma más general de preparar MWCNTs funcionalizados con aminoácidos consta de dos etapas:

- 1) la obtención del cloruro de acilo (MWCNT-COCl) que se forma mediante la reacción de los MWCNTs oxidados (MWCNT-COOH) con cloruro de tionilo ( $\text{SOCl}_2$ )
- 2) la formación del producto final reemplazando el cloro para formar una amida

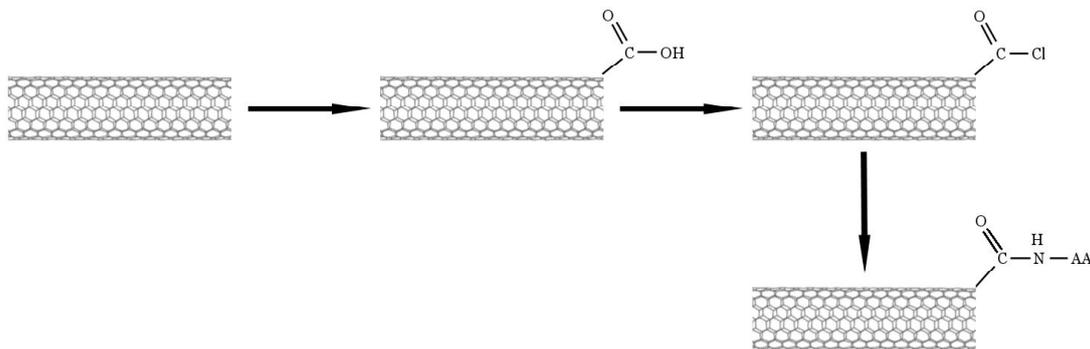


Figura 6. Esquema de ruta sintética para funcionalizar MWCNTs con aminoácidos.

Esta ruta sintética es la más común, sin embargo también se han reportado amidaciones directas utilizando la activación por diimida con compuestos de entrecruzamiento, donde los MWCNT-COOH son activados con

hipoclorato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) o N,N'diciclohexilcarbodiimida (DCC).

Durante la funcionalización, la inmovilización de los aminoácidos a través del grupo amino se produce con mayor extensión (para formar la amida anclada a los MWCNTs), dejando el grupo carboxilato libre para interactuar con los metales.

Otro aspecto a considerar lo encontramos en la etapa de elución. Si bien al disminuir el pH los protones desplazan a las especies catiónicas metálicas retenidas sobre el sustrato, está demostrado que los ácidos también pueden provocar un cambio reversible en la estructura terciaria de los aminoácidos produciendo una rápida y eficiente liberación del metal retenido desde el sitio de unión [Miller, T. C. y col. 2001].

De esta forma es posible modificar los MWCNTs basándonos en la creación de uniones amida para inmovilizar aminoácidos, ej. L-cisteína [Liu, Y. y col. 2008], L-tirosina [Pacheco, P. H. y col. 2009a y 2009b], L-alanina [Parodi, B. y col. 2011, Savio, M. y col. 2011], L-prolina [Parodi, B. y col. 2015] y hexahistidina [Liu, Y. y col. 2009]. La funcionalización con aminoácidos busca incrementar la selectividad de los MWCNT-COOH. Como precedente podemos mencionar: 1) los MWCNTs funcionalizados con L-cisteína y su aplicación en SPE para la retención de Cd(II) donde se evidenció que la fuerza iónica de la solución no afectaba la retención de Cd(II) con su consiguiente ventaja al analizar muestras provenientes de matrices complejas; y 2) los MWCNTs funcionalizados con hexahistidina que mostraron un incremento en la cinética de retención de Cu(II) y Ni(II) inclusive al incrementar en 20.000 y 1.800 veces la concentración de iones interferentes en sistemas de SPE, respectivamente.

## 5. Técnicas de caracterización

Para evaluar las modificaciones introducidas en la estructura de los nanotubos y entender los procesos de modificación, es necesario hacer una caracterización lo mas completa posible utilizando una gran cantidad de técnicas instrumentales. Es necesario como primer paso, conocer las características fisicoquímicas de los MWCNTs a los cuales someteremos tanto a procesos de oxidación como a su posterior funcionalización con aminoácidos. Entre las técnicas que más se utilizan para esta caracterización encontramos en la bibliografía, la microscopía electrónica, el análisis termogravimétrico (TGA), espectroscopía Raman, espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia de fotoelectrones (XPS) y la difracción de Rx (XRD).

Sin embargo, hay que tener en cuenta que la identificación inequívoca de los grupos presentes en la estructura de los nanotubos presenta un desafío mayúsculo para las técnicas de caracterización disponibles.

La utilización de la microscopía electrónica tanto de transmisión (TEM) como de barrido (SEM) permiten observar la morfología de los nanotubos con una gran magnificación y resolución. Con estas técnicas podemos determinar el grado de aglomeración y las dimensiones de los nanotubos (longitudes y diámetros). También es posible analizar el grado de purificación que tienen los MWCNTs, como materia prima, ya que podremos observar la presencia de defectos en las paredes de los tubos, nanopartículas de carbono amorfo y nanopartículas metálicas provenientes del catalizador utilizado en la síntesis. Asimismo al analizar los MWCNT-COOH y los funcionalizados podremos evaluar la presencia de modificaciones estructurales. Podremos observar si los extremos de los nanotubos lograron abrirse o no y como se manifiestan los defectos introducidos por el proceso de oxidación en la morfología de los nanotubos (pliegues de la estructura, acortamiento en el largo). También es posible hacer uso de la espectroscopía dispersiva en energías (EDS) que acoplada a la

microscopía electrónica nos brinda información sobre los elementos presentes en la muestra. Con esta técnica podremos saber de forma semicuantitativa el porcentaje de cualquier heteroátomo introducido.

El análisis de los difractogramas obtenidos por XRD permitirá analizar la estructura cilíndrica de las paredes del nanotubo y compararlas. También puede compararse el espaciado interplanar de cada una de las muestras y observar si los procesos de modificación han alterado este parámetro. El estudio por XRD nos permitirá decir si los procesos de modificación han cambiado o no la estructura general de los MWCNTs.

La espectroscopía Raman nos brinda información relacionada con cambios estructurales en los MWCNTs, especialmente los cambios provenientes de una modificación significativa en sus paredes. Los picos característicos llamados banda D y banda G sufren pequeñas modificaciones debido a la aparición de heteroátomos sustitucionales, vacancias y otros defectos que en su conjunto disminuyen la simetría cristalina de la estructura. Tanto el proceso de oxidación como el de funcionalización introducen defectos en la estructura por lo cual esta espectroscopía nos permitirá evaluar la extensión de las modificaciones en los sustratos sintetizados.

La espectroscopía infrarroja (FTIR) en la región del infrarrojo medio (200 a  $4000\text{ cm}^{-1}$ ) corresponde a las vibraciones moleculares y el estudio de sus espectros permite indentificar las vibraciones de los distintos enlaces presentes entre los átomos que forman la estructura de los nanotubos, con ello caracterizaremos tanto la estructura primaria como la formación de nuevos enlaces. La espectroscopía IR nos permite analizar las especies que se encuentran sobre la superficie de los MWCNTs. Existen varias formas de espectroscopía infrarroja, la más común es la espectroscopía infrarroja de transmisión, sin embargo las características de las muestras hacen que utilicemos la técnica de reflectancia difusa.

El análisis por TGA brinda información sobre el porcentaje de impurezas debido a la presencia de nanopartículas metálicas, carbono amorfo y la cantidad de estructuras de menor estabilidad presentes los MWCNTs comerciales. También nos permite conocer el comportamiento frente a la temperatura de los grupos funcionales y aminoácidos introducidos en la estructura.

### Referencias

- Agüi, L., Yáñez-Sedeño, P., Pingarrón, J. M. (2008). Role of carbon nanotubes in electroanalytical chemistry: A review. *Analytica Chimica Acta*, 622, 11-47.
- Amais, R. S., Ribeiro, J. S., Segatelli, M. G., Yoshida, I. V. P., Luccas, P. O., y Texeira-Tarley, C. R. (2007). Assessment of nanocomposite alumina supported on multi-wall carbon nanotubes as sorbent for on-line nickel preconcentration in water samples. *Separation and Purification Technology*, 58, 122–128.
- Azevedo Lemos, V., Sena Gomes Teixeira, L., de Almeida Bezerra, M., Spínola Costa, A. C., Teixeira Castro, J., Martins Cardoso, L. A., de Jesus, D. S., Souza Santos, E., Baliza, P. X., y Novaes Santos, L. (2008). New Materials for Solid-Phase Extraction of Trace Elements. *Applied Spectroscopy Reviews*, 43, 303-334.
- Barbosa, A. F., Gava Segatelli, M., Pereira, A. C., de Santana Santos, A., Kubota, L. T., Luccas, P. O., y Teixeira Tarley, C. R. (2007). Solid-phase extraction system for Pb (II) ions enrichment based on multiwall carbon nanotubes coupled on-line to flame atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 71, 1512–1519.
- Baughman, R. H., Zakhidov, A. A., de Heer, W. A. (2002). Carbon Nanotubes-the Route Toward Applications. *Science*, 297, 787-792.
- Bazán, C., Gil, R., Smichowski, P., y Pacheco, P. (2014). Multivariate optimization of a solid phase extraction system employing l-tyrosine immobilized on carbon nanotubes applied to molybdenum analysis by inductively coupled

- plasma optical emission spectrometry with ultrasound nebulization. *Microchemical Journal*, 117, 40-45.
- Belin, T., y Epron, F. (2005). Characterization methods of carbon nanotubes: a review. *Materials Science and Engineering: B*, 119, 105–118.
- Boehm, H. P. (2002). Surface oxides on carbon and their analysis: a critical assessment. *Carbon*, 40, 145-149.
- Cai, Y. Q., Jiang, G. B., Liu, J. F., y Zhou, Q. X. (2003). Multiwalled Carbon Nanotubes as a Solid-Phase Extraction Adsorbent for the Determination of Bisphenol A, 4-n-Nonylphenol, and 4-tert- Octylphenol. *Anal. Chem.*, 75, 2517-2521.
- Castro Grijalba, A., Escudero, L. B., y Wuilloud, R. G. (2015). Ionic liquid-assisted multiwalled carbon nanotubes-dispersive micro-solid phase extraction for sensitive determination of inorganic As species in garlic samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 110, 118-123.
- Cerutti, S., Moyano, S., Marrero, J., Smichowski, P., y Martínez, L. D. (2005). On-line preconcentration of nickel on activated carbon prior to its determination by vapor generation associated to inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, 20, 559-561.
- Chen, R.J., Zhang, Y., Wang, D., y Dai, H. (2001). Noncovalent sidewall functionalization of single-walled carbon nanotubes for protein immobilization. *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 3838-3839.
- Corazza, M. Z., Somera, B. F., Segatelli, M. G., y Texeira-Tarley, C. R. (2012). Grafting 3-mercaptopropyl trimethoxysilane on multi-walled carbon nanotubes surface for improving on-line cadmium(II) preconcentration from water samples. *Journal of Hazardous Materials*, 243, 326-333.
- Costa, H. H. V., De Fátima Lima, G., Nacano, L. R., y Texeira-Tarley, C. R. (2011). Preconcentration/cleanup studies of tin from environmental water samples

- by oxidized multiwall carbon nanotubes packed column and its determination by ETAAS. *Water, Air, and Soil Pollution*, 217, 557-565.
- Davis, J. J., Coleman, K. S., Azamian, B. R., Bagshaw, C. B., y Green, M. L. H. (2003). Chemical and Biochemical Sensing with Modified Single Walled Carbon Nanotubes. *Chem. Eur.J.*, 9, 3732-3739.
- de Fátima Lima, G., de Jesus Souza, P. M., Gava Segatelli, M., Orival Luccas, P., y Teixeira Tarley, C. R. (2010). Spectrophotometric flow-injection system using multiwalled carbon nanotubes as solid preconcentrator for copper monitoring in water samples. En M. Fan, C. Huang, A. E. Bland, Z. Wang, R. Slimane y I. Wright (Eds). *Environanotechnology* (pp 177-198). Great Britain: Elsevier.
- do Lago, A. C., Lima, G. de F., Segatelli, M. G., y Texeira-Tarley, C. R. (2012). Highly sensitive  $\text{UO}_2^{2+}$  ion preconcentration method based on flow sorbent extraction using multiwall carbon nanotubes. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 92, 767-782.
- Ebbesen, T. W., y Ajayan, P. M., (1992). Large-scale synthesis of carbon nanotubes. *Nature*, 358, 220-222.
- Efremenko, I., y Sheintuch, M. (2006). Predicting solute adsorption on activated carbon: phenol. *Langmuir*, 22, 3614-3621.
- Ferri, T., Cadarelli, E., y Petronio, B. M. (1989). Determination of tin and triorganotin compounds in sea-water by graphite-furnace atomic-absorption spectrophotometry. *Talanta*, 36, 513-517.
- Flahaut, E., Laurent, C., y Peigney, A. (2005). Catalytic CVD synthesis of double and triple-walled carbon nanotubes by the control of the catalyst preparation. *Carbon*, 43, 375-383.
- Forgács, E., Eltekova, N. A., Berek, D., Novák, I., y Belliardo, F. (2000). Adsorption of organic compounds on porous carbon sorbents. *Carbon*, 38, 373-377.
- Ghaedi, M. , Montazerzohori, M., Biyareh, M.N., Mortazavi, K., y Soylak, M. (2013). Chemically bonded multiwalled carbon nanotubes as efficient material

- for solid phase extraction of some metal ions in food samples. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 93, 528-542.
- Gil, R. A., Goyanes, S. N., Polla, G., Smichowski, P., Olsina, R. A., y Martínez, L. D. (2007). Application of multi-walled carbon nanotubes as substrate for the on-line preconcentration, speciation and determination of vanadium by ETAAS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 22, 1290-1295.
- Gil, R. A., Pacheco, P. H., Smichowski, P., Olsina, R. A., y Martínez, L. D. (2009). Speciation analysis of thallium using electrothermal AAS following on-line pre-concentration in a microcolumn filled with multiwalled carbon nanotubes. *Microchimica Acta*, 167, 187-193.
- Herrera-Herrera, A. V., González-Curbelo, M. Á., Hernández-Borges, J., y Rodríguez-Delgado, M. Á. (2012). Carbon nanotubes applications in separation science: A review. *Analytica Chimica Acta*, 734, 1– 30.
- Hirsch, A., y Vostrowsky, O. (2005). Functionalization of carbon nanotubes. *Topics in Current Chemistry*, 245, 193-237.
- Iijima, S. (1991). Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, 354, 56-58.
- Keidar, M. (2007). Factors affecting synthesis of single wall carbon nanotubes in arc discharge. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 40, 2388-2393.
- Kusaba, M., y Tsunawaki, Y. (2006). Production of single-wall carbon nanotubes by a XeCl excimer laser ablation. *Thin Solid Films*, 506, 255–258.
- Liang, X., Liu, S., Wang, S., Guo, Y. y Jiang, S. (2014). Carbon-based sorbents: Carbon nanotubes. *Journal of Chromatography A*, 1357, 53-67.
- Liu, Y., Li, Y., y Yan, X. (2008). Preparation, Characterization, and Application of L-Cysteine Functionalized Multiwalled Carbon Nanotubes as a Selective Sorbent for Separation and Preconcentration of Heavy Metals. *Adv. Funct. Mater.*, 18, 1536-1543.
- Liu, Y. Li, Y., Yan L., Wu, Z., Yan, X. (2009). Fabrication and characterization of hexahistidine-tagged protein functionalized multi-walled carbon nanotubes for selective solid-phase extraction of  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$ . *Talanta*, 79, 1464-1471.

- López-Feria, S., Lucena, R., Cárdenas, S., y Valcárcel, M. (2009). Surfactant-coated carbon nanotubes for the liquid-liquid extraction of phthalates and other migrants in virgin olive oils. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395, 737-746.
- MacKenzie, K., Dunens, O., y Harris, A. T. (2009). A review of carbon nanotube purification by microwave assisted acid digestion. *Separation and Purification Technology*, 66, 209–222.
- Meng, L., Fu, C., y Lu Q. (2009). Advanced technology for functionalization of carbon nanotubes. *Progress in Natural Science*, 19, 801–810.
- Merkoci, A. (2006). Carbon Nanotubes in Analytical Sciences. *Microchimica Acta*, 152, 157-174.
- Miller, T. C., Kwak, E. S., Howard, M. E., Vanden Bout, D. A., y Holcombe, J. A. (2001). An in Situ Study of Metal Complexation by an Immobilized Synthetic Biopolymer Using Tapping Mode Liquid Cell Atomic Force Microscopy. *Anal. Chem.*, 73, 4087–4095.
- Naresh Muthu, R., Rajashabala, S., Kannan, R. (2016). Hexagonal boron nitride (h-BN) nanoparticles decorated multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) for hydrogen storage. *Renewable Energy*, 85, 387-394.
- Novoselov, K. S., Geim, A. K., Morozov, S. V., Jiang, D., Zhang, Y., Dubonos, S. V., Grigorieva, I. V., y Firsov, A. A. (2004). Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films. *Science*, 306, 666-669.
- Pacheco, P. H., Smichowski, P., Polla, G., y Martinez, L. D. (2009a). Solid phase extraction of Co ions using l-tyrosine immobilized on multiwall carbon nanotubes. *Talanta*, 79, 249-253.
- Pacheco, P. H., Gil, R. A., Smichowski, P., Polla, G., y Martinez, L. D. (2009b) L-Tyrosine immobilized on multiwalled carbon nanotubes: A new substrate for thallium separation and speciation using stabilized temperature platform furnace-electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 656, 36-41.

- Parodi, B., Savio, M., Martinez, L. D., Gil, R. A., y Smichowski, P. (2011). Study of carbon nanotubes and functionalized-carbon nanotubes as substrates for flow injection solid phase extraction associated to inductively coupled plasma with ultrasonic nebulization. Application to Cd monitoring in solid environmental samples. *Microchemical Journal*, 98, 225-230.
- Parodi, B., Londonio, A., Polla, G., Savio, M., y Smichowski, P. (2014). On-line flow injection solid phase extraction using oxidised carbon nanotubes as the substrate for cold vapour-atomic absorption determination of Hg(II) in different kinds of water. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 29, 880-885.
- Parodi, B., Londonio, A., Polla, G., y Smichowski, P. (2015). On-line solid phase extraction of bismuth by FI-HG-AAS using L-proline immobilised on carbon nanotubes combined with factorial design. *Microchemical Journal*, 122, 70-75.
- Peigney, A., Laurent, Ch., Flahaut, E., Bacsá, R. R., y Rousset, A. (2001). Specific surface area of carbon nanotubes and bundles of carbon nanotubes. *Carbon*, 39, 507-514.
- Peña Crecente, R. M., Gutiérrez Lovera, C., Barciela García, J., Álvarez Méndez, J., García Martín, S., y Herrero Latorre, C. (2014). Multiwalled carbon nanotubes as a sorbent material for the solid phase extraction of lead from urine and subsequent determination by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, 101, 15-20.
- Pyrzyska, K. (2007). Application of Carbon Sorbents for the Concentration and Separation of Metal Ions. *Analytical Sciences*, 23, 631-637.
- Pyrzyska, K. (2010). Carbon nanostructures for separation, preconcentration and speciation of metal ions. *Trends Anal. Chem.*, 29, 718-727.
- Ravelo-Pérez, L. M., Herrera-Herrera, A. V., Hernández-Borges, J., Rodríguez-Delgado, M. Á. (2010). Carbon nanotubes: Solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2618-2641.

- Ren, X., Chen, C., Nagatsu, M., y Wang, X. (2011). Carbon nanotubes as adsorbents in environmental pollution management: A review. *Chem. Eng. J.*, 170, 395–410.
- Sahmetlioglu, E., Yilmaz, E., Aktas, E., y Soylak, M. (2014). Polypyrrole/multi-walled carbon nanotube composite for the solid phase extraction of lead(II) in water samples. *Talanta*, 119, 447-451.
- Savio, M., Parodi, B., Martinez, L. D., Smichowski, P., y Gil, R. A. (2011). On-line solid phase extraction of Ni and Pb using carbon nanotubes and modified carbon nanotubes coupled to ETAAS. *Talanta*, 85, 245-251.
- Schiffrin, A., Riemann, A., Auwärter, W., Pennec, Y., Weber-Bargioni, A., Cvetko, D., Cossaro, A., Morgante, A., y Barth, J. V. (2007). Zwitterionic self-assembly of L-methionine nanogratings on the Ag(111) surface. *PNAS*, 104, 5279–5284.
- Sitko, R., Zawisza, B., y Malicka, E. (2012). Modification of carbon nanotubes for preconcentration, separation and determination of trace-metal ions. *Trends in Analytical Chemistry*, 37, 22-31.
- Somera, B. F., Corazza, M. Z., Yabe, M. J. S., Segatelli, M. G., Galunin, E., y Texeira-Tarley, C. R. (2012). 3-Mercaptopropyltrimethoxysilane-modified multi-walled carbon nanotubes as a new functional adsorbent for flow injection extraction of Pb(II) from water and sediment samples. *Water, Air, and Soil Pollution*, 223, 6069-6081.
- Souza, J. M. O., y Texeira-Tarley, C. R. (2009). Sorbent separation and enrichment method for cobalt ions determination by graphite furnace atomic absorption spectrometry in water and urine samples using multiwall carbon nanotubes. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 89, 489–502.
- Stair, J. L. y Holcombe, J. A. (2007). Metal binding characterization and conformational studies using Raman microscopy of resin-bound poly(aspartic acid). *Anal. Chem.*, 79, 1999–2006.
- Terada, K. (1991). Preconcentration of Trace Elements by Sorption. *Anal. Sci.*, 7,

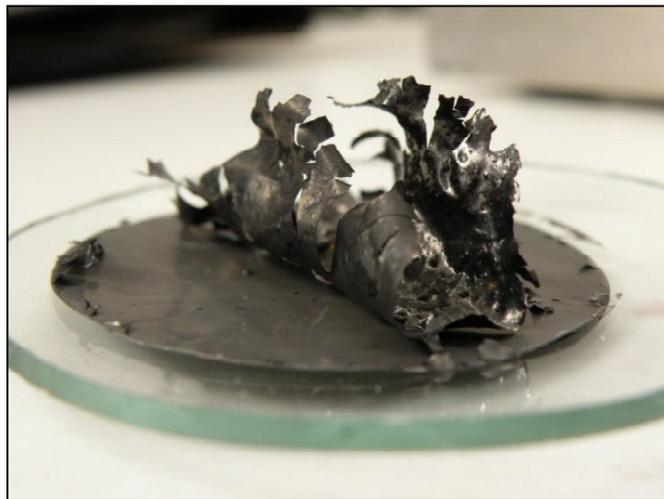
187-198.

- Teixeira-Tarley, C. R., Barbosa, A. F., Gava-Segatelli, M., Costa-Figueiredo, E., y Lucas, P. O. (2006). Highly improved sensitivity of TS-FF-AAS for Cd(II) determination at  $\text{ng l}^{-1}$  levels using a simple flow injection minicolumn preconcentration system with multiwall carbon nanotubes. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 21, 1305-1313.
- Tourani, S., Khorasheh, F., Rashidi, A.M., y Safekordi, A.A. 2015. Hydro-purification of crude terephthalic acid using palladium catalyst supported on multi-wall carbon nanotubes. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 28, 202-210.
- Tuzen, M., Saygi, K. O., Usta, C., y Soylak, M. (2008). Pseudomonas aeruginosa immobilized multiwalled carbon nanotubes as biosorbent for heavy metal ions. *Bioresource Technology*, 99, 1563–1570.
- Valcárcel, M., Simonet, B. M., Cárdenas, S., y Suárez, B. (2005). Present and future applications of carbon nanotubes to analytical science. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382, 1783-1790.
- Valcárcel, M., Cárdenas, S., y Simonet, B. M. (2007). Role of Carbon Nanotubes in Analytical Science. *Anal. Chem.*, 79, 4788–4797.
- Wanekaya, A. K. (2011). Applications of nanoscale carbon-based materials in heavy metal sensing and detection. *Analyst*, 136, 4383-4391.
- Wang, M., Jakubka, F., Gannott, F., Schweiger, M., y Zaumseil, J. (2014). Generalized enhancement of charge injection in bottomcontact/top gate polymer field-effect transistors with single-walled carbon nanotubes. *Organic Electronics*, 15, 809-817.
- Wang, S. (2009). Optimum degree of functionalization for carbon nanotubes. *Current Applied Physics*, 9, 1146–1150.
- Wang, Y., Iqbal, Z., y Malhotra, S. V. (2005). Functionalization of carbon nanotubes with amines and enzymes. *Chemical Physics Letters*, 402, 96-101.

- Wepasnick, K. A., Smith, B. A., Bitter, J. L., y Fairbrother, D. H. (2010). Chemical and structural characterization of carbon nanotube surfaces. *Anal. Bioanal. Chem.*, 396, 1003-1014.
- White, B. R., y Holcombe, J. A. (2007). Fluorescent peptide sensor for the selective detection of  $\text{Cu}^{2+}$ . *Talanta*, 71, 2015–2020.
- Wildgoose, G. G., Leventis, H. C., Davies, I. J., Crossley, A., Lawrence, N. S., Jiang, L., Jones, T. G. J., y Compton, R. G. (2005). Graphite powder derivatised with poly-L-cysteine using “building-block” chemistry—a novel material for the extraction of heavy metal ions. *J. Mater. Chem.*, 15, 2375–2382.
- Wu, Z., Sun, W., Feng, T., Tang, S. W., Li, G., Jiang, K., Xu, S., y Ong, C. K. (2015). Imaging of soft material with carbon nanotube tip using near-field scanning microwave microscopy. *Ultramicroscopy*, 148, 75-80.
- Xiaojing, L., Liu, S., Wang, S., Guo, Y., y Jiang, S. (2014). Carbon-based sorbents: Carbon nanotubes. *Journal of Chromatography A*, 1357, 53–67.
- Yang, J., Wang, Q., Zhang, M., Zhang, S., y Zhang, L. (2015). An electrochemical fungicide pyrimethanil sensor based on carbonnanotubes/ionic-liquid construction modified electrode. *Food Chemistry*, 187, 1-6.
- Yang, K., y Xinga, B. (2007). Desorption of polycyclic aromatic hydrocarbons from carbon nanomaterials in water. *Environmental Pollution*, 145, 529–537.
- Ying, L. S., Salleh, M. A. M., Yusoff, H. M., Rashid, S. B. A., Razak, J. A. (2011). Continuous production of carbon nanotubes– a review. *J. Ind. Eng. Chem*, 17, 367–376.

# Capítulo 3

## Obtención y Caracterización de Nanotubos de Carbono modificados



En este capítulo se describen las metodologías utilizadas para la obtención de los nanotubos de carbono modificados. Se explica cómo se obtuvieron y que técnicas se utilizaron para caracterizarlos. Asimismo, se presentan los resultados de su caracterización.

### Abreviaturas

<i>BET</i>	Brunauer-Emmett-Teller
<i>DDW</i>	Double distilled water (Agua destilada y desionizada)
<i>DMF</i>	Dimetilformamida
<i>DDA</i>	Dodecylamine (Dodecilamina)
<i>EDS</i>	Energy dispersive spectroscopy (Espectroscopía dispersiva en energías)
<i>FEG</i>	Field Emission Gun (Cañón de emisión de campo)
<i>FEG SEM</i>	Field Emission Gun Scanning Electron Microscope (Microscopio electrónico de barrido con cañón de emisión de campo)
<i>FTIR-DRS</i>	Fourier Transform Infrared Spectroscopy–Diffuse Reflectance Spectroscopy (Espectrofotometría Infrarroja por Transformadas de Fourier-Espectroscopia de Reflectancia Difusa)
<i>ICP OES</i>	Inductively coupled plasma atomic optical spectrometry (Espectrometría de Emisión Óptica con fuente de Plasma Acoplado Inductivamente)
<i>MWCNTs</i>	Multi-walled carbón nanotubes (Nanotubos de carbono de pared múltiple)
<i>MWCNT-COOH</i>	Nanotubos de carbono de pared múltiple oxidados
<i>MWCNT-pro</i>	Nanotubos de carbono de pared múltiple funcionalizados con L-prolina
<i>PDVF</i>	Polyvinylidene fluoride (Fluoruro de polivinilideno)
<i>SEM</i>	Scanning electron microscopy (Microscopia electrónica de barrido)
<i>SOCl<sub>2</sub></i>	Cloruro de tionilo
<i>SPE</i>	Solid phase extraction (Separación en fase sólida)

<i>TEM</i>	Transmission electron microscopy (Microscopía electrónica de transmisión)
<i>TPD</i>	Temperature-programmed desorption (Desorción a temperatura programada)
<i>XRD</i>	X-ray diffraction (Difracción de Rx)

## 1. Introducción

En este capítulo se presenta el trabajo realizado para la obtención de los sustratos que se utilizarán luego en los sistemas de separación en fase sólida (SPE).

Se desarrollan las siguientes temáticas:

- breve descripción de las técnicas de caracterización utilizadas,
- materiales y reactivos empleados en los distintos procesos,
- caracterización de la materia prima (MWCNTs),
- metodologías utilizadas para la oxidación de los MWCNTs,
- caracterización de los MWCNTs oxidados,
- metodología de funcionalización con aminoácidos,
- caracterización de los MWCNTs funcionalizados con aminoácidos.

## 2. Técnicas de caracterización

La morfología de los MWCNTs sin modificar, oxidados y funcionalizados con aminoácidos se caracterizó empleando microscopía electrónica, de barrido (SEM) y de transmisión (TEM). Para la observación por SEM se utilizó un microscopio que emplea como fuente de electrones un cañón de emisión de campo (FEG) que proporciona haces de electrones muy focalizados, lo que permite mejorar la resolución espacial, minimizar cargas sobre el espécimen a observar, causando además menos daño en muestras sensibles. El equipo empleado fue un Zeiss Supra 40, funcionando a 5 kV. En el caso de la caracterización por TEM se utilizó un microscopio electrónico de transmisión Philips CM 200. Las muestras analizadas por TEM se prepararon vía suspensión húmeda, colocando la muestra en un vial y añadiendo isopropanol. Para lograr una mejor dispersión se colocó en ultrasonido. Luego con una pipeta Pasteur se tomó una gota y se depositó sobre una rejilla de cobre previamente cubierta

con una película de carbón. Las imágenes se registraron con un voltaje de aceleración de 200 kV.

Los microscopios utilizados, SEM y TEM, cuentan con un detector de Rx para poder realizar análisis por espectroscopía dispersiva en energías (EDS). Ambos microscopios utilizan un haz de electrones que interactúa con los átomos de la muestra provocando los fenómenos de interacción de la radiación con la materia. En particular, los electrones secundarios expulsados son los que se utilizan para formar la imagen de la morfología de la muestra. Esta expulsión conduce a la ionización de los átomos y para restablecer el equilibrio un electrón de un orbital más externo va a ocupar el lugar del electrón expulsado. Este movimiento electrónico deja al átomo original con un excedente de energía. Una de las formas de recuperar el equilibrio es emitiendo un fotón de rayos X. Estos fotones poseen una energía que se encuentra directamente relacionada con el peso atómico del elemento que los emite, con lo cual es posible asociar cada valor de energía emitida con un elemento de la tabla periódica, y además, por el número de fotones emitidos de cada energía, la cantidad relativa de cada elemento. Estos análisis permiten obtener información química elemental de forma semicuantitativa. Estas técnicas permiten detectar la presencia de partículas provenientes de los catalizadores del proceso de síntesis de los MWCNTs y otros elementos derivados de los procesos de oxidación y de funcionalización con aminoácidos.

El grado de incorporación de grupos funcionales fue calculado por análisis termogravimétrico y por la formación del zwitterion con la DDA [Marshall, M. W. y col. 2006]. Los estudios térmicos se realizaron empleando un equipo de Termogravimetría marca Shimadzu DTG-50. Las muestras se analizaron en un rango de temperaturas entre 25 a 1000 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C min<sup>-1</sup>, bajo flujo continuo de aire. La técnica de formación del zwitterion empleada para conocer la cantidad de grupos carboxílicos presentes en los nanotubos surge como una alternativa frente a los

procedimientos ácido-base que resultan muy complicados por las dificultades de manipulación de las muestras a escala nanométrica (filtración, titulación indirecta) [Samorì, C. y col. 2010].

Los espectros Raman se adquirieron en un espectrómetro comercial LabRAMHR-UV-Vis-NIR (HoribaJobinYvon) de resolución espectral de  $2,5 \text{ cm}^{-1}$ . Se utilizó la línea 514 nm de un láser de argón como fuente excitadora y la potencia del láser sobre la muestra se utilizó con potencia mínima, del orden de 0,05 mW de modo de evitar el calentamiento del punto a observar. El microscopio acoplado al espectrómetro se utilizó con el objetivo de 50x lo que permite concentrar el haz en la región de estudio. El análisis por difracción de rayos X se realizó a temperatura ambiente empleando un difractómetro PANalytical, Modelo Empyrean con detector PIXcel 3D, se utilizó un paso de 0,0263 en  $2\theta$  y se obtuvo registro en el rango de  $13^\circ < 2\theta < 65^\circ$ , zona suficiente para la tarea de identificación y caracterización de la muestra. Las muestras en polvo se colocaron en un capilar de vidrio y los diagramas se obtuvieron en el modo transmisión. Para la identificación de fases presentes se empleó un programa denominado PC-Identify y la base de datos de la ICDD.

La adsorción física de gases y vapores en sólidos es una técnica utilizada para el estudio de la textura porosa de sólidos de todo tipo pudiéndose determinar la superficie específica, el volumen de poros y la distribución de tamaño de poros. Para la determinación de estos parámetros se suelen utilizar gases como  $\text{N}_2$ ,  $\text{CO}_2$  e hidrocarburos, a temperatura constante, obteniéndose así la isoterma de adsorción [Garrido J, y col. 1987]. La caracterización textural de los MWCNTs comerciales se realizó mediante la adsorción de  $\text{N}_2$  a  $-196^\circ\text{C}$ . Las isotermas se obtuvieron en un aparato automático de adsorción, Micromeritics ASAP 2020. Antes del análisis la muestra se desgasificó a  $220^\circ\text{C}$  con una velocidad de calentamiento de  $10^\circ\text{C min}^{-1}$  durante 480 min. El área específica se calculó por el método BET [Brunauer, S. y col. 1938].

Se empleó espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) para obtener información estructural y de grupos funcionales. Se utilizó un equipo NICOLET Magna en la modalidad de reflectancia difusa (DRS) que permite analizar materiales no reflectivos, incluyendo los muy opacos o poco absorbentes, asimismo permite analizar superficies irregulares y muestras en polvo. Esta espectroscopía se basa en los fenómenos que tienen lugar cuando se refleja radiación infrarroja sobre una superficie irregular. La radiación incidente es reflejada, absorbida, dispersada y transmitida por la superficie de la muestra. La luz reflejada en forma difusa es colectada por la óptica accesoria y dirigida hacia el detector del espectrofotómetro para obtener un espectro. Se utilizó el método de la pastilla de KBr para la medición de las muestras, utilizando una relación de 1 mg de nanotubos y 199 mg de KBr. Los espectros se obtuvieron colectando 90 scans con una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$  entre  $400$  y  $4000\text{ cm}^{-1}$ .

### 3. Materiales y reactivos utilizados

En la Tabla 1 se describen los materiales y reactivos utilizados.

Material/Reactivo	Procedencia	Características
Agua destilada y desionizada (DDW)	Barnstead	Obtenida por sistema mixto de intercambio iónico
DDA	Alfa Aesar	Pureza $\geq 98,8\%$
DMF	Baker	Pureza $\geq 99,95\%$
HNO <sub>3</sub>	Baker	Para análisis 69-70%
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Merck	Para análisis 95-97%
Isopropanol	Biopack	Para Análisis ACS $\geq 99,5\%$
KBr	Merck	Para Espectroscopia IR
PVDF	Millipore	0,22 $\mu\text{m}$ de poro
MWCNTs	Sun Nano	Diámetro: 10-30 nm Largo: 1-10 $\mu\text{m}$ / Pureza: $> 90\%$ Carbón amorfo: $< 5\%$ / Fe: 1,3%
SOCl <sub>2</sub>	Merck	Grado ACS

Tabla 1. Materiales y reactivos.

#### 4. Caracterización de los MWCNTs comerciales

El certificado de los MWCNTs comerciales brinda información sobre las dimensiones (largo y diámetro) y grado de impurezas de los nanotubos. Para verificar esta información y poder compararla con la que se genere luego de la realización de las modificaciones se caracterizó la materia prima.

En la Figura 1 se presentan imágenes SEM a distinta magnificación que permiten observar la morfología de los MWCNTs comerciales.

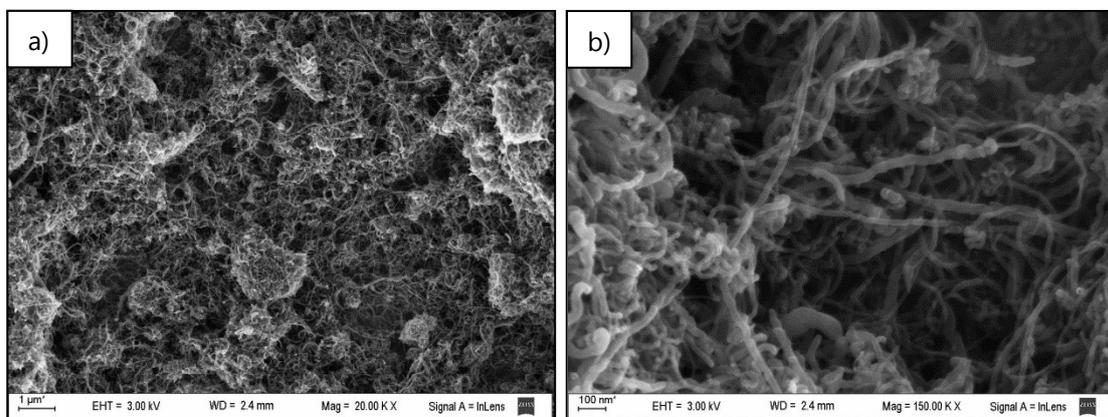
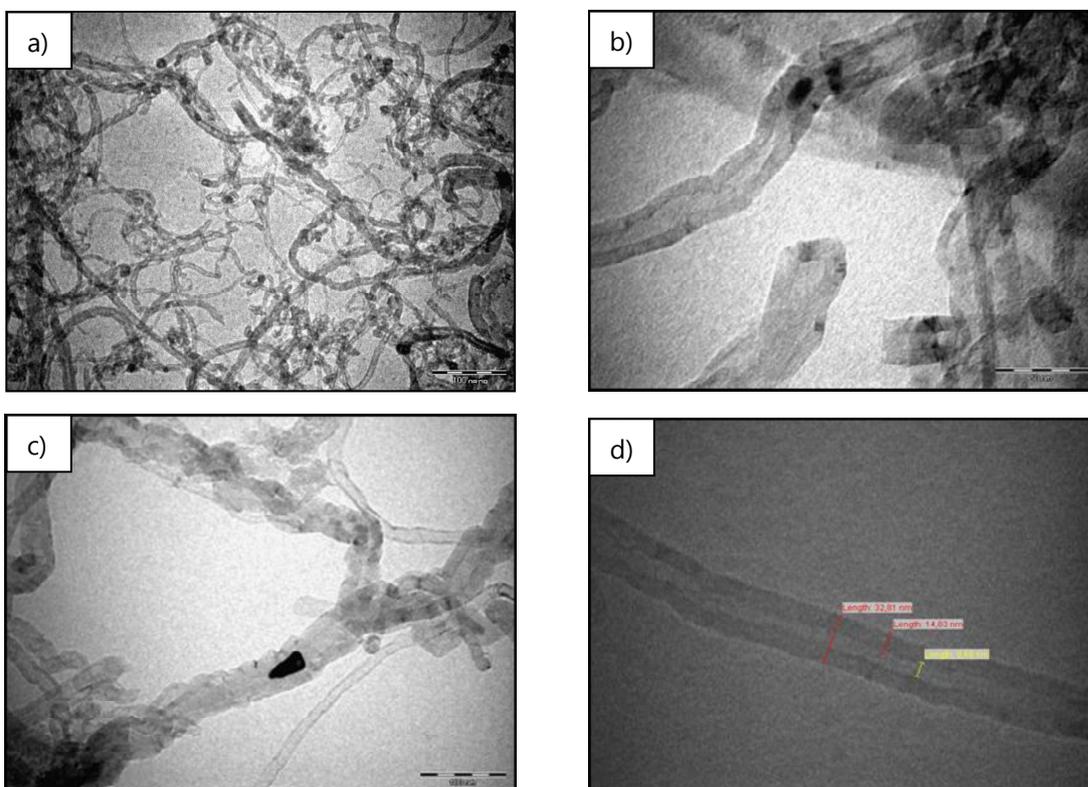


Figura 1. Imágenes SEM de los MWCNTs comerciales.

Las imágenes nos permiten observar una alta densidad de nanotubos no siendo posible identificar ningún subproducto de síntesis. Las paredes se observan limpias, sin depósitos sobre las mismas, los cuales se observan en MWCNTs de poca calidad, donde es alta la concentración de carbono amorfo. Tampoco se detectan partículas brillantes que pudiesen atribuirse a una gran concentración de nanopartículas metálicas utilizadas como catalizador. Se observan estructuras bastante homogéneas en relación a sus diámetros y largos. También pueden apreciarse algunas aglomeraciones de MWCNTs. Los nanotubos se encuentran distribuidos en forma aleatoria debido a las interacciones hidrofóbicas entre sus superficies que provocan la repulsión entre los tubos. Este fenómeno es también apreciable a nivel macroscópico

dificultando su manipulación. Se observa la estructura característica de plato de espaguetis reportada por numerosos autores [Thostenson, E. T. y col. 2001].

En la Figura 2 se observan las imágenes obtenidas por TEM. En ellas pueden verse las estructuras de los nanotubos con mayor magnificación siendo posible identificar extremos cerrados y la presencia de nanopartículas metálicas provenientes del proceso de síntesis. Las nanopartículas observadas se encuentran en el interior de los nanotubos y tienen un tamaño de entre 20 y 40 nm aproximadamente. Al igual que en las imágenes SEM las superficies de los nanotubos se presentan lisas y limpias, sin embargo, a este nivel de magnificación es posible observar los defectos en las paredes debido a los daños provocados en los procesos de síntesis. En la Figura 2.d) se realizó la medición de un nanotubo aislado para verificar su diámetro. Si bien el certificado de origen indica que los diámetros se encuentran en el rango de los 10-30 nm se encontraron nanotubos de hasta 100 nm de diámetro exterior (Figura 2.e)).



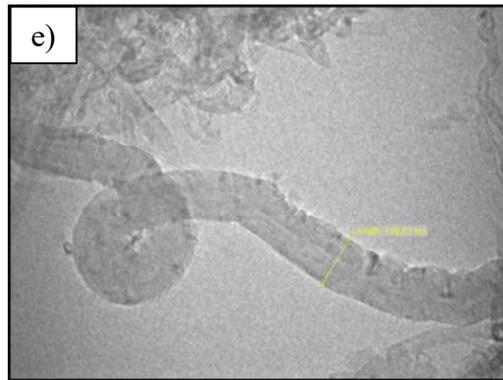


Figura 2. Imágenes TEM de a) MWCNTs comerciales, b) extremo cerrado y nanopartícula metálica en el interior de un nanotubo, c) nanopartícula metálica en el interior de un nanotubo, d) y e) mediciones sobre nanotubos.

Se realizaron análisis por EDS para determinar los elementos químicos presentes en los MWCNTs, detectándose la presencia de Fe como único elemento además del C y oxígeno debido seguramente a algunas partículas presentes como óxido del metal o impurezas, verificándose la información suministrada por el fabricante. En la Figura 3 se observa el espectro obtenido por el detector acoplado al FEGSEM, la presencia de Al se debe al portamuestra utilizado como soporte. El espectro obtenido al realizar el análisis por TEM es similar, pudiéndose verificar que el Fe se encuentra localizado sobre las nanopartículas halladas en el interior de algunos nanotubos, Figura 2 c).

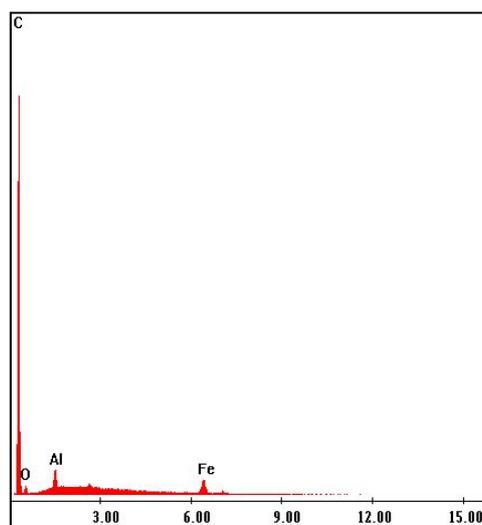


Figura 3. Espectro EDS de los MWCNTs comerciales.

A partir de los análisis termogravimétricos se puede conocer la estabilidad frente a la temperatura, oxidación térmica y el contenido de cenizas (Figura 4). Se determinó la presencia de ~11% de residuo, correspondiéndose con el contenido de impurezas inorgánicas de Fe detectado por EDS. Este valor fue calculado a partir del peso del residuo obtenido después de la oxidación completa. El contenido de impurezas carbonosas está reportado en la bibliografía como la pérdida de masa por debajo de los 500 °C [Zou, Y. y col. 2004]. No se encontró pérdida de masa por debajo de esta temperatura, por lo tanto no se evidenció la presencia de contenido carbonoso. La descomposición de los MWCNTs comerciales comenzó ~500 °C y aumentó rápidamente hasta los ~700 °C.

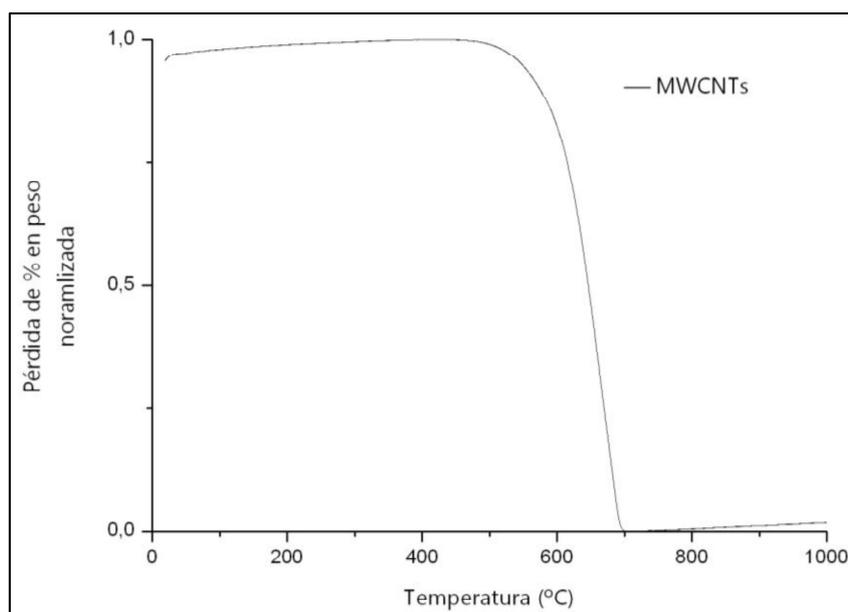


Figura 4. Termograma de los MWCNTs comerciales.

La caracterización de los MWCNTs mediante espectroscopia Raman se muestra en la Figura 5, reportándose los espectros de primer orden entre 1100 a 1800  $\text{cm}^{-1}$ . Esta técnica es una herramienta muy importante para la caracterización de los MWCNTs. No requiere preparación de la muestra, es relativamente rápida y no destructiva. En el caso de los nanotubos tuvo que

ajustarse la potencia del láser para evitar producir daños en las muestras. Es una técnica útil para detectar el grado de desorden luego de los procesos de funcionalización. Las bandas más características de los nanotubos de carbono se encuentran en la región de altas frecuencias y son una banda intensa sobre  $1600\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a la vibración fundamental (primer orden) de elongación tangencial denominada G, que se relaciona con la energía de los enlaces  $sp^2$  y se asigna a las estructuras gráficas normales y una intensa banda en la zona de  $1300\text{ cm}^{-1}$ , denominada D ("Disorder induced"). Esta banda D es indicadora de la presencia de defectos en las paredes [Eklund, P. C. y col. 1995] de manera que de la relación de intensidades entre las bandas D y G puede extraerse información sobre el número de defectos. Por lo tanto, la relación de área entre las bandas D y G ( $A_D/A_G$ ) puede utilizarse para cuantificar el proceso de oxidación [Rosca, I. D. y col. 2005]. Para los MWCNTs comerciales se obtuvo una relación  $A_D/A_G$  de 0,92. Este valor se compara en los siguientes párrafos con los valores obtenidos para los nanotubos oxidados y funcionalizados ya que un incremento en este valor corresponde a una mayor proporción de carbono  $sp^3$ , la cual es atribuida a la presencia de mayores defectos en la estructura [Flahaut, E. y col. 2005]. La banda D es ligeramente menor que la banda G siendo ésta la relación reportada para MWCNTs comerciales [Shi, J. y col. 2009].

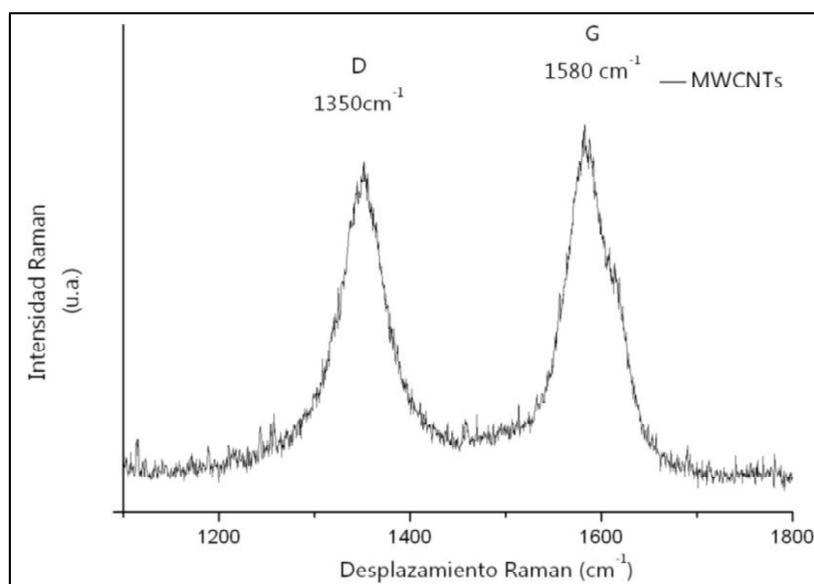


Figura 5. Espectro Raman de MWCNTs comerciales.

Se utilizó FTIR-DRS para investigar la estructura de la superficie de los MWCNTs y tratar así de identificar los grupos funcionales sobre los mismos. En la Figura 6 se presentan los espectros obtenidos de los MWCNTs: comerciales, oxidados y funcionalizados con L-prolina. Si bien el espectro obtenido para los MWCNTs es comparable con el reportado en bibliografía [Ávila-Orta, C. A. y col. 2009] no fue posible identificar los grupos funcionales introducidos por la oxidación ni por la funcionalización. La región por debajo de los  $1400\text{ cm}^{-1}$  es la denominada huella digital y es muy difícil utilizarla para identificar grupos debido a su complejidad. Los MWCNTs presentan alta simetría lo que produce señales débiles en el infrarrojo debido a la poca diferencia en los estados de carga entre los átomos de carbono. Esta escasa diferencia entre los estados de carga genera dipolos inducidos muy débiles que producen un espectro silencioso. Es por ello que no se detecta la banda a  $1600\text{ cm}^{-1}$  debida a los enlaces C=C. La amplia banda observada en  $\sim 3400\text{ cm}^{-1}$  puede deberse a la presencia de grupos OH provenientes del agua que se encuentra como contaminación en la superficie de los nanotubos [Colthup, N. y col. 1990]. La banda observada a  $1445\text{ cm}^{-1}$  está reportada como característica de los MWCNTs [Misra, A. y col. 2007]. Si bien la región huella digital es muy difícil de asignar, la banda en  $\sim 650\text{ cm}^{-1}$  se encuentra presente en espectros reportados en la bibliografía para nanotubos pero sin asignación a un grupo específico [Misra, A. y col. 2007].

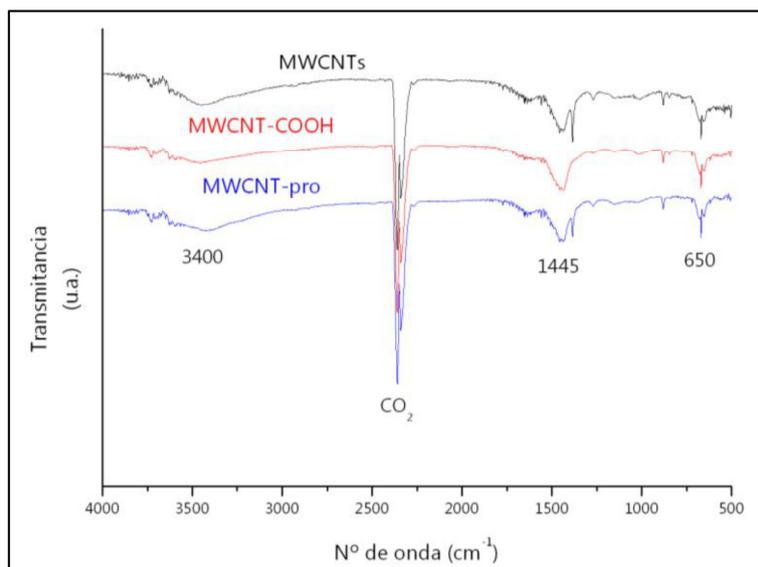


Figura 6. FTIR de MWCNTs: comerciales, oxidados y funcionalizados con L-prolina.

Del estudio de adsorción de  $N_2$  se obtuvo un área superficial BET de  $169 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , valor en concordancia con los reportados para MWCNTs comerciales [Zhang, H. y col. 2002].

Mediante los difractogramas obtenidos por XRD es posible obtener información sobre el espaciado interplanar, las tensiones estructurales y las impurezas. La naturaleza estructural de los nanotubos hace que los patrones de difracción sean muy similares al patrón del grafito, identificándose el pico (002) típico de una estructura gráfica, sin embargo el valor de  $d_{002}$  es de  $0,343 \text{ nm}$ , un 2% mayor que el reportado para un grafito perfecto ( $0,335 \text{ nm}$ ), esto es habitual para MWCNTs y se encuentra reportado en la bibliografía [Salernitano, E. y col. 2007]. En el difractograma de la Figura 7 se ven los picos típicos de los MWCNTs y no se observan picos de Fe de residuos del catalizador de síntesis.

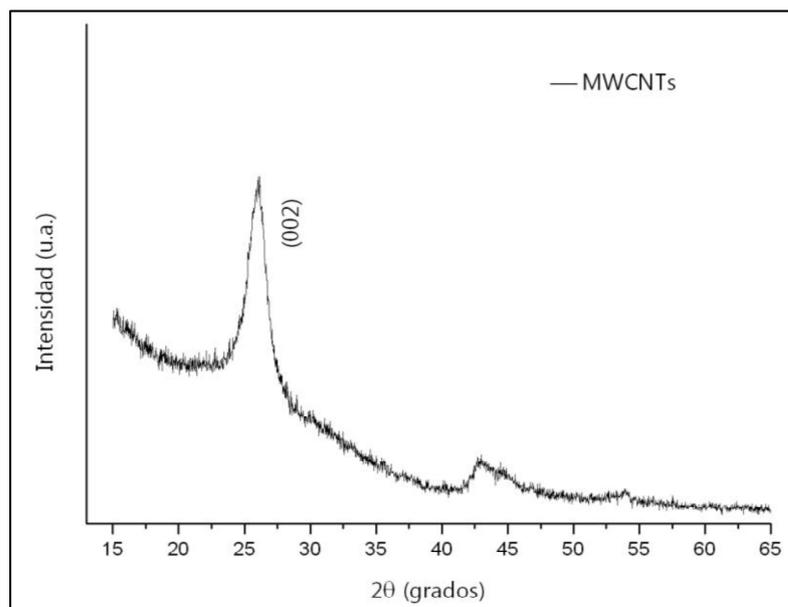


Figura 7. XRD de los MWCNTs.

## 5. Metodología utilizada para la oxidación de los MWCNTs

En la Figura 8 se presenta el esquema con la metodología de oxidación utilizada.



Figura 8. Esquema de oxidación de los MWCNTs comerciales.

Se oxidaron 500 mg de MWCNTs comerciales colocándolos en un baño ultrasónico con 20 ml de una mezcla de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y HNO<sub>3</sub> concentrados en una relación 3:1 v/v durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se colocaron en una plancha calefactora en baño de agua y con agitación magnética durante 4 horas a 55 °C. Finalizado el proceso de oxidación se agregó cuidadosamente agua desionizada (DDW) y las muestras se sometieron a un proceso de limpieza. Alícuotas de la solución oxidante con los nanotubos

se colocaron en bolsas de diálisis que se cerraron y sumergieron en DDW. Se realizó el recambio de agua hasta que no se observó variación en el valor de pH. Para finalizar, se retiró la suspensión del interior de las bolsas y se secó en estufa a 50 °C hasta obtener el material sólido. Para homogeneizar el tamaño de partícula, el sólido obtenido fue molido en un mortero de ágata. Los MWCNT-COOH se conservaron en desecador.

Durante esta etapa se probaron diferentes alternativas hasta obtener la metodología que se describió anteriormente. Dentro de las alternativas consideradas, dos estrategias utilizadas merecen su comentario ya que su análisis permitió desarrollar la metodología definitiva.

A) Oxidación con una mezcla de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y  $\text{HNO}_3$  concentrados en una relación 1:3 v/v. Las muestras obtenidas de esta forma se compararon con las muestras oxidadas con una mezcla de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y  $\text{HNO}_3$  concentrados en una relación 3:1 v/v. En esta instancia del desarrollo del proceso de oxidación, la neutralización y limpieza de las muestras consistió en una etapa de centrifugación, seguida del retiro del sobrenadante y agregado de agua para remover el exceso de ácido. Estas etapas se realizaron en forma sucesiva varias veces. Luego se filtró la solución con membrana de PDVF de 0,22  $\mu\text{m}$  por vacío obteniéndose así las muestras sólidas. Para realizar un estudio comparativo se colocó una porción de cada una de las muestras en contacto con DDW y se analizó el contenido de Fe en el sobrenadante por ICP OES. Se obtuvo una concentración de 460  $\mu\text{g l}^{-1}$  de Fe en el extraído de los nanotubos oxidados relación  $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{HNO}_3$  3:1 y 100  $\mu\text{g l}^{-1}$  de Fe en el extraído de los nanotubos oxidados relación 1:3. La mayor concentración de Fe presente en el extraído de los MWCNT-COOH con la relación de ácidos 3:1 se debe a su mayor eficiencia para remover las nanopartículas de Fe, sin embargo el proceso de limpieza fue insuficiente para lograr la completa remoción del Fe liberado en la oxidación. En cambio, en los MWCNT-COOH con la mezcla de ácidos en la relación 1:3 solo fue posible remover el Fe que se encontraba entre los manojos de nanotubos

pero no fue posible abrir los extremos y conseguir la remoción del Fe del interior.

Se estudió el comportamiento térmico y el termograma obtenido de los MWCNT-COOH con la relación de ácidos 1:3 v/v resultando similar al de los MWCNTs comerciales, es decir, no se evidenció la incorporación de grupos funcionales (Figura 9).

La mayor eficiencia en la remoción del Fe de los nanotubos estuvo acompañada de una deficiente limpieza de los mismos, ya que si bien el Fe se solubilizó no fue capaz de removerse mediante la limpieza por centrifugación/extracción. La falta de remoción del Fe luego de haber sido extraído del interior de los nanotubos se mejoró implementando membranas de diálisis. Se utilizaron membranas de celulosa con un tamaño de poro promedio de 48 Å permitiendo el pasaje de agua y compuestos de bajo peso molecular en solución mientras que se retienen materiales con un peso molecular mayor a 12 kDa. Estudios reportados en la literatura destacan la importancia de utilizar procesos de purificación por diálisis para eliminar completamente los posibles reactivos sin reaccionar y/o los productos secundarios que pudiesen quedar atrapados en los nanotubos [Georgakilas, V. y col. 2002].

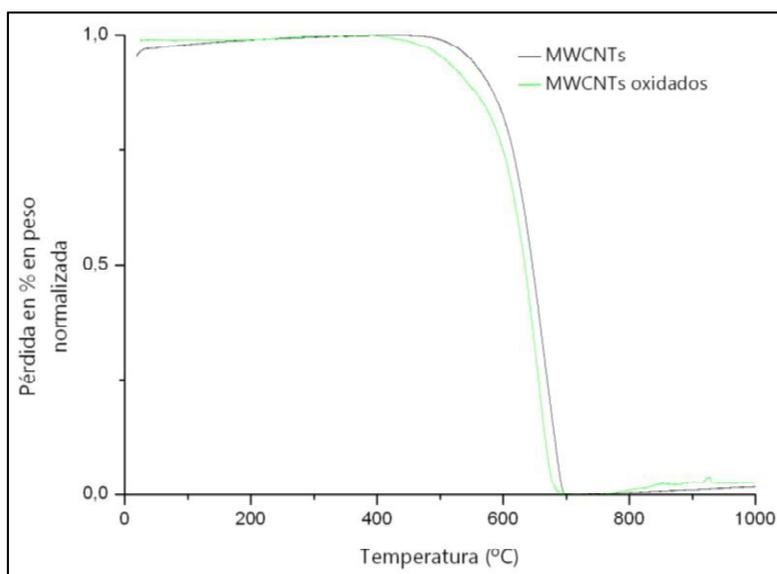


Figura 9. Termogramas de los MWCNTs comerciales y de los MWCNT-oxidados con la relación oxidante 1:3.

B) Como se mencionó en A se probaron distintas metodologías para la neutralización y limpieza de los nanotubos oxidados. Durante el proceso de filtración por membrana utilizando una bomba de vacío de anillo de agua para evitar el deterioro de la misma por los vapores ácidos se obtuvieron films que se desprendieron de la membrana filtrante. A este tipo de producto en la bibliografía se lo denomina buckypaper y se corresponde con una delgada lámina compuesta por el agregado de nanotubos oxidados (Figura 10) [Belloni, F. y col. 2009]. Al evitar el proceso de filtración en la metodología de limpieza adoptada no se volvió a obtener este producto, sin embargo se menciona por sus posibles aplicaciones como membrana filtrante en futuros trabajos.

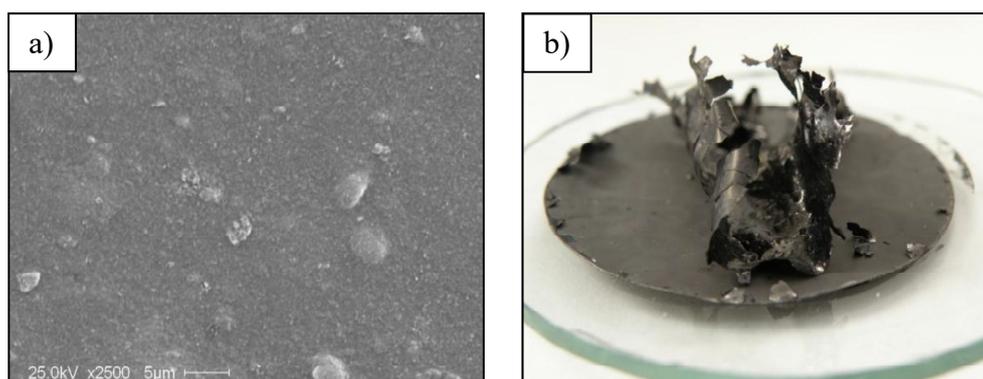


Figura 10. a) Imagen SEM a baja magnificación de la superficie de los MWCNT-COOH buckypaper, b) imagen macroscópica.

## 6. Caracterización de los MWCNT-COOH

Luego del proceso de oxidación los MWCNT-COOH se estudiaron para determinar cómo se afectó su estructura.

En la Figura 11 se muestran imágenes SEM de los MWCNT-COOH donde puede observarse su similitud con las imágenes de los MWCNTs comerciales. Las superficies de los nanotubos se aprecian lisas y limpias y tal como se observa en las micrografías, a pesar del fuerte tratamiento de oxidación al que

fueron sometidos, los MWCNT-COOH conservan su estructura sin modificaciones apreciables. Si comparamos las imágenes a menor magnificación (20000x) observamos una estructura más compacta en los MWCNT-COOH, ello puede deberse a las fuertes interacciones electrostáticas (versus las interacciones de van der Waals) originadas por la incorporación de grupos oxigenados.

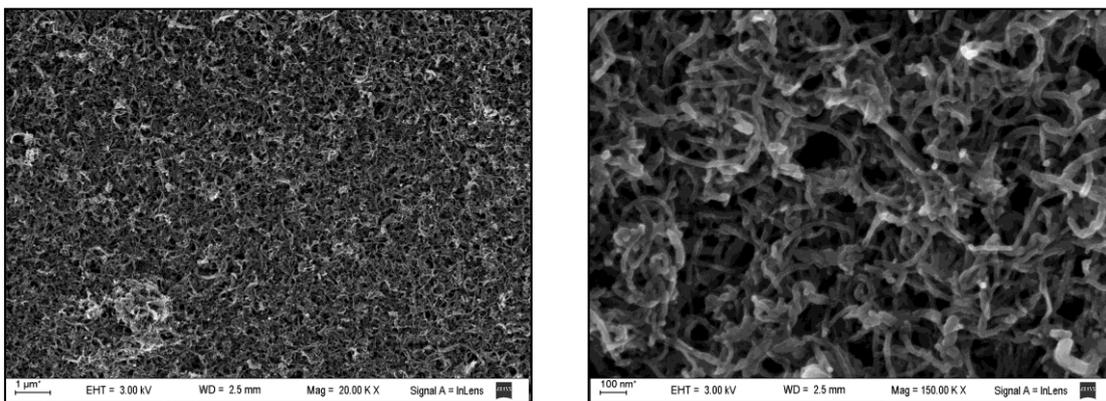


Figura 11. Imágenes SEM de los MWCNT-COOH.

En la Figura 12 se muestran imágenes TEM de los MWCNT-COOH y al igual que en el caso de la microscopia electrónica de barrido puede observarse que las imágenes son similares a las de los MWCNTs comerciales, sin presentar una alteración significativa en su estructura. Sin embargo, si bien se conserva la estructura tubular es posible apreciar los defectos en las paredes de los nanotubos. En el caso de los extremos, se consiguió que algunos se abrieran aunque otros continúan cerrados y si bien se logró extraer el Fe en forma mayoritaria se pueden observar aún algunas nanopartículas atrapadas en el interior de los nanotubos.

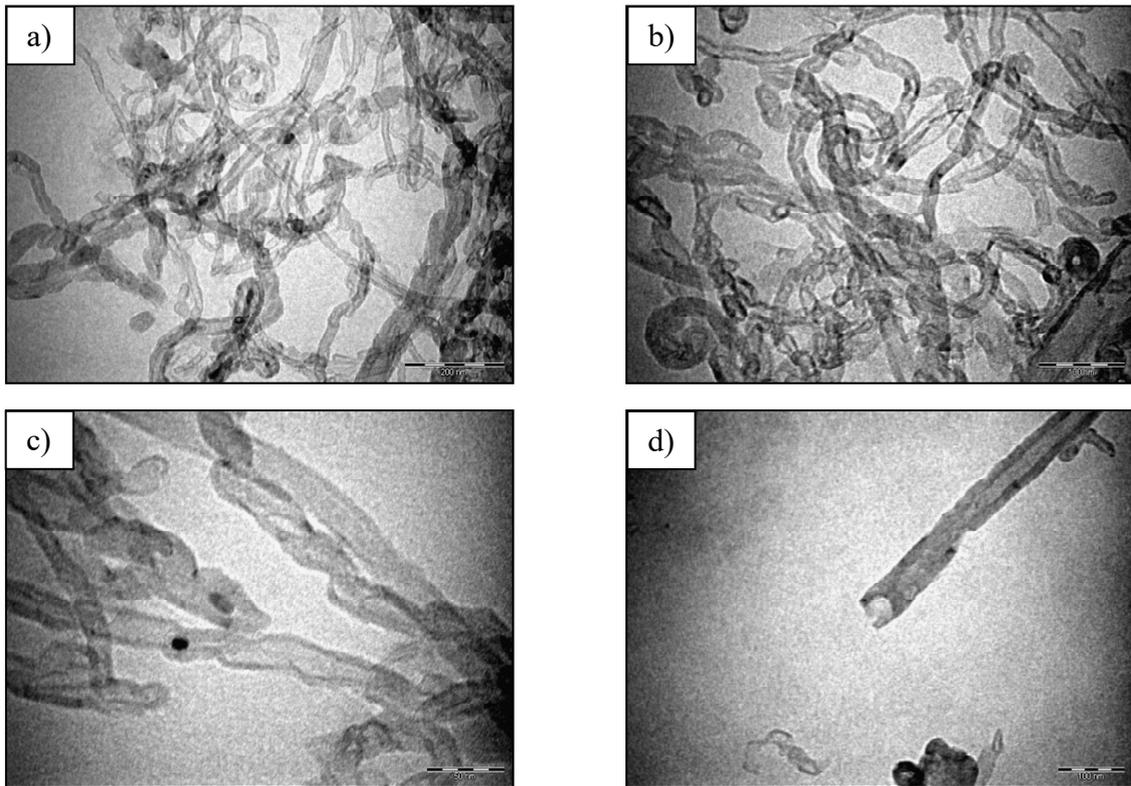


Figura 12. a y b) Imágenes TEM, c) nanotubos con extremo cerrado y nanopartículas atrapadas, d) nanotubo con extremo abierto.

El análisis del espectro de EDS permite verificar que no se logró remover la totalidad de las nanopartículas de Fe. Asimismo, es posible identificar la presencia de S sobre la superficie del nanotubo. Este hecho ya fue observado en muestras de nanotubos oxidados por mezcla sulfonítrica [Yu, R. y col. 1998] y fue atribuido a la formación de grupos sulfato (Figura 13). El Ca seguramente provenga de los sucesivos lavados a los que son sometidos los nanotubos y quede ligado a los grupos sulfatos.

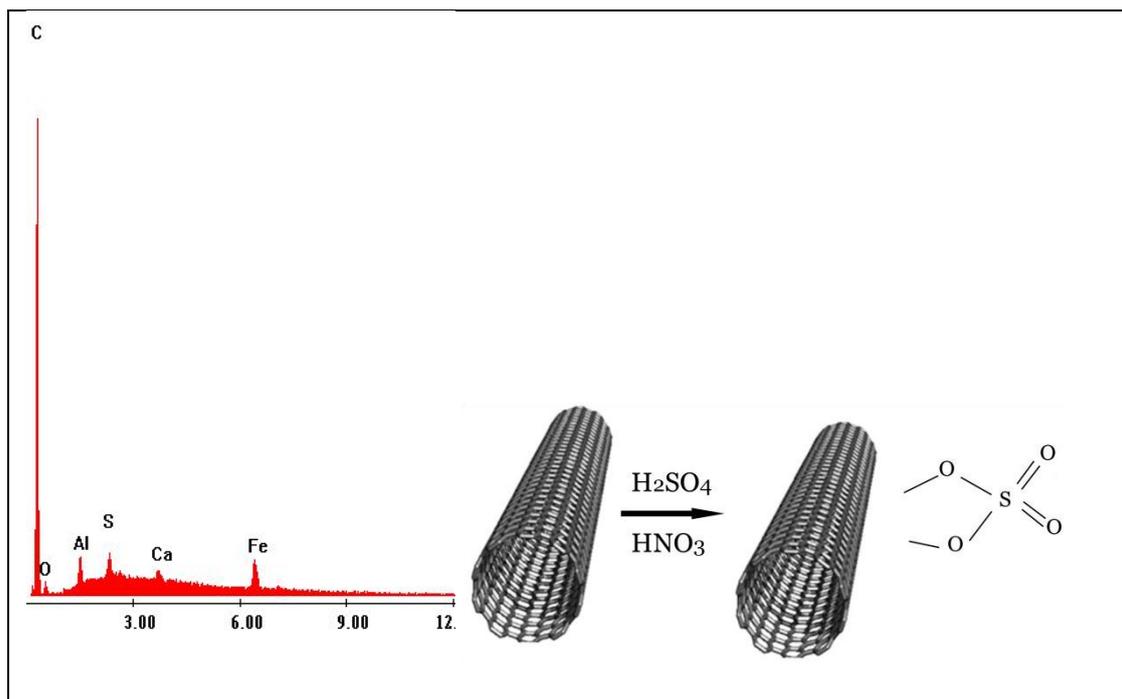


Figura 13. EDS y representación de los grupos sulfato sobre la pared del nanotubo.

Los análisis termogravimétricos de los MWCNT-COOH muestran que el proceso de descomposición comienza a una temperatura inferior que la observada para los MWCNTs comerciales (Figura 14). La descomposición a menor temperatura ha sido reportada debido a la liberación de  $\text{CO}_2$  proveniente de la incorporación de grupos funcionales carboxílicos [Xia, W. y col. 2007]. El proceso de oxidación provocó la modificación de los MWCNTs en los cuales se encontró que la pérdida en peso observada por debajo de los  $500\text{ }^\circ\text{C}$  es  $\sim 30\%$ . La masa remanente se estimó en  $\sim 4\%$ , observándose una disminución de las nanopartículas de Fe. A partir de los análisis de pérdida de masa se calculó el contenido de grupos carboxílicos en los nanotubos oxidados. Se obtuvo un resultado de  $\sim 7\text{ mmol}$  de COOH por gramo de MWCNT-COOH. El termograma obtenido es comparable con el que han obtenido otros autores [Samorì, C. y col. 2010]. La cuantificación de los grupos carboxílicos se realizó para identificar la cantidad de sitios donde los aminoácidos podrían unirse.

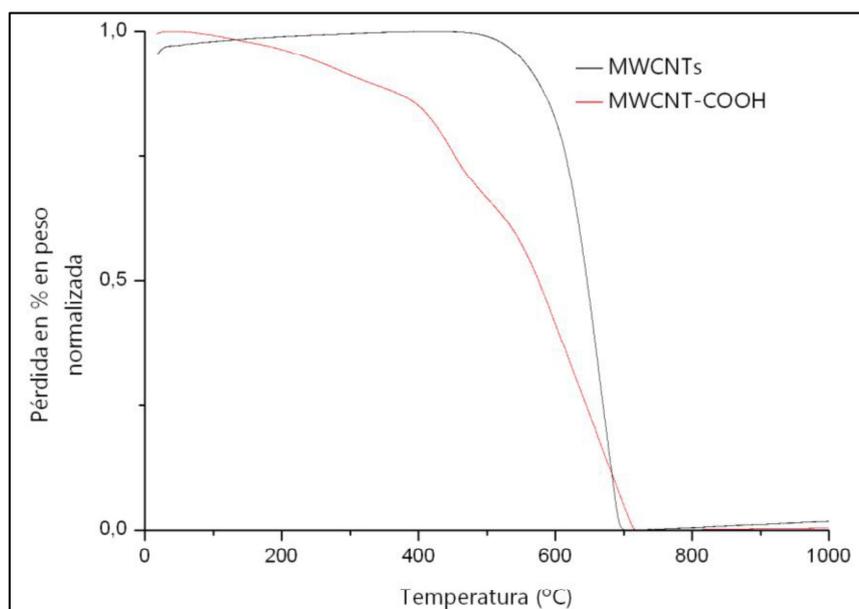


Figura 14. Termograma de los MWCNT-COOH.

Con el propósito de confirmar por una técnica alternativa, la cantidad de grupos carboxílicos presentes en los nanotubos oxidados, se utilizó el cálculo a partir de la formación del zwitterion con la DDA empleando el peso del complejo formado. Esta técnica arrojó una concentración de  $\sim 6 \text{ mmol g}^{-1}$  de COOH. La cantidad de grupos COOH obtenidos es menor que la que se obtuvo por TGA y ello se explica debido al impedimento estérico que limita el acceso a algunos grupos COOH principalmente los localizados en los extremos para formar el complejo, resultando en un menor porcentaje de uniones amidas formadas [Samori, C. y col. 2010].

Al observar los espectros Raman obtenidos es posible identificar los picos característicos de los MWCNTs comerciales demostrando que el tratamiento ácido no ha dañado su estructura (Figura 15). Se calculó la relación de área  $A_D/A_G$  obteniéndose un valor de 1,31. Tal como se esperaba se verificó un aumento en el valor de la relación. El proceso de oxidación de los MWCNTs rompe algunos de los enlaces C=C e inserta grupos funcionales que son interpretados como defectos en la estructura. La banda G presenta un hombro en  $1610 \text{ cm}^{-1}$ , conocido como D' que se debe a un máximo en la densidad de

estados de fonones, que puede atribuirse a un efecto de desorden inducido debido al efecto de tamaño finito o distorsión de red [Rosca, I. D. y col. 2005].

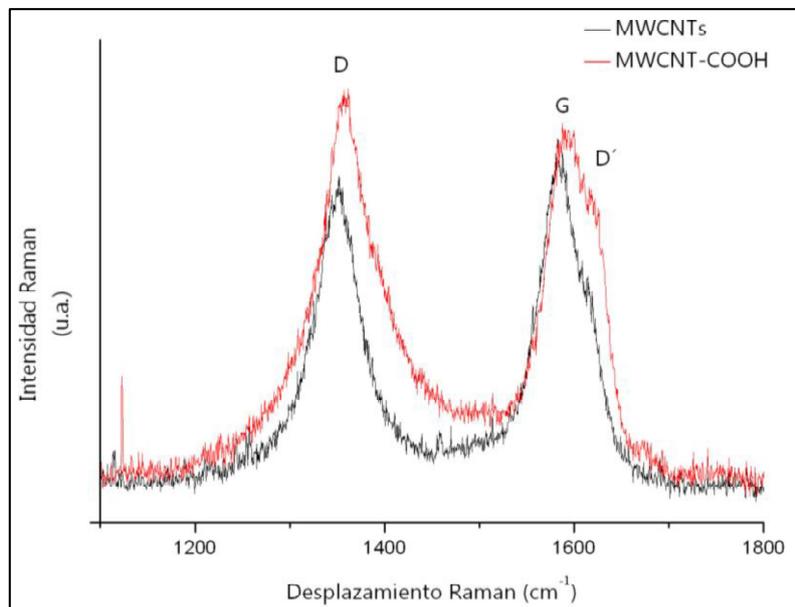


Figura 15. Espectros Raman.

El difractograma realizado a los MWCNT-COOH muestra los picos característicos de la estructura gráfica y no presenta grandes diferencias con el patrón obtenido para los MWCNTs comerciales (Figura 16). Sin embargo, se detectan nuevos picos que coinciden con el patrón de difracción del CaSO<sub>4</sub>. Este resultado se encuentra en concordancia con el análisis realizado por EDS, y su presencia se explica debido al proceso de oxidación que incorpora los grupos sulfato a la estructura de los nanotubos. En relación a la distancia interplanar el valor obtenido es similar al de los MWCNTs ( $d=0,3437 \text{ \AA}$ ).

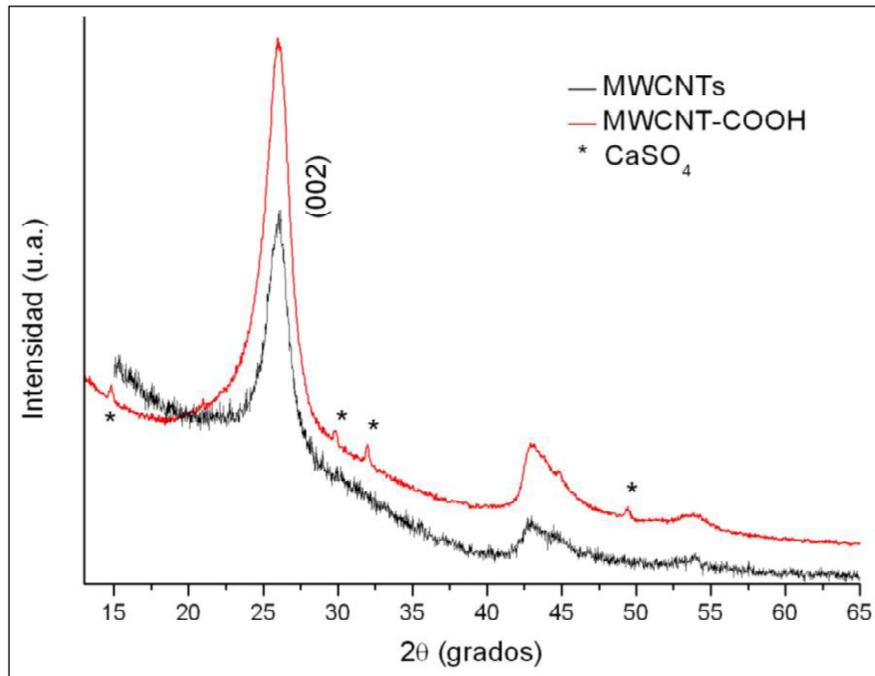


Figura 16. XRD de los MWCNT-COOH.

## 7. Metodología de funcionalización con aminoácidos

En la Figura 17 se presenta el esquema de funcionalización utilizado en dos etapas: la primera consiste en la obtención del cloruro de acilo y la segunda corresponde a la reacción de sustitución con el aminoácido.

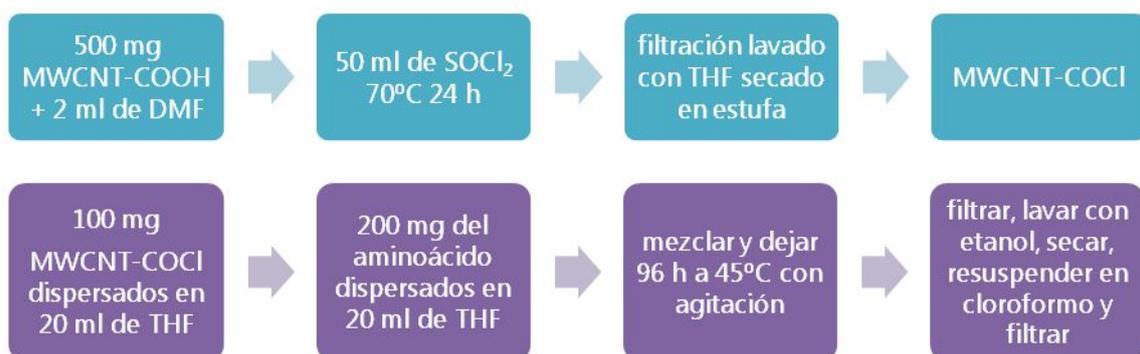


Figura 17. Esquema de obtención de los MWCNTs funcionalizados con aminoácidos.

La funcionalización con aminoácidos se realizó por el método indirecto. Una alícuota de 500 mg de MWCNT-COOH se suspendió en 2 ml de DMF (la DMF es un solvente que logra suspensiones muy estables con los MWCNTs [Kakade, B. A. y col. 2008]). A la suspensión se le agregó 50 ml de  $\text{SOCl}_2$  y se colocó a reflujo a 70 °C durante 24 horas para convertir los ácidos carboxílicos en cloruros de acilo. Luego se filtró con membrana de PVDF de 0,22  $\mu\text{m}$ , se lavó con THF para remover el exceso de  $\text{SOCl}_2$  y finalmente los nanotubos se secaron en estufa. Los MWCNT-COCl se pusieron en contacto con cada uno de los aminoácidos utilizados para la funcionalización (L-prolina y L-alanina) durante 96 horas a 45 °C con agitación magnética. Luego, se filtraron, lavaron con etanol, resuspendieron en cloroformo y filtraron nuevamente. Para finalizar se secaron en estufa y conservaron en desecador.

### **8. Caracterización de los MWCNTs funcionalizados con aminoácidos**

Los MWCNTs funcionalizados se analizaron por diversas técnicas con el fin de confirmar la funcionalización y realizar una completa evaluación de su morfología y estructura.

En la Figura 18 se presentan las imágenes SEM obtenidas para los MWCNTs funcionalizados con L-prolina y L-alanina. Las imágenes son similares a las obtenidas tanto para los MWCNTs comerciales como para los MWCNT-COOH. Podemos observar que luego de atravesar todos los procesos descriptos (oxidación, funcionalización, lavados, molienda) se conserva la estructura de los nanotubos y al igual que en el caso de los MWCNT-COOH a menor aumento se observa una estructura más compacta, lo que se debe a las cargas superficiales que mejoran la dispersión.

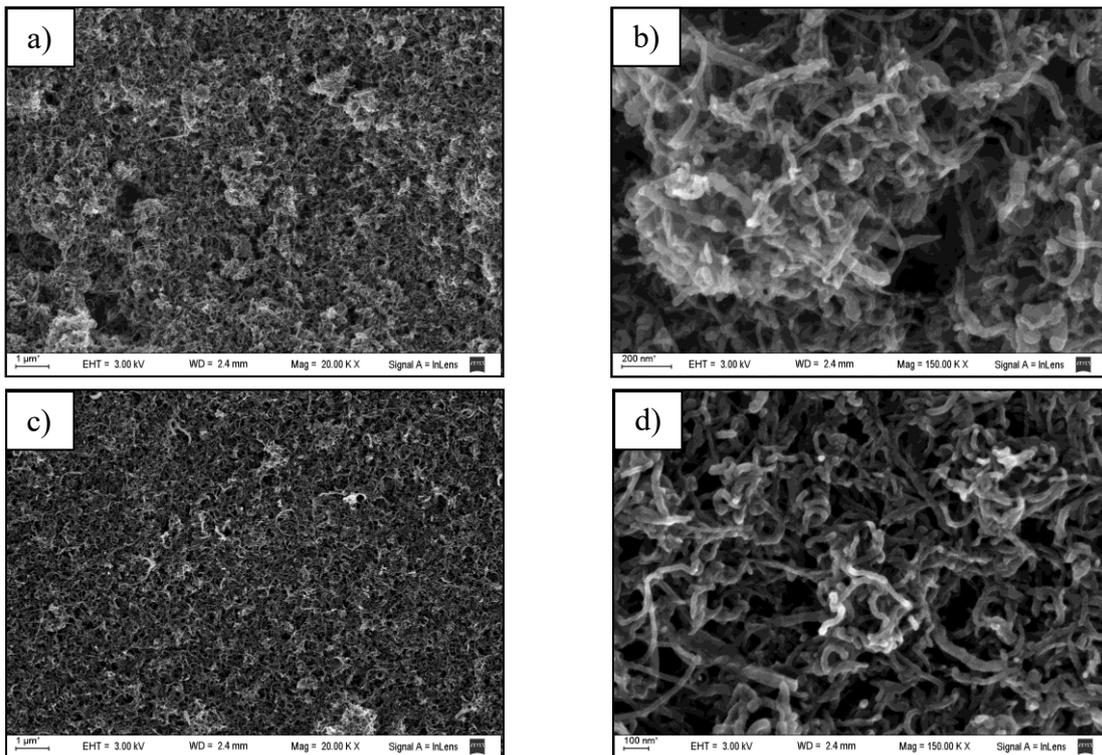
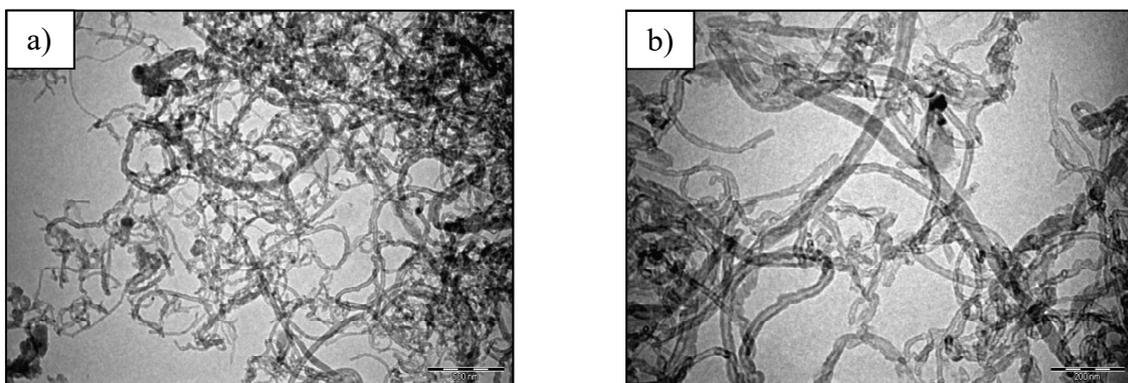


Figura 18. a) Imágenes SEM de MWCNT-pro a 20000x, b) MWCNT-pro a 150000x, c) MWCNT-ala a 20000x, d) MWCNT-ala a 150000x.

En la Figura 19 se observan las imágenes obtenidas por TEM para los MWCNT-pro. Se puede ver conservada la estructura tubular de los nanotubos y una ligera desaglomeración comparándolos con los MWCNT-COOH que puede deberse a la mayor cantidad de grupos funcionales presentes debido a la incorporación de los aminoácidos.



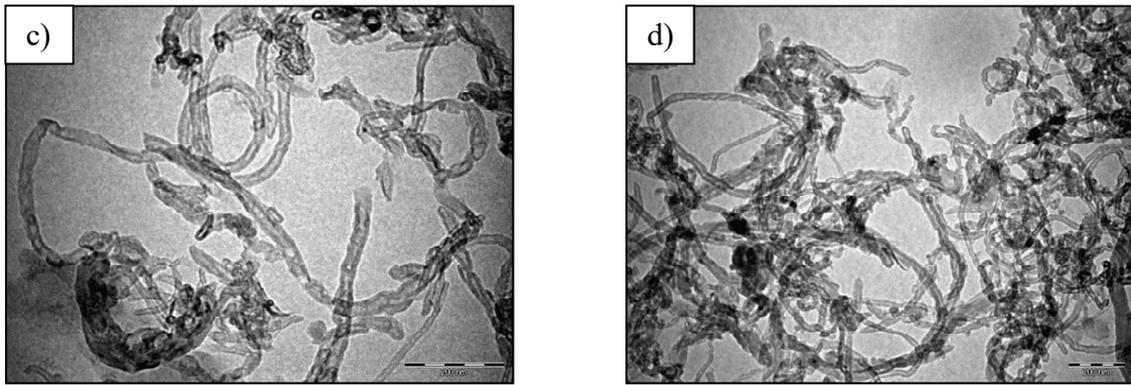


Figura 19. Imágenes TEM de MWCNT-pro.

En la Figura 20 se presenta el espectro obtenido por EDS para las muestras intermedias con la formación del cloruro de acilo y el EDS de los nanotubos donde se realizó el reemplazo con L-prolina. Se observa una disminución en el porcentaje de Fe, asimismo, se sigue detectando S como consecuencia de la oxidación con ácido sulfúrico que genera los grupo sulfato y aparece el Cl debido a la formación del cloruro de acilo. Si bien en los MWCNT-pro la concentración de Cl es menor (25% menor), el espectro pone de manifiesto que no todos los grupos acilo fueron reemplazados por la L-prolina.

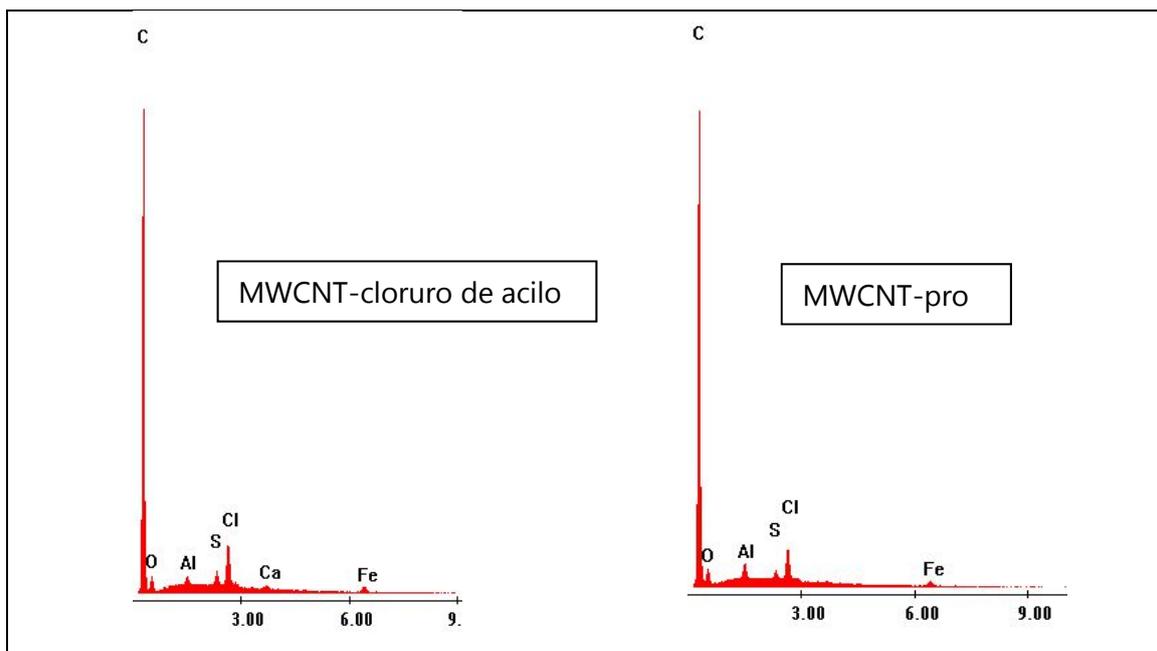


Figura 20. EDS de los nanotubos con cloruro de acilo y con L-prolina.

Los análisis termogravimétricos de los MWCNTs funcionalizados con aminoácidos presentan diferencias con el termograma de los MWCNT-COOH evidenciando la presencia del aminoácido. Se observa un incremento en la pérdida de masa en el rango de temperaturas hasta 350 °C. En la Figura 21 se presenta el análisis realizado sobre MWCNT-pro y su comparación con los nanotubos de las etapas previas. Asimismo, el termograma no muestra la descomposición característica de la L-prolina no encontrándose aminoácido libre. En la Figura 22 se presenta el termograma del aminoácido L-prolina.

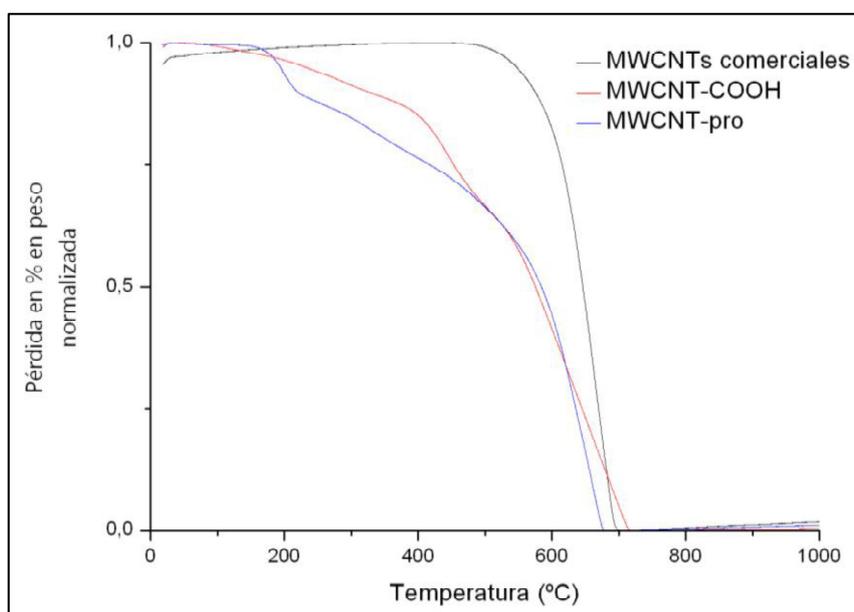


Figura 21. Termograma de los MWCNTs funcionalizados con L-prolina.

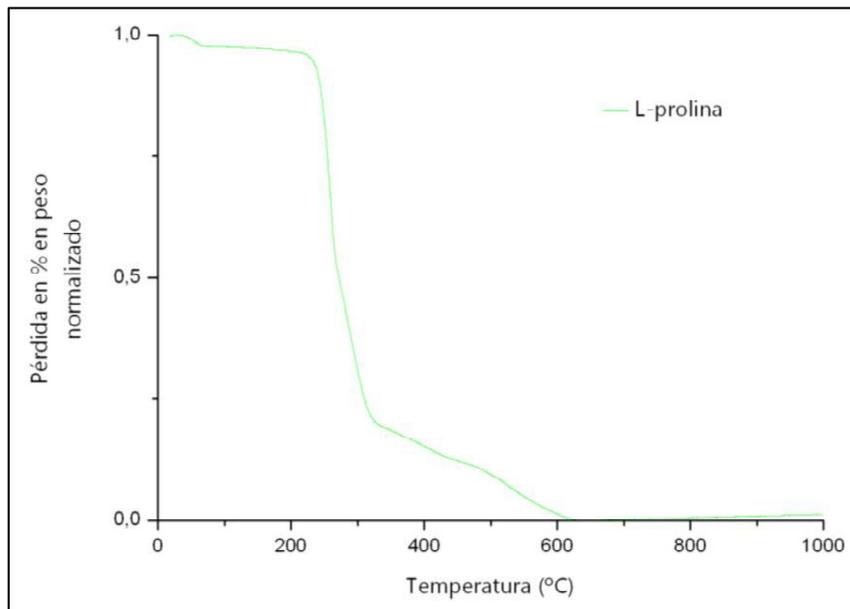


Figura 22. Termograma de la L-prolina.

Al analizar los espectros Raman no se observan cambios significativos, obteniéndose una relación de área  $A_D/A_G$  de 1,25. La ligera disminución confirma que la funcionalización de los nanotubos tiene lugar en los grupos funcionales presentes en las paredes de los nanotubos y no agrega desorden a la estructura de los mismos. En la Figura 23 se presentan en forma comparativa los espectros Raman de los diferentes nanotubos utilizándose como funcionalizados los MWCNT-pro.

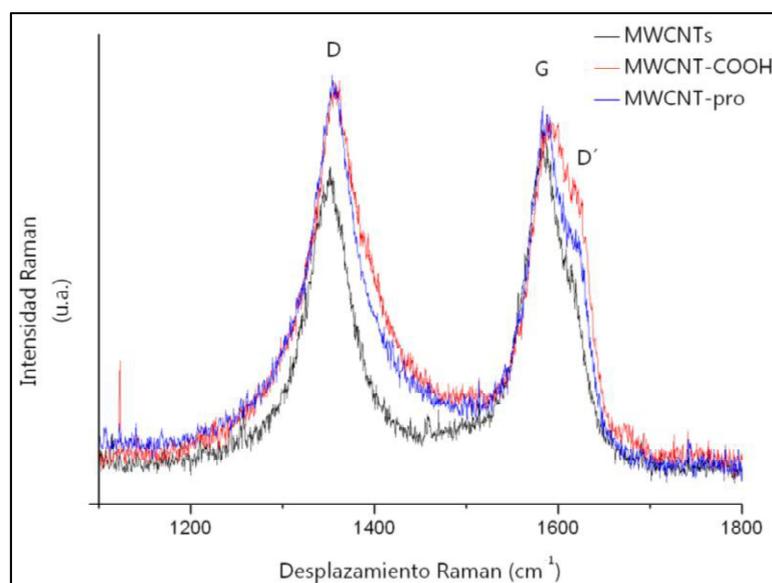


Figura 23. Espectros Raman de los diferentes MWCNTs.

El patrón de difracción obtenido para la muestra de MWCNT-pro (Figura 24) refleja la conservación de la estructura gráfica de los nanotubos coincidente con todas las técnicas utilizadas para caracterizar. Asimismo se observa la desaparición de los picos pertenecientes al  $\text{CaSO}_4$  coincidente con el espectro de EDS.

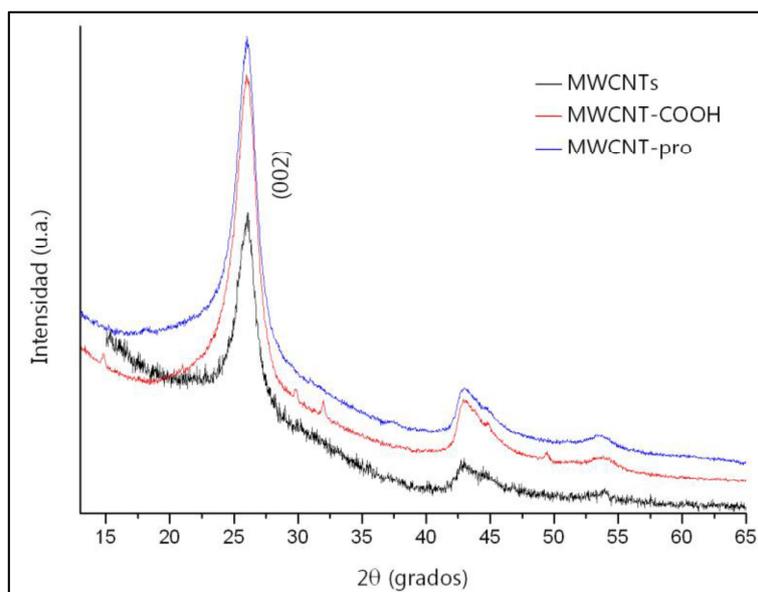


Figura 24. XRD de los distintos nanotubos estudiados.

## 9. Observaciones generales

El objetivo de conocer el impacto de los procesos realizados sobre los nanotubos de carbono está enfocado en su aplicación. Como se mencionó en el Capítulo 1 el material debe reunir determinadas características para su uso como sorbente, entre ellas es fundamental la estabilidad. En procesos de SPE los nanotubos deben soportar condiciones severas: soluciones en un amplio rango de pH, numerosos ciclos de elución con ácidos inorgánicos en diferentes concentraciones, soluciones orgánicas, entre otras. Es por ello que la complementariedad de técnicas utilizadas para su caracterización permite armar el rompecabezas y arribar a algunas consideraciones sobre las particularidades

que alcanzaron los nanotubos sometidos a diversos procesos para su funcionalización.

Las microscopías electrónicas, de barrido y de transmisión, el análisis por TGA y por XRD permitieron corroborar que todos los procesos a los que fueron sometidos los nanotubos no alteraron significativamente la integridad de su estructura. Esto es importante ya que permite suponer que podrán resistir las condiciones de los procesos de SPE sin sufrir daños considerables en su morfología y podrán ser utilizados en un gran número de ciclos.

Las técnicas de EDS y XRD permitieron determinar la identidad y estructura tanto de las impurezas como de compuestos intermedios presentes en los nanotubos. Esta información permite predecir si estos compuestos podrán o no actuar como interferentes en alguna de las técnicas analíticas espectroscópicas de detección y cuantificación de elementos. De esta forma, al analizar la información en su conjunto, es posible arribar al % de pureza de la materia prima (~11%) y la composición del residuo inorgánico (Fe) y observar la formación de estructuras intermedias ( $\text{CaSO}_4$ ). Asimismo, la termogravimetría permite observar la disminución de las impurezas inorgánicas al 4% debido al proceso de oxidación y posterior limpieza.

Los termogramas, el espectro de EDS y las técnicas de cuantificación de grupos carboxílicos permitieron determinar que no todos los grupos fueron sustituidos por el aminoácido, quedando grupos carboxílicos libres que también aportarían en el proceso de retención de cationes. Un indicio de esto lo aportó la técnica de cuantificación de grupos carboxílicos por el método del zwitterion ya que no todos los grupos pudieron reaccionar debido a un impedimento estérico y es probable que lo mismo ocurriese con los aminoácidos L-prolina y L-alanina.

La espectroscopia Raman, al igual que las microscopías electrónicas, permitió observar la integridad de los nanotubos como estructura, pero, además, aportó información que permite suponer la unión de los aminoácidos a

la pared de los nanotubos. En los MWCNT-COOH se observó un aumento del desorden (mayor cantidad de uniones  $sp^3$ ), con lo cual se observa la incorporación de los grupos a la pared de los nanotubos. Este desorden no se vio incrementado en los MWCNT-pro, es decir que el proceso de amidación no rompió enlaces  $sp^2$  de la estructura tubular de los nanotubos, por lo tanto, el aminoácido se unió a los grupos carboxílicos formados en la etapa de la oxidación.

Algunas técnicas utilizadas no aportaron información significativa pero representaron un desafío en la manipulación y preparación de las muestras. Por lo tanto, el aprendizaje adquirido resultó valioso para comprender los desafíos que se deben enfrentar al tener que rellenar microcolumnas en los sistemas de SPE.

### Referencias

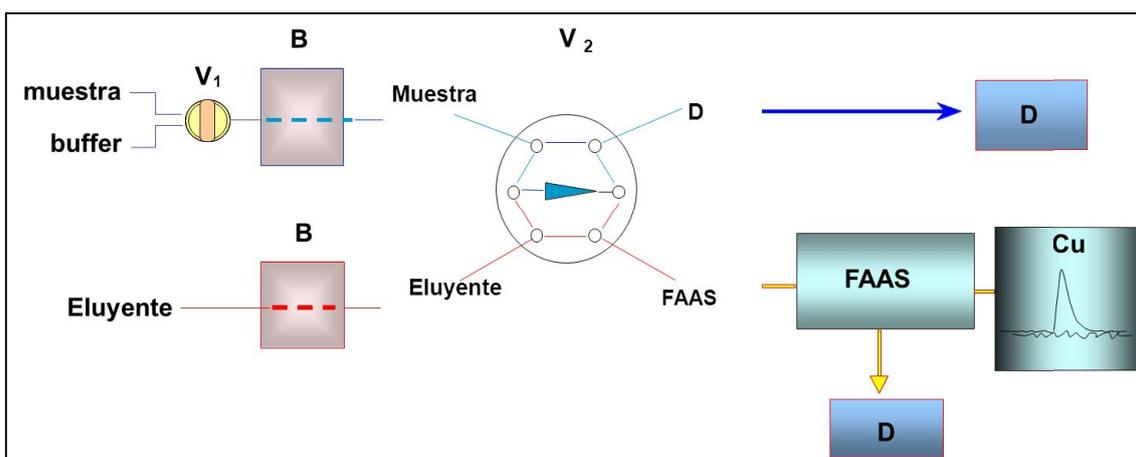
- Ávila-Orta, C. A., Cruz-Delgado, V. J., Neira-Velázquez, M. G., Hernández-Hernández, E., Méndez-Padilla, M. G., y Medellín-Rodríguez, F. J. (2009). Surface modification of carbon nanotubes with ethylene glycol plasma. *Carbon*, 47, 1916-1921.
- Bleda-Martínez, M. J., Lozano-Castelló, D., Morallón, E., Cazorla-Amorós, D., y Linares-Solano, A. (2006). Chemical and electrochemical characterization of porous materials. *Carbon*, 44, 2642-2651.
- Brunauer, S. Emmett, P. H., Teller, E. (1938). Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American Chemical Society*, 60, 309-319.
- Garrido, J., Linares-solano, A., Martin-Martinez, J. M., Molina-Sabio, M., Rodriguez-Reinoso, F, y Torregrosa, R. (1987). Use of  $N_2$  vs  $CO_2$  in the Characterization of Activated Carbons. *Langmuir*, 3, 76-81.
- Colthup, N., Daly, L., y Wiberley, S. (1990), Introduction to infrared and Raman spectroscopy (pp. 363-365). Boston: Academic Press.

- Eklund, P. C., Holden, J. M. y Jishi, R. A. (1995). Vibrational modes of carbon nanotubes; spectroscopy and theory. *Carbon*, 33, 959-972.
- Flahaut, E., Laurent, Ch., y Peigney, A. (2005). Catalytic CVD synthesis of double and triple-walled carbon nanotubes by the control of the catalyst preparation. *Carbon*, 43, 375-383.
- Georgakilas, V., Tagmatarchis, N., Pantarotto, D., Bianco, A., Briand, J. P., y Prato, M. (2002). Amino acid functionalisation of water soluble carbon nanotubes. *Chem. Commun.*, 24, 3050-3051.
- Kakade, B. A., y Pillai, V. K. (2008) An efficient route towards the covalent functionalization of single walled carbon nanotubes. *Applied Surface Science*, 254, 4936-4943.
- Marshall, M. W., Popa-Nita, S., y Shapter, J. G. (2006). Measurement of functionalised carbon nanotube carboxylic acid groups using a simple chemical process. *Carbon*, 44, 1137-1141.
- Misra, A., Tyagi, P. K., Rai, P., y Misra, D. S. (2007). FTIR spectroscopy of multiwalled carbon nanotubes: a simple approach to study the nitrogen doping. *J Nanosci Nanotechnol.*, 7, 1820-1823.
- Rosca, I. D., Watari, F., Uo, M., Akasaka, T. (2005). Oxidation of multiwalled carbon nanotubes by nitric acid. *Carbon*, 43, 3124-3131.
- Salernitano, E., Giorgi, L., Dikonimos Makris, Th., Giorgi, R., Lisi, N., Contini, V., Falconieri, M. (2007). Purification of MWCNTs grown on a nano sized unsupported Fe-based powder catalyst. *Diamond & Related Materials*, 16, 1565-1570.
- Samorì, C., Sainz, R., Ménard-Moyon, C., Toma, F. M., Venturelli, E., Singh, P., Ballestri, M., Prato, M., y Bianco, A. (2010). Potentiometric titration as a straightforward method to assess the number of functional groups on shortened carbon nanotubes. *Carbon*, 48, 2447-2454.

- Shi, J., Yang, B., Goh, S. (2009). Covalent functionalization of multiwalled carbon nanotubes with poly(styrene-co-acrylonitrile) by reactive melt blending. *European Polymer Journal*, 45, 1002-1008.
- Thostenson, E. T., Ren, Z., y Chou, T. (2001). Advances in the science and technology of carbon nanotubes and their composites: a review. *Composites Science and Technology*, 61, 1899-1912.
- Vohrer, U., Kolaric, I., Haque, M. H., Roth, S., Detlaff-Weglikowska, U. (2004). Carbon nanotube sheets for the use as artificial muscles. *Carbon*, 42, 1159–1164.
- Xia, W., Wang, Y., Bergsträßer, R., Kundu, S., y Muhler, M. (2007). Surface characterization of oxygen-functionalized multi-walled carbon nanotubes by high-resolution X-ray photoelectron spectroscopy and temperature-programmed desorption. *Applied Surface Science*, 254, 247-250.
- Yu, R., Chen, L., Liu, Q., Lin, J., Tan, K., Ng, S., Chan, H. S. O., Xu, G., y Hor, T. S. A. (1998). Platinum Deposition on Carbon Nanotubes Chemical Modification. *Chem. Mater.*, 10, 718-722.
- Zhang, H., Lin, G., Zhou, Z., Dong, X., y Chen, T. (2002), Raman spectra of MWCNTs and MWCNT-based H<sub>2</sub>-adsorbing system. *Carbon*, 40, 2429-2436.
- Zou, Y., Feng, Y., Wang, L., Liu, X. (2004). Processing and properties of MWNT/HDPE composites. *Carbon*, 42, 271–277.

# Capítulo 4

## Desarrollo del Sistema de Preconcentración: el Cu(II) como analito modelo



En este capítulo se utilizará al ión Cu(II) como modelo para evaluar las capacidades analíticas de los nanotubos de carbono como material sorbente en sistemas de preconcentración. Se desarrollarán los conceptos relacionados con la utilización de microcolumnas, los acoplamientos instrumentales para estudios de preconcentración en línea, la optimización de parámetros analíticos y la aplicación de la metodología optimizada a la determinación de Cu en aguas naturales de diversos orígenes.

### Abreviaturas

<i>DDW</i>	Double distilled water (Agua destilada y desionizada)
<i>FAAS</i>	Flame atomic absorption spectrometry (Espectrometría de absorción atómica con llama)
<i>FI</i>	Flow injection (Inyección en línea)
<i>ICP MS</i>	Inductively coupled plasma mass spectrometry (Espectrometría de Masas con fuente de Plasma Acoplado Inductivamente)
<i>ICP OES</i>	Inductively coupled plasma atomic optical spectrometry (Espectrometría de Emisión Óptica con fuente de Plasma Acoplado Inductivamente)
<i>LOD</i>	Limit of detection (Límite de detección)
<i>LOQ</i>	Limit of quantification (Límite de cuantificación)
<i>MWCNTs</i>	Multi-walled carbón nanotubes (Nanotubos de carbono de pared múltiple)
<i>MWCNT-COOH</i>	Nanotubos de carbono de pared múltiple oxidados
<i>MWCNT-pro</i>	Nanotubos de carbono de pared múltiple funcionalizados con L-prolina
<i>PDVF</i>	Fluoruro de polivinilideno
<i>RSD</i>	Relative standard deviation (Desviación estándar relativa)
<i>SPE</i>	Solid phase extraction (Separación en fase sólida)

## 1. Introducción

El Cu es un elemento esencial para el hombre desde la prehistoria. La Edad de Bronce lleva el nombre de una aleación de Cu y es en este período histórico donde se desarrolló su proceso metalúrgico. Este elemento y sus aleaciones tienen un rol significativo en el desarrollo de las distintas civilizaciones, desde los antiguos egipcios y romanos hasta la sociedad actual. Sus excelentes propiedades relacionadas con la conductividad y ductilidad hacen que se lo utilice en la fabricación de componentes eléctricos, materiales para la construcción y tuberías de conducción de agua [Tobiasz, A. y col. 2012]. La utilización del Cu y aleaciones con Cu en las cañerías para el transporte de agua es particularmente importante y debe prestarse especial atención por la posibilidad de liberar iones al agua de bebida debido al contacto directo. Esto adquiere especial relevancia en algunas situaciones particulares, por ejemplo, si el pH del agua se encuentra por encima de 7 o presenta una alta concentración de carbonatos, ya que puede aumentar la solubilidad del Cu y aumentar así su concentración en el agua de bebida. Otra fuente importante de Cu se adscribe a la presencia de compuestos químicos que se utilizan en grandes cantidades, como alguicidas y fungicidas (por ej. sustancias para la limpieza del agua en piletas de natación), sustancias para preservar la madera y fertilizantes [Tobiasz, A. y col. 2012].

También debemos destacar la presencia del Cu en el ambiente debido a fuentes naturales como la meteorización de las formaciones rocosas y la actividad volcánica que aportan una concentración basal en aguas naturales en el rango 1-20  $\mu\text{g l}^{-1}$  para aguas dulces superficiales, y del orden de 0,15  $\mu\text{g l}^{-1}$ , para agua de mar [Hodson, P. V. y col. 1979]. Estos valores se ven incrementados por los diversos aportes antropogénicos.

Los iones de Cu que se liberan al ambiente pueden acumularse en organismos vivos [Tobiasz, A. y col. 2012]. Los efectos en la salud debido tanto a la deficiencia como a la excesiva exposición al Cu para plantas, organismos acuáticos y seres humanos han sido ampliamente reportados [WHO reporte, 2004].

La deficiencia del Cu en la nutrición humana puede provocar anomalías como anemias o malformaciones óseas, por lo que el Cu se considera un elemento esencial [Nath, R. 1997]. Vestigios de Cu intervienen en reacciones metabólicas formando parte de diversas proteínas [Aitio, A. y col. 1991], tales como la ceruloplasmina, la citocromoxidasa, etc. Sin embargo la exposición a altas concentraciones de Cu puede producir daños oxidativos a lípidos, proteínas y ADN, contribuyendo a desórdenes neurodegenerativos [Gaetke, L. M. y col. 2003].

En ambientes oxigenados el Cu se encuentra en estado de oxidación +2, siendo éste el predominante en aguas naturales superficiales. El estado de oxidación +1 se encuentra presente en ambientes acuáticos reductores. El ión libre en estado de oxidación +1 ( $\text{Cu}^+$ ) es inestable en soluciones acuosas, tendiendo a desproporcionarse a Cu (+2) y Cu elemental, excepto que esté estabilizado por un agente ligante. En medio acuoso el Cu (+1) solo es capaz de formar compuestos muy poco solubles con cianuro, sulfuro y fluoruro [IPCS, 1998].

En su estado de oxidación (+2), además del ión libre ( $\text{Cu}^{2+}$ ), el Cu se compleja con ligandos inorgánicos tales como  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{SO}_4^{2-}$ ; asimismo, se compleja con ligandos orgánicos a través de grupos fenólicos y carboxílicos [Cotton, F.A. y col. 1989].

El contexto brevemente descrito, las características fisicoquímicas y su potencial toxicidad hacen que este estudio esté enfocado en la necesidad de

disponer de métodos analíticos sensibles y confiables que permitan la determinación del estado de oxidación +2 del Cu a bajos niveles de concentración, que es además en el que se encuentra en una gran variedad de aguas.

En la revisión bibliográfica realizada, encontramos que los MWCNTs se han utilizado para preconcentrar Cu utilizando como agente complejante la o-cresoltaleína aplicándose a la determinación de este metal en aguas [Duran, A. y col. 2009]. También se ha utilizado el complejo ditiocarbamatopirrolidina de amonio [Tuzen, M. y col. 2008] con el mismo propósito. El Cu ha sido retenido y preconcentrado en forma directa utilizando MWCNT-COOH como sustrato por Stafied A. y col. En su publicación encontraron que la mayor adsorción ocurría a pH 9 explicando que probablemente la preconcentración es posible en la región alcalina debido a un proceso simultáneo de adsorción/precipitación.

En este capítulo se utilizan microcolumnas rellenas con MWCNT-pro como sustrato para retener y preconcentrar Cu(II). Se buscan las condiciones de trabajo apropiadas para conseguir su retención cuantitativa. La retención se realiza en línea con las consiguientes ventajas en la manipulación de muestras y consumo de reactivos. La utilización de la espectrometría de absorción atómica con llama (FAAS), una técnica conocida para la detección de Cu(II), permite hacer foco en la implementación del sistema en línea con columna.

## **2. Técnicas para la determinación de Cu**

Las técnicas más extendidas para la determinación de Cu en solución son las espectrometrías atómicas. Existe bibliografía donde se utilizan desde las metodologías más avanzadas como la espectrometría de masas con fuente de plasma acoplado inductivamente (ICP MS) hasta las técnicas más tradicionales como la FAAS [Bora, T. y col. 2015, Tobiasz, A. y col. 2012].

Cuando se utilizan espectrometrías atómicas o las técnicas basadas en el uso de plasmas para la detección y cuantificación del Cu(II) es necesario hacer una serie de etapas de pretratamiento, en particular preconcentración, para mejorar los límites de detección que nos permitan determinar Cu(II) en matrices naturales a los niveles esperados y/o reducir los efectos de potenciales interferentes.

La FAAS pertenece a las espectroscopias de absorción atómicas donde se utiliza una llama para generar átomos libres en estado basal. En FAAS, la muestra luego de una serie de procesos se convierte en aerosol para que el solvente (generalmente agua), pueda evaporarse fácilmente dejando partículas de sales, las cuales se convierten en gases debido a la alta temperatura de la llama y después en átomos neutros, capaces entonces de absorber radiación electromagnética a una longitud de onda específica. Para ello, la muestra es aspirada por un nebulizador neumático y se libera como finas gotas en una cámara donde se mezcla con el gas combustible y el oxidante antes de alcanzar la rendija del quemador, donde se encuentra la llama. Para producir la llama, se utilizan generalmente mezclas de aire-acetileno (temperatura aproximada de 2200 °C-2400 °C) u óxido nitroso-acetileno (temperatura de ~2950 °C).

El proceso de análisis por FAAS se mejora significativamente cuando la introducción de muestras se realiza en forma continua (FI). La modalidad de inyectar la muestra en un flujo continuo (FI FAAS) permite disminuir el consumo de muestra y preconcentrar el analito de interés. Además, tiene como ventaja la disminución tanto del tiempo de análisis como de los efectos de matriz en la etapa de preconcentración y la introducción directa de la muestra en el nebulizador disminuyendo el riesgo de contaminación.

Por ese motivo se ha popularizado el uso de sistemas de FI FAAS para la preconcentración de metales pesados, por ejemplo en muestras de agua de

origen industrial [Tiwari, S. y col. 2015]. La mayoría de estos métodos utilizan la separación en fase sólida (SPE) como método de preconcentración. En el trabajo de Saxena, R. y col. utilizan una resina modificada como sorbente, encontrando que el sistema propuesto es capaz de detectar la presencia de Cu(II) inclusive ante la presencia de altas concentraciones de interferentes. El método se presenta automatizado y alcanza un buen límite de detección cuando se aplica a muestras de agua industriales [Saxena, R. y col. 2016].

La metodología propuesta en este trabajo combina ambas ventajas: la preconcentración utilizando SPE y el sistema de FI. De esta forma se pretende mejorar tanto los límites de detección como el control de los posibles interferentes sumado a las ventajas del sistema FI en relación al mínimo contacto con la muestra y disminución del consumo de reactivos.

### **3. Analito modelo**

La irrupción de los MWCNTs en la química analítica llevó a varios autores a evaluarlos como posibles sustratos para la preconcentración de distintos metales en solución. La información consultada pone de manifiesto la alta afinidad de los iones divalentes como el Cu(II), Pb(II), Zn(II), Co(II), Ni(II), Cd(II) y Mn(II) por los MWCNTs oxidados con distintas metodologías [Stafiej, A. y col. 2008, Zawisza, B. y col. 2012].

En relación al Cu(II), se encuentran publicados muy buenos resultados analíticos empleando sistemas de preconcentración en batch alcanzándose límites de detección de  $2,1 \mu\text{g l}^{-1}$  utilizando FAAS [Stafiej, A. y col. 2008]. Stafied, A. remarca la alta afinidad de los MWCNTs frente al Cu(II) comparado con otros iones divalentes. Asimismo, esta alta afinidad por el Cu(II) hizo que se utilizaran MWCNTs en sistemas de filtración para purificar agua [Tian, Y. y col. 2012].

Todos estos antecedentes motivaron la utilización de Cu(II) como ión modelo para desarrollar e implementar un sistema aún más eficiente y con menor participación del operador como es el SPE en línea y estudiar los factores que afectan los resultados analíticos para posteriormente aplicarlo a la preconcentración de otros elementos de interés ambiental y ecotóxico como son el Hg y Bi.

#### 4. Materiales, reactivos e instrumentos utilizados

En la Tabla 1 se describen los materiales, reactivos e instrumentos utilizados.

<b>Material/Reactivo</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Características</b>
<b>Instrumento</b>		
Agua destilada y desionizada (DDW)	Barnstead	Obtenida por sistema mixto de intercambio iónico
Bomba Peristáltica Minipuls <sup>®</sup> 3	Gilson	De alto caudal, multicanal, con mangueras resistentes a los productos químicos
Espectrómetro de Absorción Atómica	Shimadzu	Modelo AA-6800 Corrector de lámpara de deuterio
HNO <sub>3</sub>	Baker	Para análisis 69-70%
Lámpara de Cu de cátodo hueco	Hamamatsu, Photonics K.	
Mangueras de Tygon	Ismatec	d.i.: 1,52; 1,14 mm Resistente a ácidos
PVDF	Millipore	0,22 µm de poro
Solución de Cu(II) 1000 mg ml <sup>-1</sup>	Merck	Solución comercial estándar

Tabla 1. Materiales, reactivos e instrumentos utilizados.

## 5. Metodología utilizada

### 5.1. Experimentos preliminares, materiales y métodos

Para evaluar las posibilidades de retención del Cu(II) se realizaron estudios en sistemas discontinuos (batch) utilizando una variedad de nanosustratos que presentan diferentes características: a) MWCNTs, b) MWCNT-COOH oxidados con la relación  $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{HNO}_3$  3:1 v/v, c) MWCNT-COOH oxidados con la relación  $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{HNO}_3$  1:3 v/v y d) MWCNT-pro. Si bien, como se explicó en el capítulo anterior, la oxidación con la relación de ácidos de 1:3 se descartó por no resultar la más apropiada luego de su caracterización, se la incluyó en las pruebas preliminares a fin de verificar su comportamiento en este caso específico.

Todo el material utilizado para contener soluciones, tanto de vidrio como de plástico, se lavó con DDW, se dejó en remojo con  $\text{HNO}_3$  10% v/v durante 24 h y finalmente se enjuagó varias veces con DDW. Todas las muestras y estándares se conservaron en botellas de polietileno (50 ml) o tubos Falcon<sup>®</sup> a  $\text{pH} < 2$  con  $\text{HNO}_3$ , refrigeradas (2 °C) según las recomendaciones de la EPA para la conservación y almacenamiento de muestras de agua [Code of Federal Regulations, 1984].

Se utilizaron soluciones comerciales estándar de Cu(II) de 1000 mg l<sup>-1</sup> (Merck) para realizar con ellas todas las diluciones necesarias. Las diluciones se prepararon diariamente.

La metodología empleada para los estudios en batch se hicieron siguiendo los lineamientos de Stafiej, A. y col. 2008. Se pusieron en contacto 20 mg de cada uno de los sustratos estudiados con 10 ml de una solución de Cu(II) de 1 µg ml<sup>-1</sup> preparado en agua DDW sin ajuste de pH. Las muestras se agitaron durante 4 h a temperatura ambiente. Las suspensiones se centrifugaron a 3000 rpm y el sobrenadante se filtró con membrana de PDVF de 0,22 µm de tamaño

de poro. Las soluciones de Cu(II) de  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  se prepararon desde soluciones comerciales estándar de  $1000 \text{ mg l}^{-1}$ . Las soluciones se midieron por espectrometría de emisión óptica con fuente de plasma acoplado inductivamente (ICP OES) y los resultados se presentan en la Figura 1. La cantidad de Cu(II) retenido se calculó por diferencia entre la concentración de la solución inicial ( $C_0$ ) y la concentración medida en la solución al finalizar la experiencia ( $C_f$ ). Los experimentos se realizaron por triplicado.

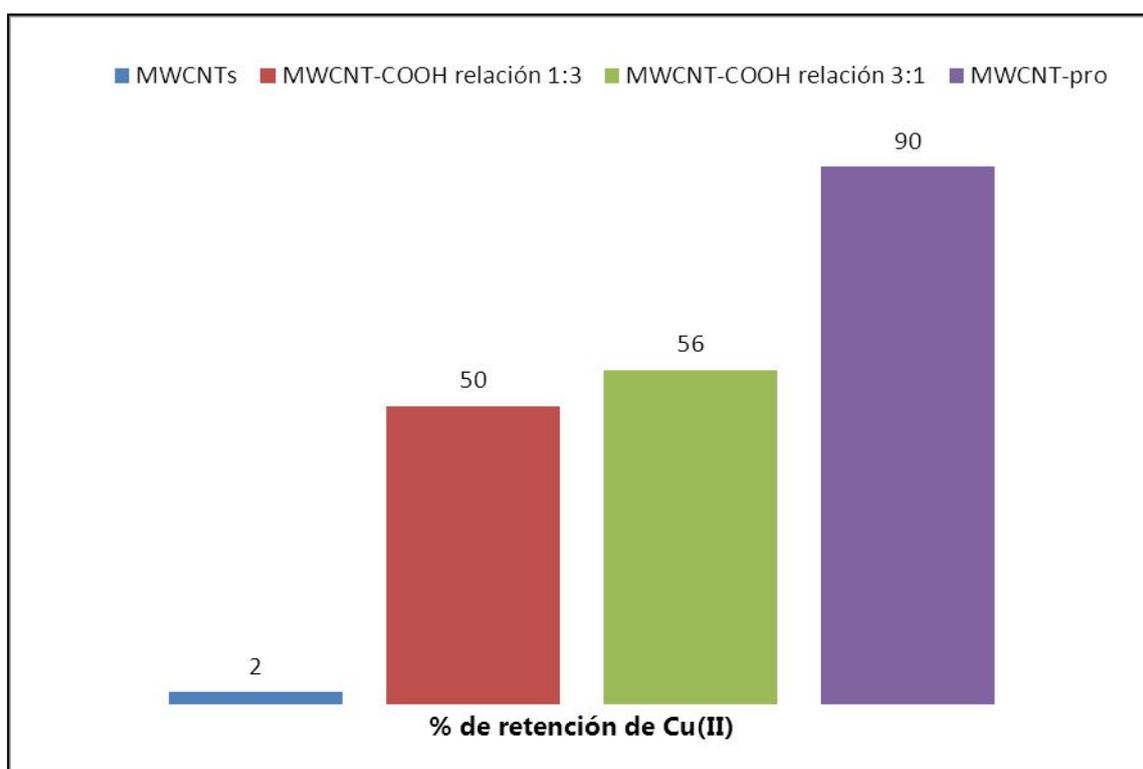


Figura 1. Porcentaje de retención de Cu(II) en los experimentos en batch.

Los resultados reflejan la posibilidad de mejorar notablemente la selectividad de los nanotubos al modificarlos con aminoácidos.

La bibliografía consultada y los resultados obtenidos son consistentes en el uso de Cu(II) como ión modelo para la implementación del sistema de SPE en línea.

## 5.2. Condiciones operativas

En la Tabla 2 se presentan las condiciones de operación del equipo de FAAS.

### Parámetros Instrumentales

Longitud de onda	324,8 nm
Ancho de rendija	0,5 nm
Corriente de la lámpara	6 mA
Corrección de fondo	BGC-D2
Caudal de C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	1,8 l min <sup>-1</sup>

Tabla 2. Parámetros de operación.

## 5.3. Preparación de la columna

En base a los resultados obtenidos se eligió como sustrato para las subsecuentes experiencias a los MWCNT-pro. Se utilizaron ~20 mg de MWCNT-pro para rellenar las puntas cónicas de una micropipeta de plástico (tips amarillos), Figura 2. Se eligió este soporte ya que el grupo de trabajo tiene experiencias exitosas utilizando tips como microcolumna [Pacheco, P. H. y col. 2009]. Las columnas se rellenaron en forma manual por el método de empaquetamiento en seco y se utilizaron topes de fibra de vidrio para evitar la migración del sorbente al sistema en línea. Las columnas se pre-acondicionaron antes de cada medida haciendo pasar i) solución de HNO<sub>3</sub> 10% v/v, ii) DDW y iii) solución acuosa del mismo pH de la solución conteniendo al Cu.

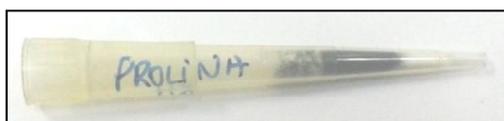


Figura 2. Tip relleno con MWCNT-pro.

#### 5.4. Procedimiento general

Las soluciones se ajustaron a los pHs seleccionados y se hicieron pasar a través de la columna utilizando la bomba peristáltica a una velocidad de  $1,0 \text{ ml min}^{-1}$ . El sistema utilizado para la carga y elución de la muestra se encuentra esquematizado en la Figura 3. Se comienza acondicionando la columna con una solución de igual pH que la solución que contiene al analito colocando la válvula  $V_1$  en la posición B. La válvula de inyección ( $V_2$ ) se coloca en la posición de carga (a) y se pasa la muestra conteniendo al Cu(II). La válvula  $V_2$  se coloca en la posición de elución (b) y se eluye el Cu retenido con una solución de  $\text{HNO}_3$  10% v/v con un caudal de  $1,0 \text{ ml min}^{-1}$ . Todo esto se realiza con una bomba peristáltica y una válvula externa al equipo de FAAS. Seguidamente se introduce el analito. Para finalizar, la microcolumna se regenera haciendo pasar i) solución de  $\text{HNO}_3$  10% v/v, ii) DDW y se vuelve a utilizar iniciándose un nuevo ciclo.

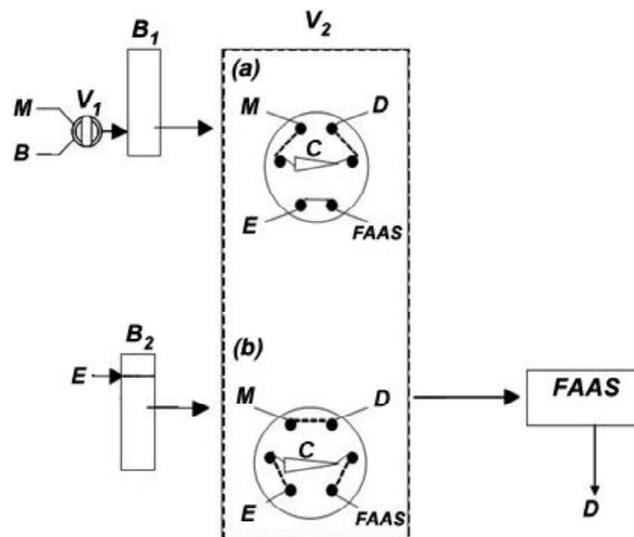


Figura 3. Esquema instrumental utilizado, M. muestra; B. solución con el pH seleccionado, E. eluyente, D. descarte,  $B_1$  y  $B_2$ . Bombas peristálticas, C. microcolumna (tip) rellena con MWCNT-pro,  $V_2$ . Válvula de inyección. Posiciones de la válvula: (a) carga y (b) elución.

## 5.5. Optimización de variables

A continuación se describe la optimización de los parámetros químicos y físicos del sistema de análisis en línea.

### 5.5.1. Efecto del pH

Como se mencionó en capítulos anteriores el pH tiene un papel fundamental en la retención de especies cargadas sobre la superficie de los nanotubos de carbono. Esto se debe a la relación entre la carga de la superficie y la carga del analito en función del pH de la solución. De esta forma el pH de la solución está condicionando la relación entre el sustrato y el analito. Cuando el pH se encuentra por encima del punto isoeléctrico (punto de carga cero) de los MWCNT-pro, la superficie del sustrato adquiere carga negativa y permite la atracción de cationes en solución.

Para estudiar el efecto del pH de la solución de carga en la retención del Cu se prepararon soluciones en un rango de pH comprendido entre 1,0 y 9,0. Las muestras se procesaron según el Procedimiento general (punto 5.4.). Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 4 donde se grafica el porcentaje de Cu retenido por la columna.

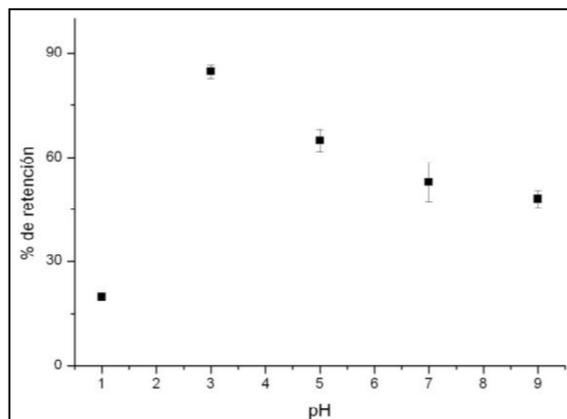


Figura 4. Efecto del pH en la retención de Cu utilizando MWCNT-pro como sustrato.

El estudio muestra un incremento en el porcentaje de retención del Cu(II) en pHs cercanos a 3 por lo que este valor se seleccionó para continuar el estudio de variables. La disminución de la retención a pHs altos se puede deber a la formación del hidróxido ( $\text{pH} > 6$ ) y, a pHs muy bajos, ocurre la competencia del  $\text{H}^+$  con las especies catiónicas.

#### 5.5.2. Efecto del caudal de carga

La optimización del caudal de carga permite encontrar las condiciones óptimas para lograr la retención cuantitativa del Cu(II) en la microcolumna buscando el compromiso entre la máxima retención y un tiempo de análisis no muy prolongado. Se estudió la influencia del caudal de carga a pH 3 (pH optimizado). Tal como se observa en la Figura 5 la retención disminuye ligeramente a partir de un caudal superior a  $1 \text{ ml min}^{-1}$ . Con el objetivo de evitar el empaquetamiento de la microcolumna con la consecuente sobrepresión en el sistema se adoptó un caudal de carga de  $1 \text{ ml min}^{-1}$ .

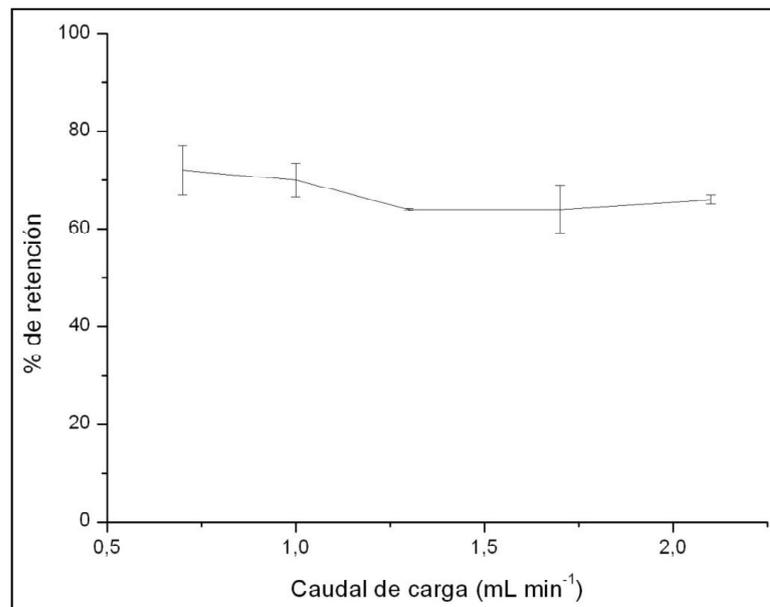


Figura 5. Efecto del caudal de carga en la retención del Cu(II).

### 5.5.3. Efecto de la concentración y caudal del eluyente

En la bibliografía se menciona que los procesos hidrometalúrgicos de extracción de Cu(II) se realizan con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [Tobiasz, A. y col. 2012]. Sin embargo, en el trabajo de S. Walas y col. se probaron soluciones de HNO<sub>3</sub> y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para realizar la elución de iones Cu(II) de un sorbente sólido (silica modificada) encontrándose que el HNO<sub>3</sub> 5% v/v resultaba ser el eluyente más eficiente [Walas, S. y col. 2006].

Teniendo en cuenta este estudio y entendiendo que el proceso de elución involucra el desplazamiento del analito retenido por los H<sup>+</sup> [Pacheco, P. H. y col. 2009], para conseguir la elución del Cu(II) se utilizó HNO<sub>3</sub> y se estudiaron concentraciones en el rango entre 1 a 15% v/v. Se obtuvieron recuperaciones cuantitativas utilizando HNO<sub>3</sub> 10% v/v.

El caudal de elución tiene influencia no solo en el desplazamiento del analito retenido en los MWCNT-pro sino que también afecta al proceso global de medición. Se estudiaron varios caudales de elución y se encontró que al utilizar un caudal de 1 ml min<sup>-1</sup> se alcanzan buenos resultados en cuanto a la repetibilidad de la medición.

### 5.5.4. Volumen de elución

Para calcular el volumen en el que se eluye el Cu(II) retenido se midió el tiempo en el que se obtiene la señal de Cu(II) y se utilizó el caudal de elución para calcular el volumen. La experiencia se realizó varias veces dando como resultado que el Cu(II) se eluye en 2,2 ml.

## 5.6. Capacidad y re-utilización de la microcolumna

La capacidad de adsorción de la microcolumna es el parámetro que determina la cantidad máxima de analito capaz de ser retenida por gramo de sorbente (en este caso MWCNT-pro). La capacidad de retención de la

microcolumna de MWCNT-pro se estudió de forma dinámica utilizando una solución de  $200 \mu\text{g l}^{-1}$  de Cu(II) con un caudal de carga de  $1 \text{ ml min}^{-1}$ . La determinación del total de Cu(II) retenido se realizó integrando el área bajo la curva de la Figura 6. Se obtuvo una capacidad de retención de Cu(II) de  $0,09 \text{ mg g}^{-1}$ .

Asimismo se estudió la estabilidad y capacidad de regeneración de la microcolumna. Para regenerarla se utilizaron 3 ml de  $\text{HNO}_3$  10% v/v y DDW. La microcolumna se mantuvo estable sin observarse deterioro ni disminución del porcentaje de recuperación del Cu(II). Se realizaron 200 ciclos de preconcentración sin observarse ninguno de los efectos mencionados.

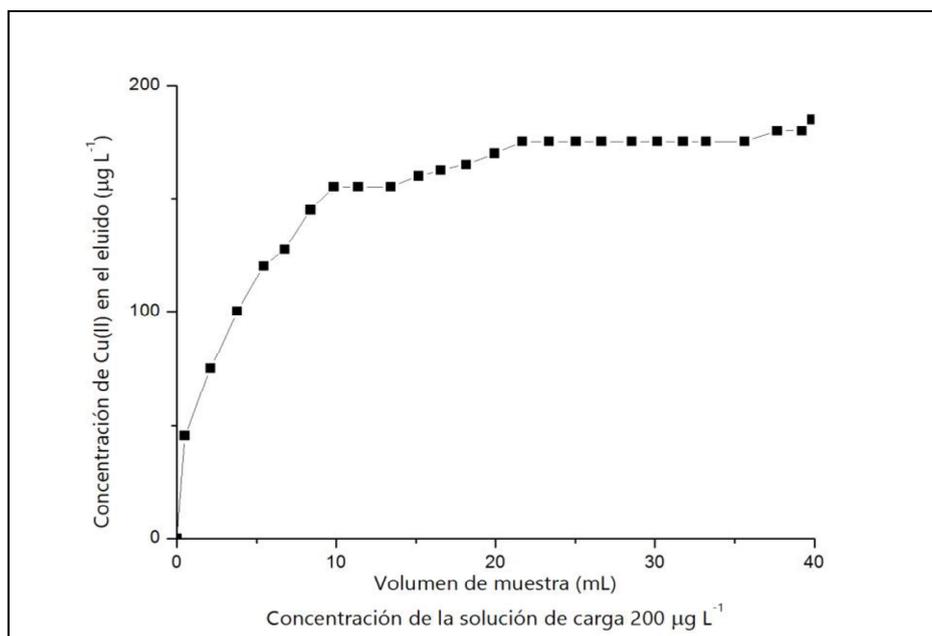


Figura 6. Estudio de la capacidad de retención de Cu(II).

## 6. Desempeño Analítico

Se obtuvo un factor de preconcentración de 27 teniendo en cuenta la relación de pendientes del sistema con preconcentración y sin

preconcentración, utilizando un volumen de muestra de 5 ml. El desvío estándar relativo (RSD) alcanzado es de 6,5 % al medir 10 muestras de Cu(II) a un nivel de 20  $\mu\text{g l}^{-1}$ . Se alcanzó un límite de detección (LOD) de 8  $\mu\text{g l}^{-1}$ . Para calcularlo se realizaron 10 medidas independientes del blanco y se utilizó el criterio de  $3\sigma$  del desvío estándar de las medidas realizadas. El límite de cuantificación (LOQ) es de 28  $\mu\text{g l}^{-1}$  utilizando el criterio de  $10\sigma$ . La linealidad del sistema optimizado se estudió desde valores cercanos al LOD hasta 200  $\mu\text{g l}^{-1}$  con un coeficiente de correlación de 0,9986.

Lamentablemente no fue posible en esta etapa de la tesis conseguir material de referencia certificado para poder procesarlo con la metodología propuesta y comparar los resultados alcanzados. Se midieron las muestras en forma directa (Tabla 3) y luego se realizó un estudio de recuperación agregando 30  $\mu\text{g l}^{-1}$  de Cu(II). Las recuperaciones variaron entre 97 y 108 %. En la Tabla 4 se presentan los datos obtenidos del estudio de recuperación.

Muestra	Metodología desarrollada [ $\mu\text{g l}^{-1}$ ]
H <sub>2</sub> O de red	16,3 ± 1,0
Agua de río de Mendoza	<LOD
Agua de río de Mendoza	<LOD
Agua de río de Mendoza	<LOD
Agua en cercanía a una mina	39,4 ± 2,5
Agua en cercanía a una mina	15,6 ± 0,9
Agua en cercanía a una mina	<LOD

Tabla 3. Determinación de Cu(II) en distintos tipos de aguas.

Muestra	Cantidad de Cu agregado ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Cu encontrado	% de Recuperación
Agua de río de Mendoza	30,0	29,1 $\pm$ 1,9	97%
Agua de río de Mendoza	30,0	30,9 $\pm$ 2,0	103%
Agua de río de Mendoza	30,0	32,1 $\pm$ 1,7	107%
Agua en cercanía a una mina	30,0	29,7 $\pm$ 1,9	99%

Tabla 4. Resultados del estudio de recuperación.

## 7. Efecto de iones concomitantes

Es necesario estudiar cómo afecta a la señal de Cu(II) la presencia de otros iones en solución, para ello, se estudia como interfieren otros iones que normalmente coexisten con el Cu(II). Para realizar este estudio se emplearon soluciones de  $30 \mu\text{g l}^{-1}$  de Cu(II) a las que se le adicionaron concentraciones de Ni(II), Cd(II), Zn(II), Mn(II), Co(II),  $\text{SO}_4^{2-}$  y  $\text{Cl}^{-1}$  en dos niveles de concentración: a)  $100 \mu\text{g l}^{-1}$  y b)  $1000 \mu\text{g l}^{-1}$ . Las soluciones preparadas de esta forma se procesaron según la metodología analítica optimizada (5.4. Procedimiento general). Se observó que la presencia de los iones estudiados hasta una concentración de  $1000 \mu\text{g l}^{-1}$  no afectan la señal de Cu(II) lo que demuestra la selectividad del método desarrollado.

## 8. Análisis de aguas naturales

La metodología desarrollada se empleó para la determinación de Cu(II) en aguas procedentes de ríos de la provincia de Mendoza. Las muestras colectadas se filtraron utilizando membrana de PDVF de  $0,22 \mu\text{m}$  de tamaño de poro y almacenadas a  $2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Los resultados están presentados en la Tabla 3.

## 9. Conclusiones

Mediante la utilización del Cu(II) como ión modelo fue posible desarrollar la metodología analítica utilizando MWCNT-pro como sorbente en sistemas de SPE en línea. Se encontraron las condiciones apropiadas para lograr la retención del Cu(II) en los nanotubos funcionalizados y su posterior desorción para poder realizar la medición en forma cuantitativa.

Esta primera etapa de trabajo analítico permitió identificar puntos donde implementar optimizaciones que permitan obtener mejores desempeños analíticos. La implementación de sistemas de SPE en línea acoplados a instrumentos comerciales tiene la ventaja de que es posible aplicarlo en la mayoría de los Laboratorios Analíticos pero muestra también la necesidad de adaptar algunos parámetros instrumentales a las limitaciones de los softwares comerciales. Por ejemplo, el reemplazo del loop por el tip de micropipeta a modo de columna fue exitoso, pero también se identificó como un punto a mejorar; por un lado no permitió utilizar el flujo reverso para la elución, por el otro, la geometría del tip y el sentido del caudal de carga y elución produjeron la prematura compactación del sistema.

Otro aspecto relevante de esta etapa de trabajo fueron las experiencias en batch, que mostraron la posibilidad real de conseguir selectividad a partir de la funcionalización de MWCNTs con aminoácidos. Si bien esto es particular para cada sistema sustrato/analito/matriz y debe ser estudiado en forma específica, en este capítulo quedó demostrado que los aminoácidos son una posibilidad concreta de lograr selectividad.

El trabajo realizado con Cu(II) permitió implementar el método de SPE y aportó información valiosa para aplicar esta metodología a otros analitos de interés ecotóxico. Es importante resaltar que esta primera experiencia sirve de

guía para optimizar el desempeño analítico incorporando mejoras en los puntos identificados.

## Referencias

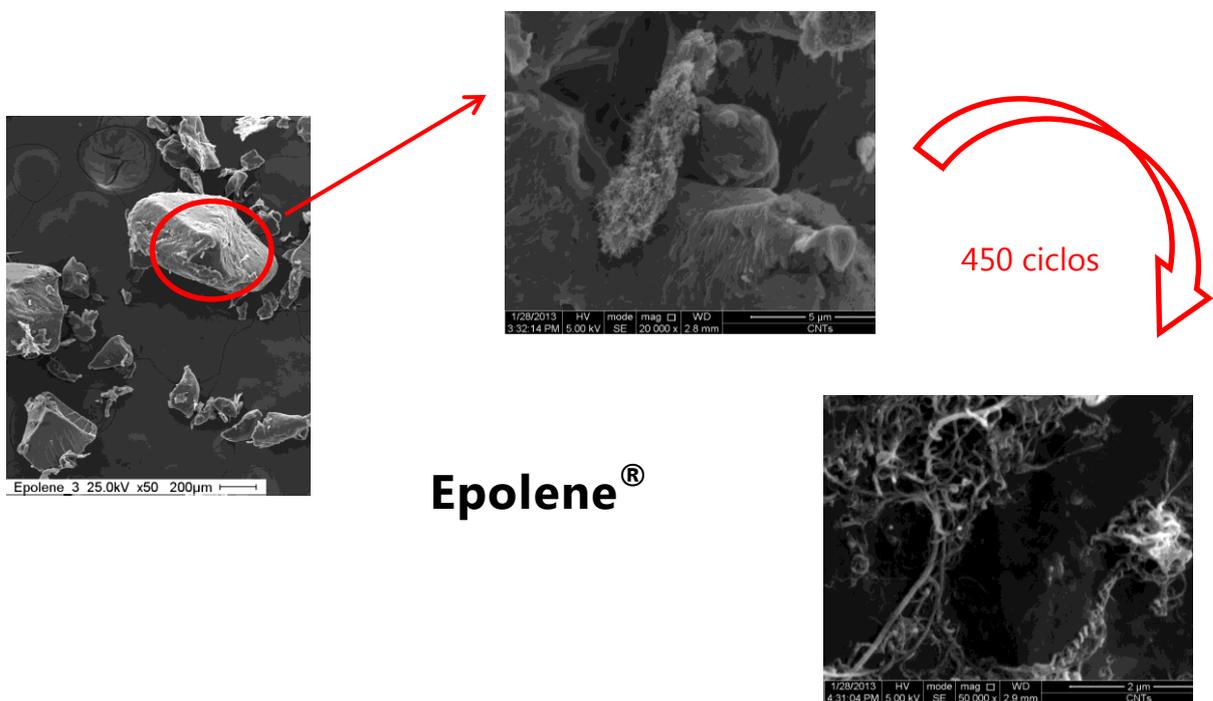
- Aitio, A., Aro, A., Jarvisalo, J. y Vainio, H. (1991). Trace elements in health and disease. 1<sup>st</sup> ed. RSC: Cambridge.
- Bora, T., Aksoy, Ç., Tunay, Z. y Aydın, F. (2015). Determination of trace elements in illicit spice samples by using ICP-MS. *Microchemical Journal*, 123, 179-184.
- Cotton, F.A. y Wilkinson, G.(1989). Advanced inorganic chemistry. New York, John Wiley and Sons Ltd, 755-775. En:IPCS (International Programme on Chemical Safety). 1998. Environmental Health Criteria 200. Copper. World Health Organization. Geneva.
- Duran, A., Tuzen, M. y Soylak, M. (2009). Preconcentration of some trace elements via using multiwalled carbon nanotubes as solid phase extraction adsorbent. *Journal of Hazardous Materials*, 169, 466-471.
- Gaetke, L. M. y Chow, C. K. (2003). Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 189, 147-163.
- IPCS (International Programme on Chemical Safety). 1998. Environmental Health Criteria 200. Copper. World Health Organization. Geneva.
- Hodson, P. V., U. Borgmann y H. Shear. (1979). Toxicity of copper to aquatic biota. en J. O. Nriagu, ed. Copper in the environment. Part 2: health effects. John Wiley, NY. En: Eisler, R. 2000. Copper (capítulo 3). Handbook of chemical risk assessment. Volumen 3. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida.307-372.
- Nath, R. (1997). Copper deficiency and heart disease: molecular basis, recent advances and current concepts. *Int J Biochem Cell Biol.*,29, 1245-1254.

- Pacheco, P. H., Olsina, R., Polla, G., Martinez, L. D., y Smichowski, P. (2009). Adsorption behaviour of cadmium on L-methionine immobilized on controlled pore glass. *Microchemical Journal*, 91, 159-164.
- Required Containers, Preservation Techniques, and Holding Times. (1984). Code of Federal Regulations, Title 40, Part 136, 49 FR 43260; Part 264, 40 CFR 264.
- Saxena, R., Meena, P. L. y Tiwari, S. (2016). Determination of copper in industrial water by innovative flow injection flame atomic absorption spectrometry. *Instrumentation Science & Technology*, 44, 210-222.
- Stafiej, A. y, Pyrzynska, K. (2008). Solid Phase Extraction of Metal Ions Using Carbon Nanotubes. *Microchemical Journal*, 89, 29-33.
- Tiwari, S., Sharma, N. y Saxena, R. (2015). A review on application of hyphenated flow injection system for determination of heavy metal ions in water samples. *International Journal of Advance Technology in Engineering and Science*, 3, 692-702.
- Tobiasz, A., Walas, S., Soto Hernández, A. y Mrowiec, H. (2012). Application of multiwall carbon nanotubes impregnated with 5-dodecylsalicylaldehyde for on-line copper preconcentration and determination in water samples by flame atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 96, 89-95.
- Tuzen, M., Saygi, K. O. y Soylak, M. (2008). Solid phase extraction of heavy metal ions in environmental samples on multiwalled carbon nanotubes. *Journal of Hazardous Materials*, 152, 632-639.
- Walas, S., Mrowiec, H. y Sadza, M. (2006). Application of a LIX 622 Liquid Ion-Exchanger of a Hydroxyoxime Type Immobilized Onto Silica Gelfor Flow Injection Preconcentration and FAAS Determination of Copper. *Chem. Anal. (Warsaw)*, 51, 727-737.
- WHO, Copper in drinking-water, background document for development of WHO Guidelines for drinking-water quality, WHO/SDE/WSH/03.04/88, 2004.

Zawisza, B., Skorek, R., Stankiewicz, G. y Sitko, R. (2012). Carbon nanotubes as a solid sorbent for preconcentration of Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn and Pb prior to wavelength-dispersive X-ray fluorescence spectrometry. *Talanta*, 99, 918-923.

# Capítulo 5

## Retención, preconcentración y determinación de Hg(II) en aguas naturales



En este capítulo se evalúa la capacidad de los nanotubos de carbono oxidados para la retención, preconcentración y posterior determinación de Hg(II) en diferentes tipos de aguas a niveles de  $\text{ng l}^{-1}$ .

### Abreviaturas

<i>AAS</i>	Atomic absorption spectrometry (Espectrometría de absorción atómica)
<i>CV</i>	Cold vapor (Vapor frío)
<i>CV AAS</i>	Cold vapor atomic absorption spectrometry (Espectrometría de absorción atómica por vapor frío)
<i>DDW</i>	Double distilled water (Agua destilada y desionizada)
<i>EDL</i>	Electrodeless discharge lamp (Lámpara de descarga sin electrodo)
<i>EPA</i>	The US Environmental Protection Agency (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos)
<i>FE</i>	Factor de enriquecimiento
<i>FIAS</i>	Flow injection analysis system (Sistema de inyección en línea)
<i>HPLC</i>	High-performanced liquid chromatography (Cromatografía líquida de alta resolución)
<i>ICP MS</i>	Inductively coupled plasma mass spectrometry (Espectrometría de Masas con fuente de Plasma Acoplado Inductivamente)
<i>ICP OES</i>	Inductively coupled plasma optical emission spectrometry (Espectrometría de Emisión Óptica con fuente de Plasma Acoplado Inductivamente)
<i>LOD</i>	Limit of detection (Límite de detección)
<i>LOQ</i>	Limit of quantification (Límite de cuantificación)
<i>MWCNTs</i>	Multi-walled carbon nanotubes (Nanotubos de carbono de pared múltiple)
<i>MWCNT-COOH</i>	Nanotubos de carbono de pared múltiple oxidados

<i>NaBH<sub>4</sub></i>	Borohidruro de sodio
<i>PDVF</i>	Fluoruro de polivinilideno
<i>PET</i>	Polietilentereftalato
<i>PTFE</i>	Politetrafluoroetileno
<i>RSD</i>	Relative standard deviation (Desviación estándar relativa)
<i>SnCl<sub>2</sub></i>	Cloruro de estaño (II)
<i>SEM</i>	Scanning electron microscopy (Microscopia electrónica de barrido)
<i>SPE</i>	Solid phase extraction (Separación en fase sólida)
<i>TREs</i>	Traffic related elements (Elementos relacionados con el transporte automotor)
<i>WHO</i>	World Health Organisation (Organización Mundial de la Salud)

## 1. Introducción

El mercurio (Hg) es un polutante ambiental, mundialmente distribuido, conocido por sus altos niveles de toxicidad y efectos adversos sobre la salud humana. Es por ello que está considerado como uno de los metales tóxicos más peligrosos debido a su habilidad de bioacumularse en tejido vivo y biomagnificarse en las cadenas tróficas [Nabais, J.V. y col. 2006, Okoronkwo, N. E. y col. 2007, Ramamoorthy, S. y col. 1979]. Esto ha motivado que organizaciones como la Unión Europea haya restringido la concentración de Hg en agua de bebida a  $1 \mu\text{g l}^{-1}$  y el límite de vuelco en cursos de agua a  $5 \mu\text{g l}^{-1}$  [Ghodbane, I. y col. 2008]. Para la EPA, en cambio, el límite fijado en agua de bebida es de  $2 \mu\text{g l}^{-1}$  y el límite de vuelco en cursos de agua es  $10 \mu\text{g l}^{-1}$  [EPA reporte, 2001] y para la WHO es de  $6 \mu\text{g l}^{-1}$  el límite admisible para agua de bebida [WHO reporte, 2010].

El Hg es emitido al ambiente mayoritariamente en su forma elemental, como  $\text{Hg}^0$ , por fuentes naturales como las emisiones del suelo, erupciones volcánicas, incendios forestales y por fuentes antropogénicas como la combustión de combustibles fósiles y la minería del oro. La principal emisión de Hg al ambiente ha ocurrido a partir del 1800 y está asociada a la revolución industrial en varias partes del mundo [UNEP reporte, 2013]. Sin embargo, las primeras investigaciones sobre los problemas ecotoxicológicos asociados al uso y liberación del Hg fueron realizados a partir de 1960 como consecuencia de un hecho conocido como "Desastre de Minamata". Este suceso es un ejemplo emblemático de liberación directa de compuestos orgánicos de mercurio que provocó el envenenamiento por metilmercurio en Minamata, Japón, en los años 1950. Se vertieron en esa bahía subproductos orgánicos de mercurio resultado de la producción industrial de acetaldehído y la población de la zona consumió peces y mariscos contaminados. En mayo de 1956 se descubrió oficialmente lo que se llamó la enfermedad de Minamata, detectándose los síntomas de

toxicidad aguda, malformaciones en fetos cuyas madres consumieron alimento contaminado y con los años comenzaron a detectarse los efectos de la toxicidad crónica [Harada, M. 1995].

Así, los estudios se han enfocado en la relación entre la composición del ecosistema (agua, suelos, sedimentos y biota), bioacumulación, transferencia en la cadena trófica y la toxico-dinámica del Hg [Berlin, M., B. y col. 2007, Harada, M. 1995, Kojima, K. y col. 1973].

Al enfocarnos en las áreas urbanas, la presencia de Hg se debe principalmente a actividades antropogénicas como la combustión de combustibles fósiles, refinación de petróleo, producción de cemento, fundiciones, transporte, quema de residuos sólidos urbanos y diferentes tipos de industrias [Biester, H. y col. 2002, Tack, F. M. G. y col. 2005]. Por ejemplo, estudios realizados sobre la composición del polvo de la calle de Buenos Aires demuestran que el Hg es un elemento relacionado al transporte automotor (TREs), especialmente ligado a la fracción de menor tamaño de partícula asociada a los escapes de los vehículos, debido a la combustión de los combustibles líquidos [Londonio, A. y col. 2012].

La mayor consciencia sobre los problemas ambientales y el avance en la legislación de numerosos países ha provocado la reducción de las aplicaciones industriales del Hg [UNEP reporte, 2013, Berlin, M., B. y col. 2007]. Además, países industrializados como EEUU y Canadá han implementado programas de reducción de emisiones de Hg [Cooney, C. M. 2007].

Como consecuencia de ello, la utilización de Hg en distintos procesos industriales, como la producción electrolítica de cloro-soda y en productos comerciales como baterías, equipamientos eléctricos y electrónicos, pesticidas y biocidas ha disminuido. Estas políticas lograron la reducción de las emisiones antropogénicas de Hg a la atmósfera en Europa en un 40% entre 1990 y 2000 [Pacyna, E. G. y col. 2006]. Sin embargo, este descenso no ha ocurrido a nivel

mundial ya que la industrialización y la excesiva explotación de la minería de oro (en baja escala) en la última década provocaron un aumento de las emisiones de Hg de origen antropogénico en Asia, América del Sur y África, provocando que la cantidad anual de emisiones globales de Hg por la actividad humana haya aumentado ligeramente de 1900 toneladas en 1995 a 1960 toneladas en 2010 [UNEP 2013, UNEP 2002]. Este aumento compromete a la comunidad internacional en su conjunto debido a que el Hg atmosférico se distribuye globalmente, a causa de su elevada vida media y deposición tanto por vía húmeda como por vía seca, provocando una considerable contaminación de la hidrósfera [Lamborg, C. H. y col. 2014]. La presencia de mayores contenidos de Hg en la hidrósfera es lo que ocasiona el incremento del nivel de Hg en peces de consumo humano. Teniendo en cuenta la capacidad de bioacumulación del Hg en la cadena trófica, con factores de hasta  $10^6$ , el consumo de pescado es actualmente la principal fuente de exposición humana no-ocupacional al Hg [Burger, J. y col. 2005].

Este escenario hace que exista continuo interés por el monitoreo de la concentración de Hg en aguas, existiendo por ejemplo, la Directiva del Programa Marco Europeo para el Agua (2000/60/EC) y la EPA que declaran al Hg como un contaminante peligroso y consideran de carácter obligatorio su monitoreo en la hidrósfera a niveles de ultratrazo.

La presencia de Hg en aguas naturales varía en función de su estado de oxidación: el Hg elemental es un vapor insoluble, el Hg(II) como cloruro es muy soluble mientras que el Hg(I) como cloruro es mucho menos soluble y el Hg(II) como sulfuro es prácticamente insoluble. Un proceso muy importante que puede ocurrir tanto en aguas naturales como en agua de mar es la metilación del Hg inorgánico [IPCS, 1989]. Existen bacterias (*Pseudomonas spp.*) presentes en la mucosa superficial de peces y en sedimentos, capaces de metilar al Hg en condiciones aeróbicas. Existen también otro tipo de bacterias capaces de metilar

al Hg en condiciones anaeróbicas [Wood, J. M. y col. 1983]. Una vez que el metilmercurio es liberado por los microorganismos, entra en la cadena trófica como consecuencia de su rápida difusión, y se une a las proteínas de la biota acuática. Esto es lo que provocó el envenenamiento por consumo de peces contaminados en el desastre de Minamata. El contenido de Hg total es la suma de las diferentes especies de Hg que sufren procesos de oxidación, reducción y biometilación.

La concentración de Hg total disuelta en aguas naturales sin contaminación está en el orden de los sub-ng l<sup>-1</sup> para agua de mar llegando a 10 ng l<sup>-1</sup> para aguas dulces y aguas costeras [WHO, 1990, Gilmour, C. C. y col. 1991]. En relación con el agua de lluvia, los niveles de Hg están reportados en el rango de 5–100 ng l<sup>-1</sup>, llegando a niveles tan bajos como 1 ng l<sup>-1</sup> [IPCS, 1990]. La concentración natural de Hg en aguas subterráneas y aguas superficiales es <0,5 µg l<sup>-1</sup>, sin embargo depósitos minerales y/o actividades mineras pueden provocar aumentos de estos valores.

Esta situación plantea, por lo tanto, el desafío de la necesidad de determinar Hg a niveles extremadamente bajos cuando se deben monitorear aguas naturales. Esto hace que la determinación directa utilizando técnicas instrumentales sea muy limitada. Inclusive, una técnica tan sensible como la espectrometría de masas con fuente de plasma acoplado inductivamente (ICP MS) conlleva a un desafío para la medición directa de Hg en determinadas aguas, como por ejemplo agua de mar, por su elevada concentración salina. Es por ello que es fundamental la incorporación de una etapa de separación y preconcentración previa a la detección y determinación cuantitativa de Hg.

En este capítulo se presenta el desarrollo de la metodología analítica para separar, preconcentrar y determinar cuantitativamente Hg(II) en aguas naturales utilizando la separación en fase sólida como metodología y los nanotubos de carbono de pared múltiple oxidados (MWCNT-COOH) como sustrato. La

optimización de este proceso permite realizar las determinaciones mediante espectrometría de absorción atómica por vapor frío (CV AAS), técnica ampliamente utilizada para la determinación cuantitativa de Hg en varios tipos de muestras debido a su alta sensibilidad y selectividad como así también a su relativamente bajo costo de operación y bajo límite de detección ( $<1,0 \mu\text{g l}^{-1}$ ) [Wuilloud, J. C. A. y col. 2002, Capelo, J. L. y col. 2004, Torres, D. P. y col. 2005].

## 2. Técnicas para la determinación de Hg

Para la determinación de Hg total es posible utilizar técnicas instrumentales como ICP MS [Zhao, Y. y col. 2012, Karunasagar, D. y col. 1998], la espectrometría de fluorescencia atómica (AFS) [Leopold, K. y col. 2008], la espectrometría de absorción atómica (AAS) [Ferrua, N. y col. 2007, Rofouei, M. K. y col. 2011] y la fluorescencia de Rx por reflexión total (TXRF) [Marguá, E. y col. 2010]. Asimismo, con la finalidad de mejorar la sensibilidad de estas técnicas es posible combinar algunas de ellas con CV y la técnica de amalgama de oro para la separación y preconcentración de Hg, respectivamente [Leopold, K. y col. 2008; Sánchez, R. y col. 2015; Pyhtilä, H. y col. 2012]. Además, para la separación de las distintas especies de Hg es posible utilizar cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) [Jones, P. y col. 1997].

El acoplamiento CV AAS es frecuentemente utilizado para la determinación cuantitativa de Hg en varios tipos de muestras, por su sensibilidad y selectividad. Es una técnica relativamente económica y accesible en el Laboratorio Analítico, aún en aquellos que realizan análisis de servicios.

Sin embargo, la determinación directa de metales a concentraciones del orden de trazas y ultratrazas presenta dificultades asociadas como: i) posibles interferencias de la matriz, y, ii) sensibilidad insuficiente de la técnica. Es por ello

que la separación y preconcentración es fundamental para obtener límites de detección adecuados a las necesidades ambientales actuales.

En el Capítulo 4 se utilizó la AAS para la determinación de Cu, la técnica está fundamentada en la capacidad que tienen los elementos, en su estado atómico basal, de absorber radiación electromagnética a longitudes de onda específicas para cada elemento. La cantidad de energía absorbida es directamente proporcional a la concentración de los átomos del metal analizado, de acuerdo con la Ley de Lambert-Beer. Para generar el Hg en estado elemental se hace uso de la volatilidad del Hg. El vapor de  $\text{Hg}^0$  se forma por la reducción mediada por un agente reductor como el  $\text{SnCl}_2$  o  $\text{NaBH}_4$ . El Hg metálico así originado es arrastrado por un gas hacia el camino óptico del aparato donde ocurre la interacción con la radiación, produciéndose la absorción.

En este capítulo se utiliza la separación en fase sólida para separar y preconcentrar el Hg(II), seguido de la generación del vapor frío para luego realizar la cuantificación por AAS. Toda la metodología se realiza en línea, minimizando la manipulación y potencial contaminación de la muestra y disminuyendo los tiempos de análisis.

### **3. Materiales, reactivos e instrumentos utilizados**

En la Tabla 1 se describen los materiales, reactivos e instrumentos utilizados.

<b>Material/Reactivo Instrumento</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Características</b>
Agua destilada y desionizada (DDW)	Barnstead	Obtenida por sistema mixto de intercambio iónico
Bomba Peristáltica	Gilson	Minipuls <sup>®</sup> 3 Resistente a los productos químicos, de alto caudal, multicanal
Epolene <sup>®</sup>	Eastman Chemical Products, Inc.	Cera de polietileno de bajo peso molecular
Espectrómetro de Absorción Atómica	PerkinElmer	AAAnalyst 200, con celda de cuarzo, manta de calentamiento eléctrica
Filtros de jeringa de PDVF	Waters Corp.	0,45 µm tamaño de poro
HNO <sub>3</sub>	Baker	Para análisis 69-70%
HCl	Merck	Para análisis 37%
Lámpara de Hg de descarga sin electrodos (EDL)	PerkinElmer	
Equipo de dispersión de rayo láser	Malvern Instruments Ltd.	Mastersizer 2000
Mangueras de Tygon	Ismatec	d.i.: 1,52; 1,14 mm Resistente a ácidos
Sistema de Análisis por Inyección en Línea	PerkinElmer	FIAS 100
Solución de Hg(II) 1000 mg l <sup>-1</sup>	Merck	Solución comercial estándar
Solución NaBH <sub>4</sub> 0,2 % (m/v)	Merck	Estabilizada en NaOH 0,1% (m/v), filtrada con papel N° 42 Whatman

Tabla 1. Materiales, reactivos e instrumentos.

## 4. Metodología utilizada

### 4.1. Materiales y métodos

Se utilizó un espectrómetro PerkinElmer AAnalyst 200 con celda de cuarzo y manta de calentamiento eléctrica. El equipo está provisto de un sistema de inyección de muestra en línea (PerkinElmer FIAS 100) acoplado al espectrómetro. El separador gas-líquido es de tipo modular fabricado en un plástico con alta resistencia química y una membrana de PTFE intercambiable. Para complementar el sistema FIAS se utilizó una bomba peristáltica adicional, Minipuls 3 de Gilson. Las conexiones entre los distintos componentes se realizaron con tubos de Teflón<sup>®</sup> de 1,0 mm (d.i.). La muestra y los diferentes reactivos utilizados se condujeron a través de mangueras de Tygon<sup>®</sup> con diámetros internos de 1,52 mm para los reactivos y eluyente y de 1,14 mm para el reductor y la muestra.

Se utilizó una lámpara de descarga sin electrodos (PerkinElmer) con una corriente de 190 mA y a una longitud de onda de 253,7 nm, paso de banda espectral de 0,7 nm. Las EDL están formadas por un tubo de cuarzo herméticamente cerrado que contiene un gas inerte, como el argón, a unos pocos torr y una pequeña cantidad del metal (o su sal) cuyo espectro se desea obtener. Producen intensidades radiantes que son uno o dos órdenes de magnitud superiores a las lámparas de cátodo hueco.

Todo el material utilizado para contener soluciones, tanto de vidrio como de plástico, se lavó con DDW, se dejó en remojo con HNO<sub>3</sub> 10% v/v durante 24 h y finalmente se enjuagó varias veces con DDW. Todas las muestras y estándares se conservaron en botellas de polietileno (50 ml) o tubos Falcon<sup>®</sup> a pH < 2 con HNO<sub>3</sub>, refrigeradas (2 °C) según las recomendaciones de la EPA para la conservación y almacenamiento de muestras de agua [Code of Federal Regulations, 1984].

Se utilizaron soluciones estándares comerciales de Hg de 1000 mg l<sup>-1</sup> (Merck) y se realizaron diariamente todas las diluciones necesarias. Los reactivos utilizados son de calidad analítica, la solución de NaBH<sub>4</sub> se preparó diariamente por disolución en DDW y se estabilizó con NaOH al 0,1% (m/v). Luego de disolución completa se filtró con papel Whatman N° 42 para eliminar turbidez.

## 4.2. Condiciones de operación

En la Tabla 2 se presentan las condiciones de operación del equipo de CV AAS.

<b>Parámetros instrumentales</b>	
Temperatura de celda	110 °C
Corriente de la lámpara	190 mA
Señal registrada	área de pico
Ancho de rendija	0,7 nm
Longitud de onda	253,7 nm
<b>Generación de vapor</b>	
Concentración de NaBH <sub>4</sub>	0,2% (m/v); NaOH 0,1% (m/v)
Caudal de NaBH <sub>4</sub>	5,5 ml min <sup>-1</sup>
Caudal de HCl	10 ml min <sup>-1</sup>
Concentración de HCl	15% (v/v)
Caudal de N <sub>2</sub>	30 ml min <sup>-1</sup>

Tabla 2. Parámetros de operación.

## 4.3. Preparación de la microcolumna

Se realizaron pruebas preliminares utilizando como sustrato los MWCNT-COOH que se obtuvieron del proceso de oxidación desarrollado en el Capítulo 3. Los resultados obtenidos mostraron que los nanotubos oxidados poseen una elevada afinidad por el Hg(II). Esta gran afinidad hizo posible el procesamiento de un gran volumen de muestra, lo cual impacta directamente en el factor de enriquecimiento (FE) [Arpadjan, S. y col. 1997]. Sin embargo, a medida que se

incrementó el volumen procesado se detectaron problemas de compactación de la columna. Luego de muchos ciclos, se observó una sobrepresión en el sistema que no permitía continuar con el procesamiento de las muestras.

Para resolver esta dificultad se probaron diferentes sustancias inertes que se mezclaron con los MWCNT-COOH. La variedad de sustancias que se probaron difieren en sus características fisicoquímicas como la capacidad de retención hacia especies cargadas (resinas de intercambio, esferas de vidrio de poro controlado), la morfología y los tamaños.

Luego de varias pruebas se encontró que los mejores resultados se obtenían cuando se agregaba al sustrato otro producto que impidiera la compactación. Para ello, se agregó al relleno pequeñas escamas de cera de polietileno de bajo peso molecular llamada Epolene<sup>®</sup>. Las pruebas se realizaron rellenando microcolumnas con una mezcla de nanotubos:Epolene<sup>®</sup> en diferentes relaciones. La gran afinidad que presentan los nanotubos oxidados por el Hg(II) permitió probar su desempeño utilizando una muy baja cantidad de MWCNT-COOH. Se encontraron buenos resultados al rellenar microcolumnas con tan solo ~1 mg de MWCNT-COOH y 10 mg de Epolene<sup>®</sup>. Las dimensiones de la microcolumna también se optimizaron ensayando diferentes longitudes y diámetros. Se buscó la menor cantidad de sustrato y las menores dimensiones que permitieran el cómodo pasaje de las soluciones y mostraran buenos resultados de retención. Finalmente, la mezcla optimizada (MWCNT-COOH:Epolene<sup>®</sup> 1:10) se utilizó en una microcolumna fabricada especialmente en acrílico de 20 mm de longitud, 2,25 mm de diámetro interno y 5,5 mm de longitud útil. El volumen nominal de la microcolumna es de ~22  $\mu\text{L}$  y se rellenó por el método de empaquetamiento en seco.

#### 4.4. Procedimiento general

Se presenta de manera esquemática el procedimiento llevado a cabo para realizar las optimizaciones del sistema. Es una visión esquemática para poder comprender como se han realizado las optimizaciones. El sistema utilizado permite optimizar los diferentes parámetros analíticos, por ejemplo, es posible evaluar distintas microcolumnas colocándolas en el sistema mediante las mangueras y conectores correspondientes, también se varían los caudales de carga y elución variando los parámetros del software del equipo o en forma manual en el caso de la bomba de carga externa.

En todos los casos, las soluciones de carga se ajustaron a los pHs seleccionados y se hicieron pasar a través de la microcolumna utilizando la bomba peristáltica externa. El diseño experimental utilizado para la carga y la elución de la muestra se encuentra esquematizado en la Figura 1. Se comienza acondicionando la microcolumna con una solución de igual pH que la solución que contiene al analito, luego se realiza la carga de la muestra conteniendo al Hg(II) utilizando en ambos casos la bomba 1. Este proceso se realiza colocando la válvula del FIAS en la posición de carga. Para el proceso de elución se coloca la válvula del FIAS en posición de elución y se utiliza la bomba 2 para impulsar el eluyente y el reductor. La elución se realiza con HCl con un caudal optimizado de  $10 \text{ ml min}^{-1}$ . Seguidamente el analito se introduce en el equipo (CV AAS). Para finalizar, la microcolumna se regenera haciendo pasar i) 0,5 ml de una solución de HCl 15% v/v ii) 2 ml de DDW y se vuelve a utilizar iniciándose un nuevo ciclo. El esquema de lavado del sistema y regeneración de la microcolumna propuesto es el resultado de sucesivas pruebas que permitieron encontrar los volúmenes mínimos para los cuales se obtenía la completa limpieza del sistema.

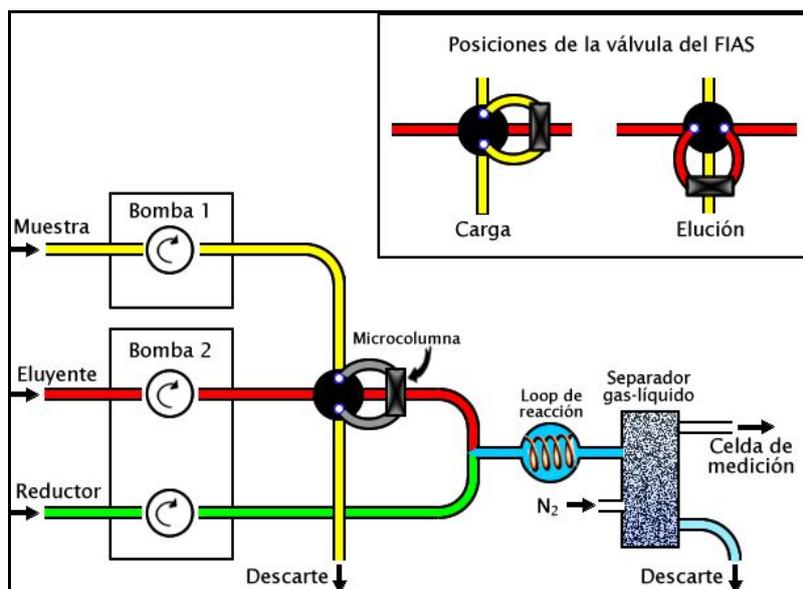


Figura 1. Diseño experimental utilizado.

#### 4.5. Características y tratamiento de las muestras a analizar

Cuando se analiza Hg en aguas naturales es necesario considerar la posibilidad de encontrarlo en dos formas, inorgánica y orgánica. Como la metodología desarrollada fue diseñada para la determinación de Hg total fue preciso realizar un precondicionamiento de las muestras reales. Existen procedimientos reportados en la bibliografía donde se utilizan diferentes agentes y mezclas oxidantes [Welz, B. y col. 1992, Capelo, J. L. y col. 2000 y Wuilloud, J.C.A. y col. 2002]. En este trabajo se utilizó la fotooxidación de los posibles compuestos orgánicos de Hg mediante la irradiación de las muestras durante 0,5 h con una lámpara UV de 78 W.

Las muestras de agua que se analizaron fueron recolectadas en diversos lugares de la República Argentina y con distintas procedencias: agua de río, agua de mar, aguas en cercanías de actividades mineras y efluentes de plantas de tratamiento. Además, se incluyó para su análisis agua recolectada en la Antártida. Esta muestra de agua fue obtenida en la Estación Carlini (ex. Jubany), en la isla 25 de Mayo (62° 14' 18" S 58° 40' 0" O).

Luego de la recolección, las muestras se colocaron en botellas de polietilentereftalato (PET), previamente sometidas a un proceso de limpieza con HNO<sub>3</sub> 10% (v/v) y las muestras de agua de la Antártida, en tubos de Teflón®. La utilización de estos envases se decidió en base a los estudios de Fadini, P. S. y Jardim, W. F.; en ellos se reportan niveles no detectables de contaminación, tanto por lixiviado del material del envase como por pérdida de metales cuando se utilizaron envases de PET y Teflón® para la recolección y almacenamiento de Hg previo a su detección [Fadini, P. S. y col. 2000]. Previo a su análisis las muestras de agua de río, de mar y efluentes se filtraron con filtros de jeringa de PVDF de 0,45 µm de tamaño de poro. El pH de las muestras se ajustó antes de comenzar cada ciclo de preconcentración.

#### **4.6. Optimización de variables**

##### 4.6.1. Características de la microcolumna y material de relleno

En el punto 4.3. Preparación de la microcolumna se analizaron las características de las microcolumnas ensayadas y los materiales de relleno estudiados. Como resultado, la cera de polietileno de bajo peso molecular llamada comercialmente Epolene® fue seleccionada por su eficaz comportamiento, evitando la aglomeración de los nanotubos. En cuanto a sus características, esta cera presenta buena estabilidad térmica y muy buena compatibilidad química frente a ácidos minerales. Asimismo, si bien es conocido que el polietileno es un material sumamente inerte, se verificó que su presencia no modificase el proceso de retención de Hg(II). Para realizar esta verificación se rellenó una microcolumna con ~10 mg solamente de Epolene® y se colocó en el sistema de preconcentración. Como resultado de la elución no se detectó señal de Hg(II) asegurándonos de esta forma que en la retención del Hg(II) solo tienen participación los MWCNT-COOH.

Para complementar la información sobre la cera de polietileno se estudió el tamaño y la distribución de las partículas de Epolene<sup>®</sup> por dispersión de rayo láser, encontrándose que el ~75% de las partículas tienen un diámetro de ~800  $\mu\text{m}$  con una importante dispersión en el tamaño y forma de partícula lo que contribuye a evitar la agregación de los MWCNT-COOH. Se realizaron cinco medidas consecutivas de dos muestras y se promediaron los resultados utilizando un equipo Mastersizer 2000<sup>®</sup>. En la Figura 2 se presenta el gráfico obtenido observándose el porcentaje en volumen acumulativo versus el tamaño de partícula. No se detectaron partículas por debajo del micrómetro en las muestras analizadas en el Laboratorio Control Químico y Físico del Departamento de Combustibles de la CNEA.

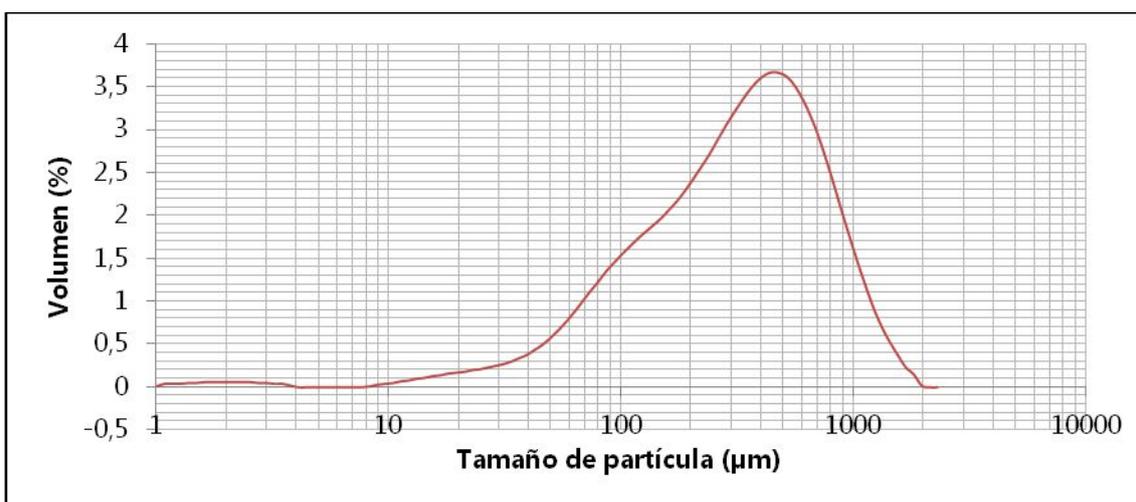


Figura 2. Distribución del tamaño de las partículas del Epolene<sup>®</sup>.

En la Figura 3 se presentan imágenes SEM donde puede observarse la morfología de la cera de polietileno. En el análisis por dispersión láser se observa la dispersión de tamaños y en las imágenes SEM es posible apreciar la irregularidad en las formas.

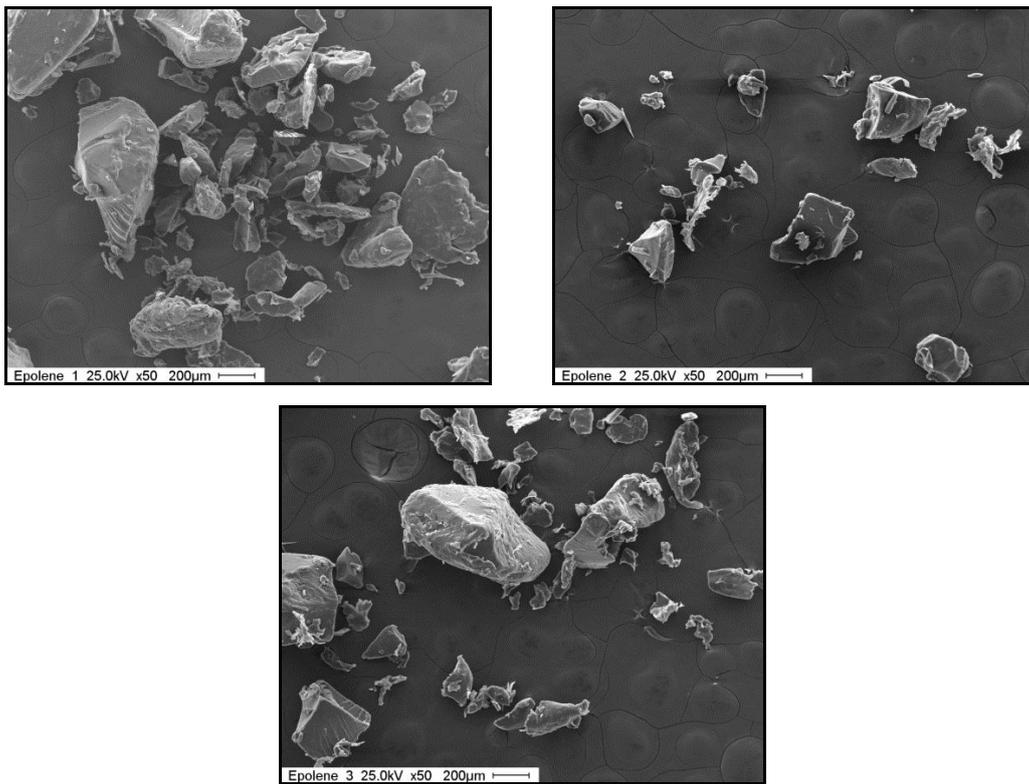


Figura 3. Imágenes SEM de las partículas de Epolene®.

También se observaron mezclas de MWCNT-COOH con Epolene® encontrándose manojos de nanotubos sobre las partículas de polietileno (Figura 4).

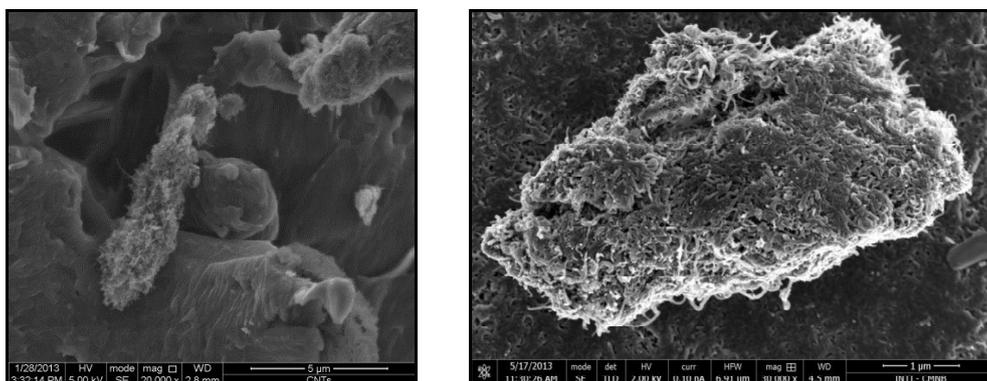


Figura 4. Imágenes SEM de la mezcla MWCNT-COOH / Epolene®.

Luego de utilizarse la microcolumna durante 450 ciclos de preconcentración / elución y limpieza, la mezcla se retiró de la microcolumna, se secó y se observó nuevamente al SEM para poder evaluar la integridad estructural de los nanotubos. En la Figura 5 se observan las imágenes obtenidas, las cuales reflejan la conservación de la estructura de los nanotubos.

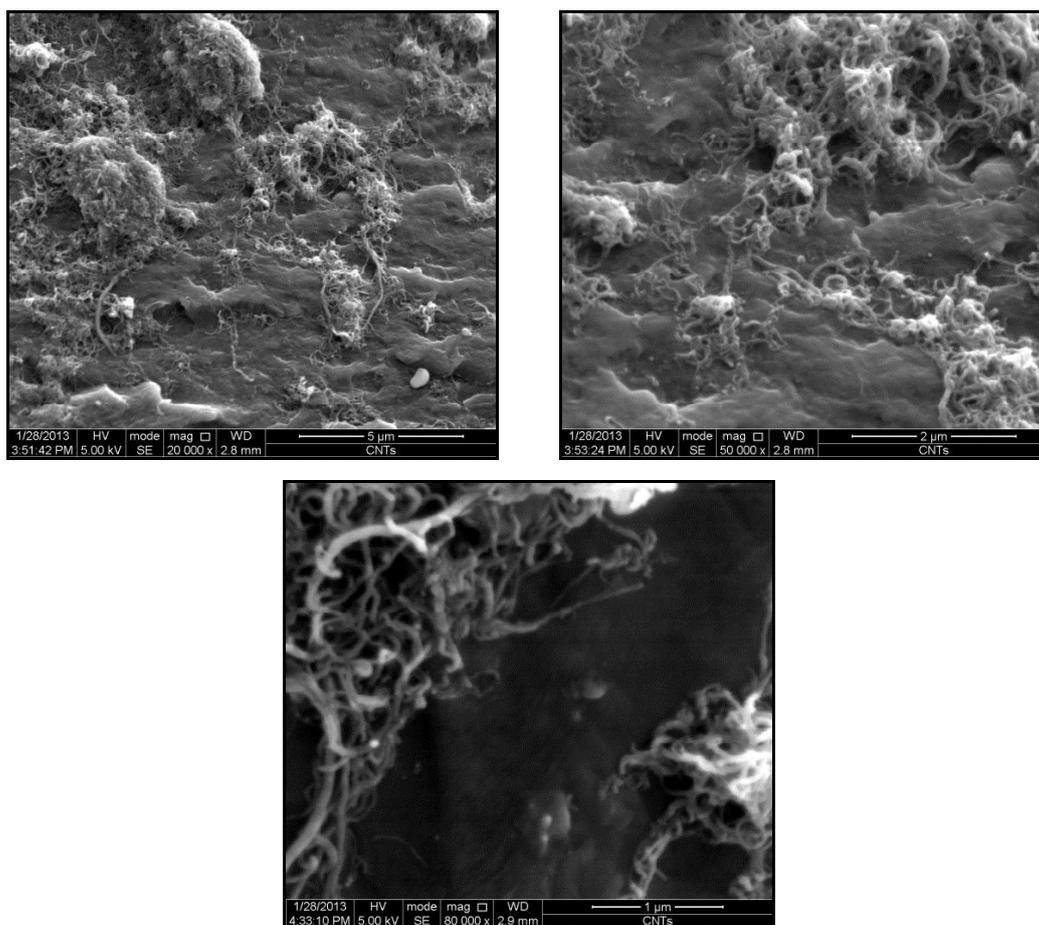


Figura 5. Imágenes a distinta magnificación de los MWCNT-COOH extendidos sobre las partículas de Epolene®.

#### 4.6.2. Efecto del pH

Como ya se ha mencionado en capítulos anteriores, el valor del pH de la solución de carga tiene un rol fundamental en la retención de especies cargadas sobre la superficie de los MWCNT-COOH [Gil, R. A. y col 2007, Datsyuk, V. 2008]. Cuando el pH de la solución es mayor que el punto isoeléctrico de los MWCNT-

COOH, la carga negativa de la superficie favorece las interacciones electrostáticas para la adsorción de cationes. La disminución en el pH lleva a la neutralización de la carga de la superficie con lo cual la retención de cationes sobre la superficie de los MWCNT-COOH disminuye rápidamente.

Se evaluó el efecto del pH en el rango comprendido entre 1,0 y 9,0 con 4 ml de soluciones de Hg(II) de  $5 \mu\text{g l}^{-1}$ . Las muestras preparadas se preconcentraron y analizaron con la metodología descrita en 4.4. Se hizo atravesar la solución por la microcolumna con un caudal de carga de  $1,7 \text{ ml min}^{-1}$ . Se utilizó el área de pico para evaluar la señal producida por las diferentes soluciones. En la Figura 6 se presentan los resultados obtenidos del proceso de retención/elución. Se encontró que la retención máxima de Hg(II) se consigue en pHs cercanos a 5. Por encima de este pH la señal de Hg(II) disminuye significativamente. A pHs superiores a 8, el descenso de la retención se puede atribuir a la hidrólisis del metal y a muy bajos pHs a la competencia del metal con los protones por los sitios de unión. De acuerdo a los resultados obtenidos se eligió el pH 5 como el adecuado para los siguientes experimentos.

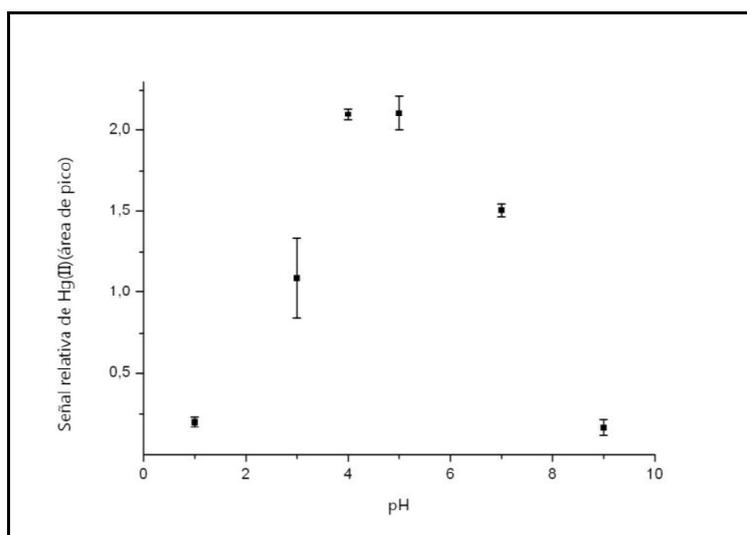


Figura 6. Efecto del pH en la retención de Hg(II) utilizando MWCNT-COOH como sustrato.

#### 4.6.3. Efecto de la concentración del eluyente

Se seleccionó el HCl como eluyente para producir la desorción del Hg(II) retenido en la microcolumna. La elección de este ácido se basó a que por un lado, ocurre el intercambio entre el analito y los  $H^+$ , y al mismo tiempo los iones cloruro pueden interactuar con el Hg(II) removido mediante la formación de  $HgCl_2$  y mejorar la elución [Pillay, K. y col. 2013].

Se estudió la capacidad de elución del HCl en un amplio rango de concentraciones, entre 1 y 20% (v/v). Tal como puede observarse en la Figura 7 la máxima señal se alcanza al eluir con HCl 15% (v/v).

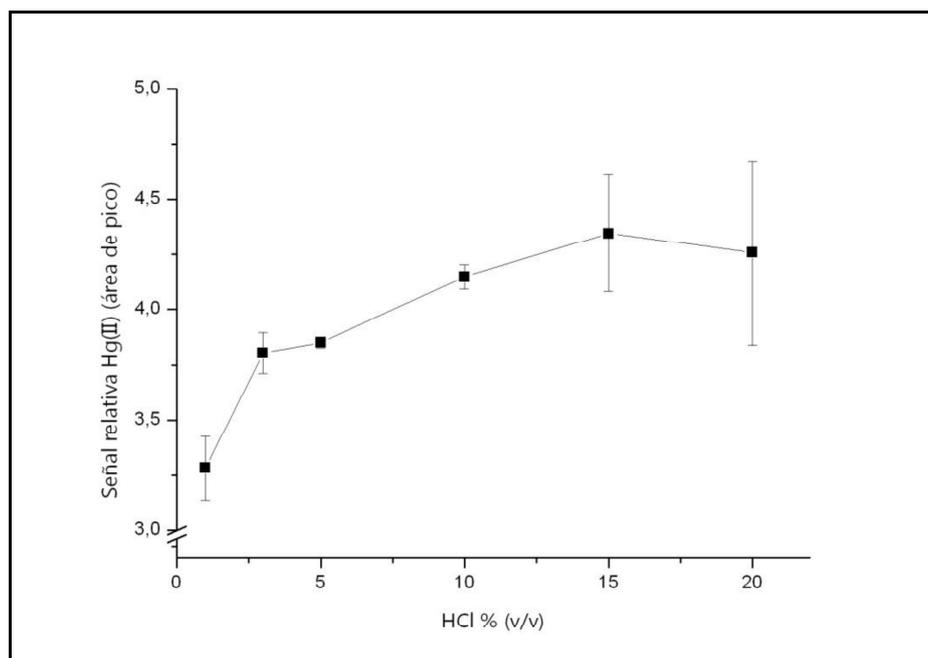


Figura 7. Efecto de la concentración de eluyente.

#### 4.6.4. Efecto del caudal de carga y elución

Los caudales de carga y elución son cuidadosamente estudiados en los sistemas en línea buscando optimizar la sensibilidad del método y el factor de preconcentración. La velocidad con la que la muestra atraviesa la microcolumna, caudal de carga, tiene impacto directo en el tiempo de análisis y determina el tiempo en el cual debe ocurrir la retención, es decir, el tiempo de contacto entre

el analito y los sitios activos del material sorbente. El efecto del caudal de carga en la señal de Hg se estudió entre 0,5 y 2,7 ml min<sup>-1</sup> mientras que el caudal de elución se mantuvo constante en 10 ml min<sup>-1</sup>. En la Figura 8 se observan los resultados obtenidos. La señal aumenta hasta alcanzar un máximo en 1,7 ml min<sup>-1</sup> y luego disminuye. Se observó una relación prácticamente lineal entre el aumento del caudal y la señal evidenciando una rápida transferencia de masa entre el analito y los MWCNT-COOH lo que asegura una retención eficiente del analito. Esto es una gran ventaja a resaltar en este tipo de estudios porque hace posible obtener elevados factores de enriquecimiento durante el procesamiento de muestras. El caudal optimizado en 1,7 ml min<sup>-1</sup> es suficiente para obtener un consumo de muestra razonable. Asimismo, no fue necesario trabajar con caudales inferiores ya que no se observó una sobrepresión en el sistema.

La influencia del caudal de elución se estudió entre 6,5 ml min<sup>-1</sup> y 10 ml min<sup>-1</sup> que son los rangos admisibles por el equipo de CV AAS. En el rango estudiado no se encontraron diferencias significativas en el proceso de desorción y detección, por lo tanto el caudal se utilizó en 10 ml min<sup>-1</sup>.

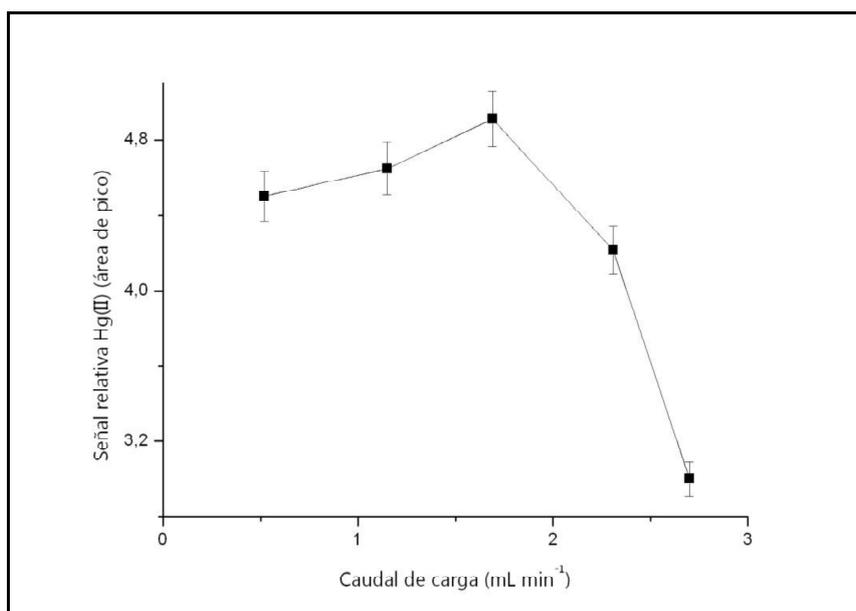


Figura 8. Influencia del caudal de carga en la señal de Hg(II).

#### 4.6.5. Volumen de elución

Para calcular el volumen en el que se eluye el Hg(II) retenido se midió el tiempo en el que se observa la señal y se utilizó el caudal de elución optimizado para calcular el volumen. La experiencia se realizó cinco veces dando como resultado que el Hg(II) se eluye en 1,7 ml.

#### 4.6.6. Capacidad de retención de la microcolumna

Para realizar este estudio se diseñó una experiencia dinámica. Se utilizó una solución de  $100 \mu\text{g l}^{-1}$  de Hg(II) y se registró la señal en forma continua. Se utilizó una microcolumna de 35 mm de largo y 3 mm de d.i. que permitió utilizar una mayor cantidad de sorbente. Para rellenarla se utilizaron 10 mg de MWCNT-COOH y 60 mg de Epolene<sup>®</sup>. Al hacer pasar la solución de carga con el analito debería ocurrir que al alcanzar la máxima capacidad de retención la microcolumna no retenga más Hg y entonces la señal alcanzaría un valor constante e igual a la señal que se obtendría si no estuviese la columna en el sistema. Al procesar un elevado volumen de muestra, de 250 ml (más de 2 horas) sin conseguir saturar la microcolumna se detuvo el experimento. Volúmenes o tiempos mayores no tienen sentido práctico.

Entonces, se incrementó la concentración de la solución de carga a  $800 \mu\text{g l}^{-1}$  de Hg(II) y luego de 40 minutos se detuvo la experiencia obteniéndose el 14% de la señal que debería obtenerse para alcanzar la saturación.

Estos resultados son el reflejo de la gran capacidad que tienen los MWCNT-COOH para retener Hg(II).

Para poder calcular la capacidad de retención de Hg(II) por gramo de MWCNT-COOH se decidió utilizar una solución de  $3000 \mu\text{g l}^{-1}$  de Hg(II) y un volumen de 20 ml. También se redujo la dimensión de la microcolumna para utilizar una menor cantidad de MWCNT-COOH (25 mm totales, 10 mm de largo útil, y 2,25 mm de d.i.). La columna se rellenó con 2,1 mg de MWCNT-COOH y

20,7 mg de Epolene<sup>®</sup>. En la Figura 9 se presenta el resultado del experimento que permitió calcular la capacidad de retención y obtener un valor de 3,2 mg de Hg(II) retenido por gramo de MWCNT-COOH. Sin embargo, considerando el valor máximo de absorbancia alcanzado y comparándolo con el valor de absorbancia de una muestra de 3000  $\mu\text{g l}^{-1}$  de Hg(II) que se midió sin el sistema de preconcentración, el porcentaje de saturación de la columna es del 90%.

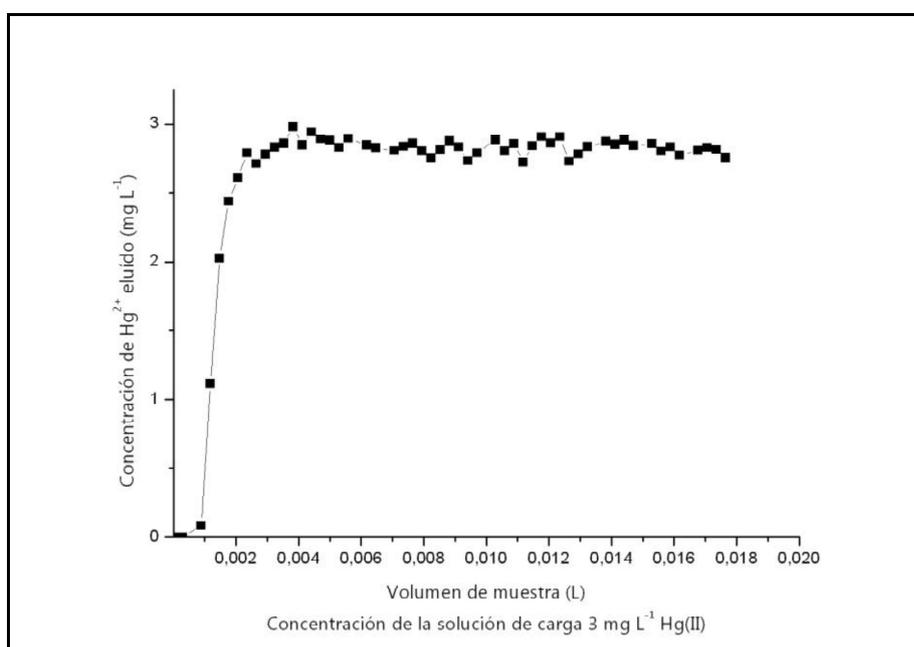


Figura 9. Curva de experimento de capacidad de retención dinámica para obtener la capacidad de retención de Hg(II) de los MWCNT-COOH.

#### 4.7. Capacidad de re-utilización de la microcolumna

Como se mencionó en 4.4. Procedimiento general, se estudió la estabilidad y regeneración de la microcolumna. Se encontró que para poder re-utilizar la columna es necesario regenerarla con 0,5 ml de HCl 15% (v/v) y luego 2 ml de DDW. Con este tratamiento la columna se mantuvo estable y sin detrimento de la señal de Hg(II). Durante este estudio la columna se utilizó en

más de 450 ciclos de preconcentración / elución sin evidenciar signos de deterioro en su capacidad.

## 5. Efecto de iones concomitantes

La determinación de Hg puede verse afectada por la presencia de metales de transición y elementos capaces de formar hidruros. Por este motivo se evaluó la potencial interferencia de distintas especies metálicas. Se estudió el efecto de iones como el Cd, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni y Zn en la generación del vapor de Hg ya que estos elementos compiten con el analito durante la reducción y catalizan la descomposición del NaBH<sub>4</sub>. También se evaluaron como posibles interferentes a aquellos capaces de formar hidruros volátiles (Grupos 14, 15 y 16).

Los estudios de interferencias se realizaron en las condiciones optimizadas. Las variaciones superiores al  $\pm 5\%$  en la señal de Hg debido a la presencia de otros iones se consideraron como interferencia. Las muestras analizadas contienen  $5 \mu\text{g l}^{-1}$  de Hg(II) y los resultados informados son el promedio de tres mediciones. Los resultados se presentan en la Tabla 3. Se observaron efectos de aumento de señal en presencia de Bi y Mn mientras que la presencia de As, Al, Fe, Mo y Sb mostraron una disminución de la señal de Hg (<11,5 en todos los casos).

Elemento	Concentración de interferente (mg l <sup>-1</sup> )	% variación
Al (III)	10	-11,0
As (III)	5	-10,4
Bi (III)	5	11
Cd (II)	5	0
Cu (II)	10	0
Fe (III)	10	-11
Mn (II)	10	9,7
Mo (VI)	5	-11,1
Ni (II)	5	0
Pb (II)	5	0
Sb (III)	10	-10,2
Se (IV)	10	0
Sn (II)	10	0
Zn (II)	10	0

Tabla 3. Interferencias de metales pesados y elementos formadores de hidruros en la determinación de Hg(II).

## 6. Desempeño analítico

Se estudió la repetibilidad, entendida como la desviación relativa estándar de 10 muestras utilizando el método de preconcentración/detección con los parámetros optimizados hallándose un valor de 1,6% (RSD). Al realizarse 10 mediciones independiente de un blanco (criterio de  $3\sigma$ , es decir 3 veces el valor del desvío estándar) se obtuvo un límite de detección (LOD) de 0,29  $\mu\text{g l}^{-1}$ . El límite de cuantificación (LOQ) obtenido es de 0,97  $\mu\text{g l}^{-1}$ . Estos valores se obtienen teniendo en cuenta la pendiente de la recta de calibración del sistema con preconcentración para un volumen de muestra de 2 ml. El factor de preconcentración se obtuvo de la relación entre las pendientes de las curvas de

calibración sin y con preconcentración. Para un volumen tan bajo como 2 ml de muestra se obtuvo un factor de preconcentración de 4. El factor de enriquecimiento (FE), entendido como la relación entre el volumen de muestra retenido cuantitativamente y el volumen de elución es 30 [Arpadjan, S. y col. 1997]. Este valor es estimativo y se obtuvo de un video donde se registró la experiencia dinámica de saturación de columna con una solución de  $400 \mu\text{g l}^{-1}$ . Luego de cargar 52 ml de muestra no se detectó pérdida en la columna y se tomó ese valor como volumen máximo.

El límite de detección que es posible alcanzar con esta metodología está íntimamente relacionado con el volumen de muestra y su concentración. Al atravesar la columna un mayor volumen de una dada concentración de Hg, la masa de analito retenida por la columna es mayor obteniéndose un aumento de señal. Si se construyese una curva de calibración con este nuevo volumen, la pendiente obtenida sería mayor. Para verificar esto, se calculó el LOD de la misma forma pero utilizando un volumen de muestra de 4 ml y se obtuvo un LOD de  $0,18 \mu\text{g l}^{-1}$ . Es por ello que es posible disminuir el LOD haciendo pasar un mayor volumen de muestra. Para estimar el volumen máximo se utilizó el experimento dinámico que se realizó con la solución de  $400 \mu\text{g l}^{-1}$ , se analizó el video y se obtuvo el volumen para el cual la lectura de la señal es menor al 5% de la señal que se obtendría si la columna no estuviese, considerándose que hasta esa masa de analito la retención es cuantitativa. La muestra con un volumen de 52 ml fue retenida cuantitativamente. La experiencia se detuvo en ese punto por lo tanto es posible incrementar ese volumen a ese nivel de concentración y si se utilizara una solución con una concentración menor el volumen sería muchísimo mayor.

La linealidad se estudió entre valores cercanos al LOD y  $25 \mu\text{g l}^{-1}$  obteniéndose un coeficiente de correlación de  $R^2 = 0,998$  utilizando 2 ml de muestra.

La cantidad de muestras que pueden procesarse depende esencialmente del volumen de muestra en la cual se quiera determinar al analito. El tiempo necesario para preconcentrar 2 ml de muestra a  $1,7 \text{ ml min}^{-1}$ , utilizando un caudal de elución de  $10 \text{ ml min}^{-1}$  considerando el tiempo de adquisición/lectura de muestra y acondicionamiento es de aproximadamente 3 min, por consiguiente es posible procesar 20 muestras por hora.

El material de referencia disponible en el Laboratorio, SLRS-5 (Material de referencia para agua de río, NRCC, Ottawa, Canadá) no reporta valores certificados para Hg. Por este motivo y para poder evaluar el método se hicieron estudios de recuperación. Para estos estudios se realizaron adiciones estándar de distintas concentraciones de Hg(II) a diferentes muestras reales de agua y se procesaron con la metodología optimizada. Se realizaron agregados de  $500 \mu\text{l}$  de distintas concentraciones de Hg(II) a 2 ml de muestra y se preconcentraron en línea con el método desarrollado. Se registraron las concentraciones recuperadas en función de las concentraciones agregadas. En promedio se obtuvieron recuperaciones en el rango del 96 al 103%. En la Tabla 4 se observan los resultados obtenidos del estudio de recuperación realizado para diferentes tipos de aguas.

<b>Muestra</b>	<b>Cantidad de Hg agregado (<math>\mu\text{g l}^{-1}</math>)</b>	<b>Hg encontrado</b>	<b>% de Recuperación</b>
Agua CRM-SLRS-5	2,0	1,94±0,03	97
Agua Potable Capilla del Señor de la canilla	1,5	1,52±0,02	101
Agua Potable Pcia. Córdoba	1,2	1,22±0,02	101
Agua de pozo de Monte Grande	1,0	1,05±0,02	105
Agua de pozo de Castelar	2,0	1,92±0,03	96
Agua de la Antártida (Estación Carlini)	1,5	1,54±0,03	103

Tabla 4. Estudio de recuperación para los distintos tipos de aguas.

## 7. Análisis de aguas naturales

Las muestras de agua recolectadas se analizaron con la metodología de preconcentración propuesta y desarrollada en 4.4. Procedimiento general (volumen de muestra 10 ml, LOD 70 ng l<sup>-1</sup>). En la mayoría de las muestras analizadas los niveles de Hg(II) se encontraron por debajo del límite de detección. En cuatro de las muestras analizadas se encontraron niveles de ng l<sup>-1</sup> de Hg(II): muestra de agua de mar de Mar del Plata 330±8, muestra de río de la Pcia. de Bs. As. 85±2, muestra de un efluente municipal de la Pcia. de Bs. As. 342±8 y una muestra de efluente en una zona con actividad minera en la Pcia. de Córdoba 514±10. La concentración de Hg(II) en estas muestras fue obtenida mediante la técnica de adición estándar con tres replicados.

## 8. Conclusiones

Los resultados obtenidos permiten utilizar adecuadamente los MWCNT-COOH como relleno de microcolumnas en sistemas de preconcentración en línea en combinación con la técnica de CV AAS para la determinación de Hg(II) en aguas en niveles de  $\text{ng l}^{-1}$ . La etapa de preconcentración es crucial para la determinación de Hg(II) en aguas naturales debido a su presencia en niveles extremadamente bajos y los MWCNT-COOH demostraron ser sorbentes muy eficientes. La etapa de preconcentración desarrollada permite el análisis por CV AAS que es un equipamiento disponible en laboratorios de mediana complejidad.

La mezcla de MWCNT-COOH con la cera de polietileno de bajo peso molecular resultó ser una alternativa sencilla y eficiente, sin necesidad de recurrir a procesos de inmovilización de los nanotubos, evitando la aglomeración de los mismos con la consecuente sobrepresión en el sistema en línea. Asimismo, la microcolumna presentó excelente estabilidad química y eficiente retención sin apreciar pérdidas de Hg(II) en el sistema para un volumen de 52 ml de muestra (solución de  $400 \mu\text{g l}^{-1}$ ) y un buen desempeño durante al menos 450 ciclos de preconcentración/elución.

La metodología desarrollada es medianamente rápida, simple y lo suficientemente sensible como para ser considerada una alternativa de menor costo frente a técnicas como ICP MS para el análisis de aguas con matrices complejas como agua de mar o efluentes.

## Referencias

Arpadjan, S., Vuchkova, L. y Kostadinova, E. (1997). Sorption of Arsenic, Bismuth, Mercury, Antimony, Selenium and Tin on Dithiocarbamate Loaded Polyurethane Foam as a Preconcentration Method for Their Determination in

- Water Samples by Simultaneous Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry and Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. *Analyst*, 122, 243-246.
- Burger, J., Stern, A. H. y Gochfeld, M. (2005). Mercury in commercial fish: optimizing individual choices to reduce risk. *Environ. Health Perspect.*, 113,266–271.
- Capelo, J. L., Lavilla, I. y Bendicho, C. (2000). Room Temperature Sonolysis-Based Advanced Oxidation Process for Degradation of Organomercurials: Application to Determination of Inorganic and Total Mercury in Waters by Flow Injection-Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry. *Anal. Chem.*, 2000, 72, 4979-4984.
- Capelo, J. L., dos Reis, C. D., Maduro, C. y Mota, A. (2004). Tandem focused ultrasound (TFU) combined with fast furnace analysis as an improved methodology for total mercury determination in human urine by electrothermal-atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 64, 217–223.
- Cooney, C.M. Mercury control costs drop. (2007). *Environ. Sci. Technol.*,41, 1061–1062.
- Datsyuk, V.,Kalyva, M., Pepagelis, K., Tasis, D., Siokou, A., Kallitsis, L. y Galiotis, C. (2008). Chemical oxidation of multiwalled carbon nanotubes. *Carbon*, 46, 833-840.
- Fadini, P. S. y Jardim, W. F. (2000). Storage of natural water samples for total and reactive mercury analysis in PET bottles. *Analyst*, 125, 549-551.
- Ferrua, N., Cerutti, S., Salonia, J., Olsina, R. y Martinez, L. (2007). On-line preconcentrationand determination of mercury in biological and environmental samples bycold vapor-atomic absorption spectrometry. *J. Hazard. Mater.*, 141, 693–699.

- Ghodbane, I. y Hamdaoui, O. (2008). Removal of mercury(II) from aqueous media using eucalyptus bark: Kinetic and equilibrium studies. *Journal of Hazardous Materials*, 160, 301-309.
- Gil, R. A., Pasini-Cabello, S., Takara, A., Smichowski, P., Olsina, R. y Martínez, L. D. (2007). A novel on-line preconcentration method for trace molybdenum determination by USN-ICP OES with biosorption on immobilized yeasts. *Microchem. J.*, 86, 156-160.
- Gilmour, C. C. y Henry, E. A. (1991). Mercury methylation in aquatic systems affected by acid deposition. *Environ. Pollut.*, 71, 131-169.
- Harada, M. (1995). Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Crit. Rev. Toxicol.*, 25, 1-24.
- IPCS (1989) Mercury — environmental aspects. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (Environmental Health Criteria 86).
- IPCS (1990) Methylmercury. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (Environmental Health Criteria 101).
- Jones, P. y Hardy, S. (1997). Development of a capillary electrophoretic method for the separation and determination of trace inorganic and organomercury species utilizing the formation of highly absorbing water soluble dithizone sulphonate complexes. *J. Chromatogr. A*, 765, 345-352.
- Karunasagar, D., Arunachalam, J. y Gangadharan, S. (1998). Development of a "collectand punch" cold vapour inductively coupled plasma mass spectrometric method for the direct determination of mercury at nanograms per litre levels. *J. Anal. At. Spectrom.*, 13, 679-682.
- Kojima, K. y Fujita, M. (1973). Summary of recent studies in Japan on methyl mercury poisoning. *Toxicology*. 1, 43-62.

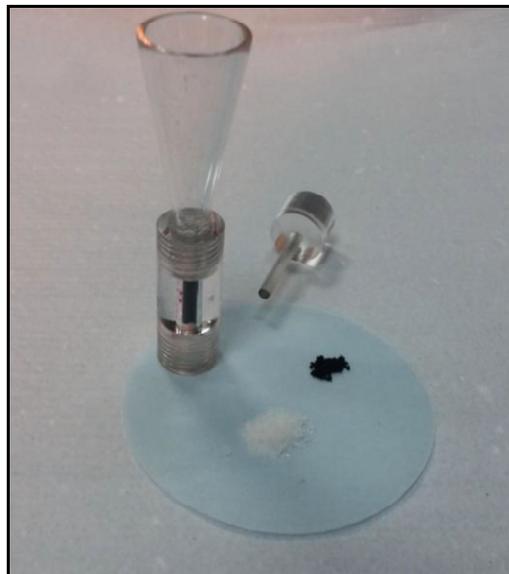
- Lamborg, C. H., Hammerschmidt, C. R., Bowman, K. L., Swarr, G. L., Munson, K. M., Ohnemus, D. C., y col. (2014). A global ocean inventory of anthropogenic mercury based on water column measurements. *Nature*, 512, 65–68.
- Leopold, K., Harwardt, L., Schuster, M. y Schlemmer, G. (2008). A new fully automated on-line digestion system for ultra trace analysis of mercury in natural waters by means of FI-CV-AFS. *Talanta*, 76, 382–388.
- Londonio, A., Fujiwara, F., Jiménez Rebagliati, R., Gómez, D. y Smichowski, P. (2012). Determination of mercury in size fractionated road dust samples by flow injection-cold vapor-atomic absorption spectrometry. *Microchem. J.*, 105, 77-82.
- Marguí, E., Kregsamer, P., Hidalgo, M., Tapias, J., Queralt, I. y Strelí, C. (2010). Analytical approaches for Hg determination in wastewater samples by means of total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Talanta*, 82, 821–827.
- Nabais, J. V., Carrott, P. J. M., Ribeiro Carrott, M. M. L., Belchior, M., Boavida, D., Dill, T. y Guryurtlu, R. (2006). Mercury removal from aqueous solution and flue-gas by adsorption on activated carbon fibres. *Appl. Surf. Sci.*, 252, 6046–6052.
- Okoronkwo, N. E., Igwe, J. C. y Okoronkwo, I. J. (2007). Environmental impacts of mercury and its detoxification from aqueous solution. *Afr. J. Biotechnol.*, 6, 335–340.
- Pacyna, E. G., Pacyna, J. M., Steenhuisen, F. y Wilson, S. (2006). Global anthropogenic mercury emission inventory for 2000. *Atmospheric Environment*, 40, 4048–4063.
- Pillay, K., Cukrowska, E.M. y Coville, N.J. (2013). Improved uptake of mercury by sulphur-containing carbon nanotubes. *Microchemical Journal*, 108, 124–130.
- Pyhtilä, H., Perämäki, P., Piispanen, J., Niemelä, M., Suoranta, T., Starr, M. y col. (2012). Development and optimization of a method for detecting low

- mercury concentrations in humic-rich natural water samples using a CV-ICP-MS technique. *Microchem. J.*, 103, 165–169.
- Ramamoorthy, S. y Miller, D. R. (1979). Removal of mercury and dimethyl mercury from wastewaters by sorption. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 22, 196–201.
- Required Containers, Preservation Techniques, and Holding Times. (1984). Code of Federal Regulations, Title 40, Part 136, 49 FR 43260; Part 264, 40 CFR 264.
- Rofouei, M. K., Sabouri, A., Ahmadalinezhad, A. y Ferdowsi, H. (2011). Solid phase extraction of ultra traces mercury (II) using octadecyl silica membrane disks modified by 1,3-bis(2-ethoxyphenyl)triazene (EPT) ligand and determination by cold vapor atomic absorption spectrometry. *J. Hazard. Mater.*, 192, 1358–1363.
- Sánchez, R., Snell, J., Held, A. y Emons, H. (2015). Development and validation of a method for mercury determination in seawater for the process control of a candidate certified reference material. *Anal. Bioanal. Chem.*, 407, 6569–6574.
- Tack, F. M. G., Vanhaesebroeck, T., Verloo, M. G., Rompaey, K. V. y Rannst, E. V. (2005). Mercury baseline levels in Flemish soils (Belgium). *Environ. Pollut.*, 134, 173-179.
- Torres, D. P., Vieira, A. M., Ribeiro, S. A. y Curtius, A. J. (2005). Determination of inorganic and total mercury in biological samples treated with tetramethylammonium hydroxide by cold vapor atomic absorption spectrometry using different temperatures in the quartz cell. *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 20, 289–294.
- UNEP, United Nations Environment Programme, Global Mercury Assessment 2013 Sources, Emissions, Releases and Environmental Transport, 2013.
- UNEP, United Nations Environment Programme, Global Mercury Assessment, 2002.

- US Environmental Protection Agency. National primary drinking water standards. Report EPA 816-F-01-007: Washington DC; 2001.
- Welz, B., Tsalev, D.L. y Sperling, M. (1992). On-line microwave sample pretreatment for the determination of mercury in water and urine by flow-injection cold-vapour atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 261, 91-103.
- World Health Organization, WHO Guidelines for Drinking-water Quality, Mercury in Drinking-water, Background document for development of WHO Guidelines.
- World Health Organization, WHO, Methylmercury, Environmental Health Criteria (EHC 101), WHO, Geneva, 1990, p. 143.
- Wood, J. M. y Wang, H. K. (1983). Microbial resistance to heavy metals. *Environmental Science and Technology*, 17, 82a–90a.
- Wuilloud, J. C. A., Wuilloud, R. G., Olsina, R. A. y Martinez, L. D. (2002). Separation and preconcentration of inorganic and organomercury species in water samples using a selective reagent and an anion exchange resin and determination by flow injection-cold vapor atomic absorption spectrometry. *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 17, 389–394.
- Zhao, Y., Zheng, J., Fang, L., Lin, Q., Wu, Y., Xue, Z. y col. (2012). Speciation analysis of mercury in natural water and fish samples by using capillary electrophoresis–inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta*, 89, 280–285.

## Capítulo 6

# MWCNT-pro para un analito poco estudiado como el Bismuto



En este capítulo se evalúa la capacidad de los nanotubos de carbono funcionalizados con L-prolina para la retención y preconcentración de Bi(III) y posterior determinación en diferentes tipos de aguas a niveles de  $\text{ng l}^{-1}$ , aportando información sobre este analito poco conocido.

### Abreviaturas

<i>AFS</i>	Atomic fluorescence spectrometry (Espectrometría de fluorescencia atómica)
<i>ANOVA</i>	Análisis de la varianza
<i>ASV</i>	Adsorptive stripping voltammetry (Voltamperometría de redisolución anódica de adsorción)
<i>DDW</i>	Double distilled water (Agua destilada y desionizada)
<i>ET-AAS</i>	Electrothermal atomic absorption spectrometry (Espectrometría de absorción atómica electrotérmica)
<i>HG</i>	Hydride generation (Generación de hidruros)
<i>FAAS</i>	Flame atomic absorption spectrometry (Espectrometría de absorción atómica con llama)
<i>FE</i>	Factor de enriquecimiento
<i>FIAS</i>	Flow injection analysis system (Sistema de inyección en línea)
<i>FI HG AAS</i>	Flow injection-hydride generation-atomic absorption spectrometry (Espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros en línea)
<i>GF AAS</i>	Graphite furnace atomic absorption spectrometry (Espectrometría de absorción atómica con horno de grafito)
<i>ICP</i>	Inductively coupled plasma (Fuente de plasma acoplada inductivamente)
<i>ICP MS</i>	Inductively coupled plasma mass spectrometry (Espectrometría de masas con fuente de plasma acoplado inductivamente)

<i>ICP OES</i>	Inductively coupled plasma optical emission spectrometry (Espectrometría de Emisión Óptica con fuente de Plasma Acoplado Inductivamente)
<i>LOD</i>	Limit of detection (Límite de detección)
<i>MWCNTs</i>	Multi-walled carbon nanotubes (Nanotubos de carbono de pared múltiple)
<i>MWCNT-COOH</i>	Nanotubos de carbono de pared múltiple oxidados
<i>MWCNT-pro</i>	Nanotubos de carbono de pared múltiple funcionalizados con L-prolina
<i>NaBH<sub>4</sub></i>	Borohidruro de sodio
<i>PET</i>	Polietilentereftalato
<i>PTFE</i>	Politetrafluoroetileno
<i>PDVF</i>	Fluoruro de polivinilideno
<i>SPE</i>	Solid phase extraction (Separación en fase sólida)

## 1. Introducción

En el capítulo anterior se presentaron los resultados obtenidos para la dupla MWCNT-COOH / Hg(II). En este capítulo se retoma el objetivo de emplear sustratos más específicos. Basándonos en los resultados obtenidos en el Capítulo 4, en el que se había utilizado MWCNT-pro como sustrato y al Cu(II) como analito modelo para poner a punto la metodología analítica.

Para determinar las capacidades de los MWCNT-pro como sustrato en sistemas SPE se diseñó un experimento con distintos metales y metaloides y se estudió su interacción con los MWCNT-pro encontrándose que retienen al Bi(III) de forma selectiva. Es por ello que se desarrolló la metodología para la preconcentración y subsecuente determinación de Bi(III) en línea generando información sobre este analito "huérfano" según el artículo de Filella, M. 2010. Esta denominación se debe a los pocos estudios que se han realizado sobre este elemento, en comparación con otros metales/metaloides, a pesar de su importancia.

El Bi es un elemento que se encuentra naturalmente en la corteza terrestre a bajos niveles, hay bibliografía que reporta una concentración de 127 ng g<sup>-1</sup> de Bi en la corteza terrestre superior [Taylor, S. R. 1964]. El Bi puede existir en cuatro estados de oxidación (-III, 0, III, V). Entre ellos el Bi(V) es un poderoso oxidante en solución acuosa, por lo cual se encuentra en muestras ambientales y biológicas en el estado de oxidación trivalente. Esto marca una diferencia con otros elementos del Grupo 15 como el As y el Sb donde el estado pentavalente es el más abundante. La estabilidad del estado de valencia III encuentra su explicación en el par inerte que estabiliza los electrones que se encuentran en el nivel s y es por ello que encontramos al Bi como Bi(III) en muestras de origen ambiental, biológicas y geológicas [Filella, M. 2010]. De acuerdo al artículo de la Dra. Montserrat Filella, si bien el Bi es relativamente no-tóxico para el ser humano en comparación con otros metales y metaloides de la

tabla periódica (como el Hg, Sn, Pb, etc.), el Bi es tóxico para algunos procariotas. Y si bien no se conoce ningún rol biológico del Bi, sus compuestos han sido utilizados por más de 200 años para tratar dolencias debido a infecciones bacterianas [Filella, M. 2010]. Otros autores, sin embargo, reportan que el uso de este metaloide se encuentra en expansión a pesar de conocerse su potencial toxicidad para seres humanos, animales y plantas [Fayazi, M. y col. 2011].

Más allá de esta controversia sobre el potencial tóxico del Bi, es conocido su uso solo, y en sus compuestos derivados, en varias industrias y productos farmacéuticos no existiendo mucha información sobre su concentración en diferentes matrices y siendo necesario realizar aportes para obtener información que ayude a entender su comportamiento ecotoxicológico y su transporte en general y en cursos de aguas en particular. Esta falta de información se encuentra atribuida por Filella a: i) la baja concentración en la que se encuentra el Bi en sistemas medioambientales, muchas veces justificado por la insolubilidad de algunos de sus compuestos y, ii) la baja toxicidad reportada para los seres humanos.

Los niveles esperables de Bi(III) en aguas naturales y matrices de interés ambiental se encuentran en el orden de  $\text{ng l}^{-1}$ . Al igual que para otros elementos, el análisis directo de estos niveles de concentración es dificultoso, existiendo muy pocas técnicas analíticas disponibles para su determinación a nivel de ultratrazas. Para superar esta dificultad se propone en este trabajo de Tesis doctoral una metodología que incorpora la etapa de preconcentración.

Se estudian los nanotubos de carbono de pared múltiple, funcionalizados con L-prolina, como sustrato para la preconcentración y posterior determinación cuantitativa de Bi(III), utilizando un sistema de preconcentración en línea con generación de hidruros acoplado a un espectrómetro de absorción atómica (FI HG AAS). También se incorporan herramientas estadísticas para realizar la

optimización de variables mediante el uso del diseño factorial. Las condiciones optimizadas se utilizan para determinar la concentración de Bi(III) en diferentes tipos de aguas.

## **2. Elección del Bi**

Por lo expuesto y por la gran capacidad de los MWCNT solos y/o funcionalizados para retener metales y metaloides, como se ha demostrado en capítulos anteriores, se eligió al Bi para hacer un aporte al estudio de este elemento, tan poco estudiado y con tan poca información sobre sus niveles en aguas naturales. Se diseñó una experiencia donde se analizó la concentración de la solución a la salida de la columna (residuo) y se comparó con la concentración inicial. Esta diferencia es el porcentaje retenido por la columna. Se analizaron soluciones conteniendo iones de Al, Gd, Sc, Tl, Te, Bi y Dy a pH 5 y pH 8 por ICP MS. En la Figura 1 se presentan los resultados obtenidos. Se observa que a pHs cercanos a 8 el porcentaje de retención aumenta para todas las especies. Asimismo, el Bi es la especie que mostró mayor porcentaje de retención, más del 95% tanto a pH 5 como a pH 8.

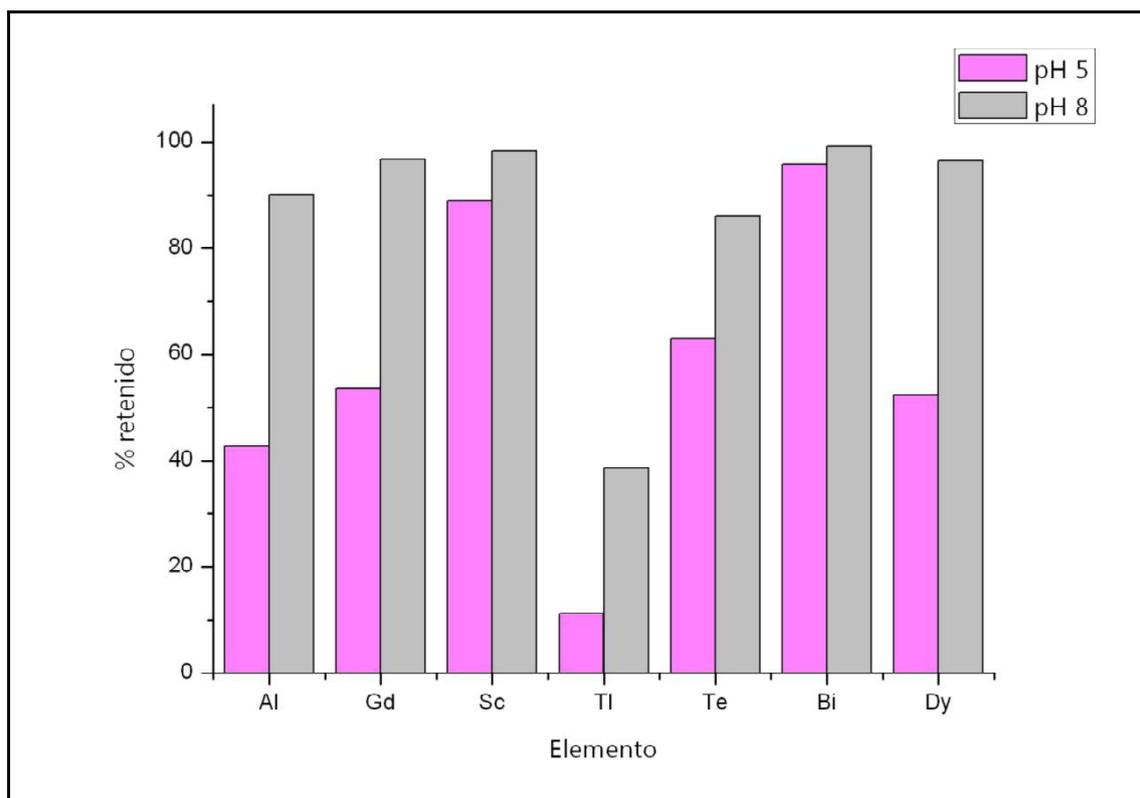


Figura 1. Porcentaje de retención de distintas especies.

### 3. Técnicas para la determinación de Bi

Para la determinación de Bi puede utilizarse la fuente de plasma acoplada inductivamente (ICP), tanto con espectrometría de emisión óptica (ICP OES), como de masas (ICP MS), también pueden utilizarse las espectrometrías atómicas con atomización electrotérmica (ET AAS), de llama (FAAS) o con generación de hidruros (HG AAS) [Marrero, J. y col. 1999; Zhang, N. y col. 2011].

También es posible utilizar técnicas electroanalíticas como la voltamperometría de redisolución anódica de adsorción (ASV) [Koper, A. y col. 2014] y la voltamperometría de redisolución [Fathirad, F. y col. 2013]. Utilizando estas técnicas, las publicaciones consultadas reportan límites de detección (LOD) de  $20 \mu\text{g l}^{-1}$ . Calvo Fornieles y col. han reportado un método analítico utilizando una minicolumna rellena con sílica gel modificada con 1,5-bis(di-2-piridil) metilen tiocarbonohidracida para obtener información sobre la concentración

de Sb, Bi y Sn en muestras de agua de mar utilizando dicho sistema y realizando la detección por ICP MS con HG [Calvo Fornieles, A. 2013]. Estos autores reportaron un LOD de  $2,0 \text{ ng l}^{-1}$ . La espectrometría de fluorescencia atómica (AFS) también puede ser utilizada para la determinación de Bi alcanzándose LOD de  $0,2 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$  [Zhang, N. y col. 2011].

En relación con la metodología de preconcentración, existen en la bibliografía estudios donde se utilizan cartuchos de sílica modificados con Cyanex 301 para preconcentrar y espectrometría de absorción atómica con horno de grafito para la determinación de Bi (GF AAS) [Yamini, Y. y col. 2002]; también, han sido utilizadas la resina quelante Lewatit TP-207 y la espectrometría de absorción con llama [Şahan, S. y col. 2010]. En la publicación de Pourreza, N. y col. emplean nanotubos de carbono modificados con un agente quelante para la retención selectiva de Bi(III) seguido de la cuantificación con FAAS obteniéndose un LOD de  $2,3 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$  [Pourreza, N. 2012].

#### **4. Materiales, reactivos e instrumentos utilizados**

En la Tabla 1 se describen los materiales, reactivos e instrumentos utilizados.

<b>Material/Reactivo</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Características</b>
<b>Instrumento</b>		
Agua destilada y desionizada (DDW)	Barnstead	Obtenida por sistema mixto de intercambio iónico
Bomba Peristáltica Minipuls <sup>®</sup> 3	Gilson	De alto caudal, multicanal, con mangueras resistentes a los productos químicos
Epolene <sup>®</sup>	Eastman Chemical Products, Inc	Cera de polietileno de bajo peso molecular
Espectrómetro de Absorción Atómica	PerkinElmer	AAAnalyst 200, con celda de cuarzo, manta de calentamiento eléctrica
Filtros de jeringa de PDVF	Waters Corp.	0,45 µm tamaño de poro
HNO <sub>3</sub>	Baker	Para análisis 69-70%
HCl	Merck	Para análisis 37%
Lámpara de Bi de descarga sin electrodos (EDL)	PerkinElmer	Proporciona mejor sensibilidad y más bajos límites de detección para elementos volátiles
Mangueras de Tygon	Ismatec	d.i.: 1,52; 1,14 mm Resistente a ácidos
MES	AppliChem	Ácido 2-morfolinoetanosulfónico
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	Carlo Erba	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	Carlo Erba	
Ftalato de potasio monobásico	Sigma-Aldrich	
Sistema de Análisis por Inyección en Línea	PerkinElmer	FIAS 100
Solución de Bi(III) 1000 mg l <sup>-1</sup>	Merck	Solución comercial estándar
Solución NaBH <sub>4</sub> 0,4 % (m/v)	Merck	Estabilizada en NaOH 0,2 % (m/v), filtrada con papel N° 42 Whatman
TRIS	AppliChem	tris(hidroximetil)aminometano

Tabla 1. Materiales, reactivos e instrumentos.

## 5. Metodología utilizada

### 5.1. Materiales y métodos

Se utilizó un espectrómetro PerkinElmer AAnalyst 200 con celda de cuarzo y manta de calentamiento eléctrica. Se utilizó el sistema de inyección de flujo en línea (PerkinElmer FIAS 100) acoplado al espectrómetro. El separador gas-líquido de tipo modular está fabricado en un plástico con alta resistencia química y una membrana de PTFE intercambiable. Para complementar el sistema FIAS se usó una bomba peristáltica adicional, Minipuls 3 de Gilson. Las conexiones entre los distintos componentes se realizaron con tubos de Teflón<sup>®</sup> de 1,0 mm (d.i.). La muestra y los diferentes reactivos utilizados se transportaron a través de mangueras de Tygon<sup>®</sup> con diámetros internos de 1,52 mm para los reactivos y eluyente, y de 1,14 mm para el reductor y la muestra.

Se utilizó una lámpara de descarga sin electrodos (PerkinElmer) con una corriente de 370 mA y a una longitud de onda de 223,1 nm, paso de banda espectral de 1,8 nm.

Todo el material empleado para contener soluciones, tanto de vidrio como de plástico, se lavó con DDW, se dejó en remojo con HNO<sub>3</sub> 10% v/v durante 24 h y finalmente se enjuagó varias veces con DDW. Todas las muestras y estándares se conservaron en botellas de polietileno (50 ml) o tubos Falcon<sup>®</sup> a pH<2 con HNO<sub>3</sub>, refrigeradas (2 °C) según las recomendaciones de la EPA para la conservación y almacenamiento de muestras de agua [Code of Federal Regulations, 1984].

Se utilizaron soluciones comerciales estándar de Bi de 1000 mg l<sup>-1</sup> (Merck) para hacer con ellas todas las diluciones necesarias. Las diluciones se prepararon diariamente. Los reactivos utilizados son de calidad analítica, la solución de NaBH<sub>4</sub> se preparó diariamente por disolución en DDW y se

estabilizó con NaOH 0,2% (m/v). Luego de disolución completa se filtró con papel Whatman N° 42 para eliminar turbidez.

Los MWCNT-pro empleados fueron sintetizados como se describe en el Capítulo 3.

## 5.2. Condiciones de operación

En la Tabla 2 se presentan las condiciones de operación del equipo de FI HG AAS.

---

### Parámetros instrumentales

---

Temperatura de celda	940 °C
Corriente de la lámpara	370 mA
Señal registrada	área de pico
Ancho de rendija	1,8 nm
Longitud de onda	223,1 nm

---

### Generación de hidruros

---

Concentración de NaBH <sub>4</sub>	0,4 % (m/v); NaOH 0,2 % (m/v)
Caudal de NaBH <sub>4</sub>	4,4 ml min <sup>-1</sup>
Caudal de HCl	8,8 ml min <sup>-1</sup>
Concentración de HCl	10 % (v/v)
Caudal de N <sub>2</sub>	30 ml min <sup>-1</sup>

---

Tabla 2. Parámetros de operación.

## 5.3. Preparación de la microcolumna

Para armar las microcolumnas que se utilizan en este capítulo se tuvo en cuenta el estudio de optimización presentado en el capítulo 5 sobre su diseño y relleno y se usaron como sustrato los MWCNT-pro obtenidos del proceso de funcionalización desarrollado en el capítulo 3.

Se evaluaron distintas medidas de columnas utilizando como relleno la mezcla formada por la cera de polietileno de bajo peso molecular, Epolene<sup>®</sup>, y los MWCNT-pro en una relación 10:1, respectivamente. Los mejores resultados se obtuvieron al utilizar microcolumnas de 25 mm de longitud, 2,3 mm de

diámetro interno y 10 mm de longitud útil, rellenas con una mezcla de ~3 mg de MWCNT-pro y 30 mg de Epolene<sup>®</sup>. El volumen nominal de la microcolumna fue de ~42  $\mu\text{l}$ , y se rellenó empleando el método de empaquetamiento en seco.

Para verificar que el Epolene<sup>®</sup> participaba en el proceso de sorción, se rellenó una microcolumna con 30 mg de polietileno y se colocó en el sistema FIAS. Se realizó un ciclo de preconcentración y se eluyó, verificando que el Epolene<sup>®</sup> no retiene Bi(III).

#### **5.4. Procedimiento general**

La forma de procesamiento de las muestras es similar a la desarrollada en el Capítulo 5. En todos los casos, las soluciones de carga se ajustaron a los pHs seleccionados y se hicieron pasar a través de la microcolumna utilizando la bomba peristáltica externa. El diseño experimental utilizado para la carga y la elución de la muestra se encuentra esquematizado en la Figura 2. Se comienza acondicionando la microcolumna con una solución de igual pH que la solución que contiene al analito, luego se realiza la carga de 5 ml de muestra conteniendo al Bi(III) utilizando en ambos casos la bomba 1. Este proceso se realiza colocando la válvula del FIAS en la posición de carga. Para el proceso de elución se coloca la válvula del FIAS en posición de elución y se utiliza la bomba 2 para impulsar el eluyente y el reductor. La elución se realiza en sentido opuesto al sentido de carga, empleando HCl y un caudal optimizado de 8,8 ml  $\text{min}^{-1}$ . Seguidamente el analito se introduce en el equipo (HG AAS). Para finalizar, la microcolumna se regenera haciendo pasar i) 1 ml de una solución de HCl 10% v/v ii) 2,5 ml de DDW y se vuelve a utilizar iniciándose un nuevo ciclo. El esquema de lavado del sistema y la regeneración de la columna propuesto es el resultado de sucesivos ensayos que permitieron encontrar los volúmenes mínimos para los cuales se obtenía la limpieza completa del sistema.

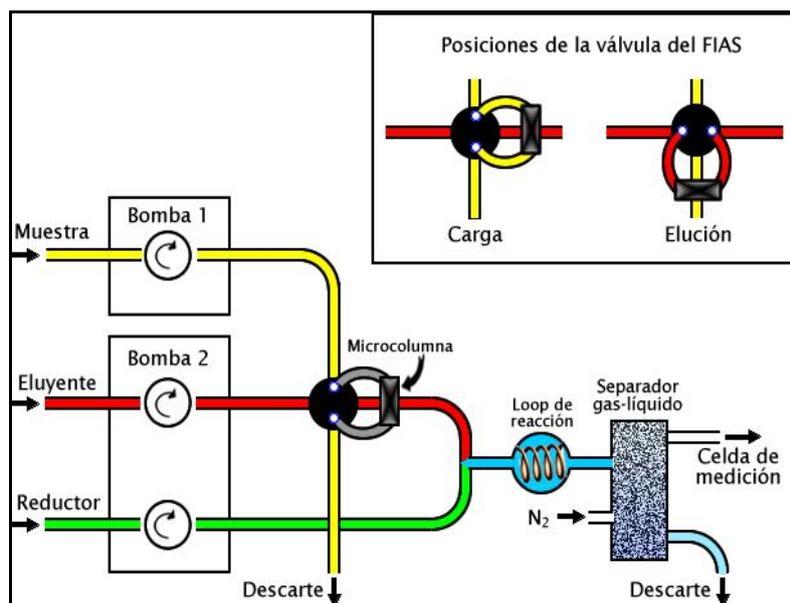


Figura 2. Diseño experimental utilizado.

### 5.5. Características y tratamiento de las muestras a analizar

Las muestras de agua que se analizan fueron recolectadas de diversos lugares de la República Argentina. Tal como se hizo en el capítulo 5 para el estudio de Hg se analizaron aguas de distintos orígenes y niveles de potencial contaminación: agua corriente domiciliaria, agua de río, agua de mar, aguas en cercanías con actividades mineras y efluentes de plantas de tratamiento. Además, se incluyó para su análisis agua recolectada en la Antártida. Esta muestra de agua fue obtenida en la Estación Carlini (ex. Jubany), en la isla 25 de Mayo (62° 14' 18" S 58° 40' 0" O).

Al igual que en el capítulo anterior se utilizaron envases de polietilentereftalato (PET) y Teflón<sup>®</sup> para la toma y almacenamiento de muestras. Las muestras de agua colectadas se colocaron en botellas de PET, previamente tratadas con HNO<sub>3</sub> 10% (v/v) y filtradas con filtros de jeringa de PVDF de 0,45 µm de tamaño de poro. Las muestras de agua de la Antártida se almacenaron en tubos de Teflón<sup>®</sup>. Luego de la recolección, las muestras se conservaron apropiadamente en el laboratorio hasta el momento de su análisis. El pH se ajustó antes de comenzar cada ciclo de preconcentración.

## 5.6. Optimización de variables

### 5.6.1. Estrategia de optimización

#### 5.6.1.1. Caudal de carga y elución

Estos parámetros pueden ser variados en un rango acotado debido a las características del equipo utilizado, es por ello que estas variables se optimizaron en forma individual. El caudal de carga se evaluó entre 2,3 y 4,1 ml min<sup>-1</sup> y el caudal de elución entre 7 y 10,5 ml min<sup>-1</sup>, Figuras 3 y 4, respectivamente.

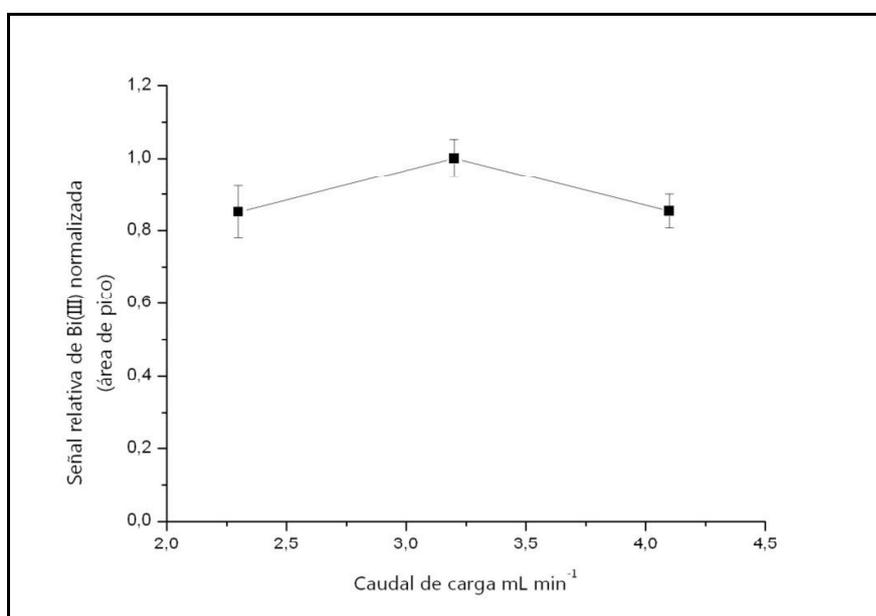


Figura 3. Influencia del caudal de carga en la señal de Bi(III).

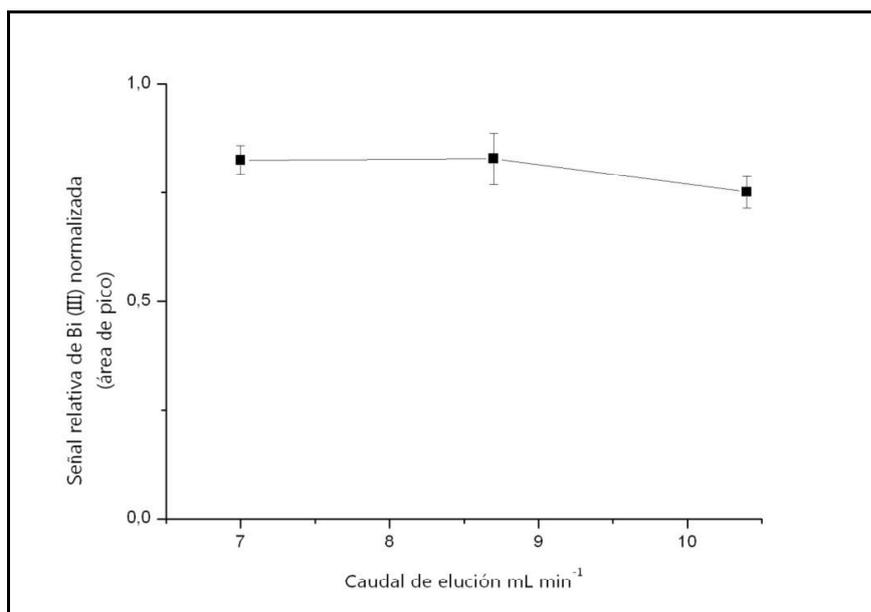


Figura 4. Influencia del caudal de elución en la señal de Bi(III).

Los resultados obtenidos muestran una respuesta similar en ambos casos, es decir, gráficamente no se observan diferencias. Para respaldar las observaciones gráficas, se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA), con esta herramienta estadística es posible comparar varios grupos en una variable cuantitativa. Con el valor obtenido del estadístico (p-valor) podremos decir con una significancia estadística del 95% ( $\alpha=0,05$ ) si los resultados obtenidos presentan diferencias entre sí o no. En ambos casos el test de ANOVA arrojó que no hay diferencia estadística significativa entre los resultados obtenidos. Se utilizó el estadístico p-valor obteniéndose un valor de 0,704 para el análisis del caudal de carga y un p-valor de 0,082 para el caudal de elución. El criterio utilizado es de p-valor < 0,05 para significancia estadística. Se seleccionaron para continuar con las optimizaciones como caudal de carga 3,2 ml min<sup>-1</sup> y como caudal de elución 8,8 ml min<sup>-1</sup>.

### 5.6.1.2. Diseño Factorial

Se utilizó un diseño factorial de dos factores y cuatro niveles. Se estudiaron como factores, i) la concentración del eluyente y ii) el pH de la muestra. En la Tabla 3 se presentan los factores y los niveles estudiados, la elección del rango se debe a la experiencia adquirida con los analitos ya estudiados. Como respuesta se utilizó el área de pico. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y en forma aleatoria para minimizar el efecto de posibles interferencias.

<b>Factor</b>	<b>Mínimo (-)</b>	<b>Máximo (+)</b>
Concentración del ácido (% v/v)	10	20
pH	3	9

Tabla 3. Factores y niveles del diseño factorial.

Los resultados obtenidos se analizaron mediante el análisis de la varianza, utilizando como criterio el p-valor, para conocer la significancia estadística y la influencia de estos factores en la cuantificación del Bi(III).

### 5.6.2. Volumen de elución

Para calcular el volumen en el que se eluye el Bi(III) retenido se midió el tiempo en el que se obtiene la señal de Bi(III) y se utilizó el caudal de elución para calcular el volumen. La experiencia se realizó varias veces dando como resultado que el Bi(III) se eluye cuantitativamente en 1 ml.

### 5.6.3. Capacidad de retención de la microcolumna

Para realizar este estudio se diseñó una experiencia dinámica. Para lograr saturar la columna en un tiempo razonable, se utilizó una solución de  $100 \mu\text{g l}^{-1}$  de Bi(III) y se registró la señal en forma continua. Al pasar la solución de carga con el analito debería ocurrir que al alcanzar la máxima capacidad de retención la microcolumna no retendría más Bi y la señal alcanzaría un valor constante e

igual a la señal que se obtendría si no estuviese la microcolumna en el sistema. En la Figura 5 se presenta el resultado del experimento que permitió calcular la capacidad de retención y obtener un valor de 0,1 mg de Bi(III) retenido por gramo de MWCNT-pro. Esta estimación se realiza teniendo en cuenta el área bajo la curva (expresada en mg) y dividiéndola por la masa de MWCNT-pro que se encuentra en la columna. Para realizar esta experiencia se grabó un video del experimento ya que el software del equipo no tiene la versatilidad para registrar una señal en forma continua. Se analizó la señal de Bi(III) durante 10 minutos lo que corresponde, según el caudal de carga (verificado para la experiencia en  $3,16 \text{ ml min}^{-1}$ ), a un volumen total de  $31,6 \text{ ml}$ . La experiencia se finalizó ya que se había alcanzado un valor constante que se incrementaba muy lentamente. Sin embargo, considerando el valor máximo de absorbancia alcanzado y comparándolo con el valor de absorbancia de una muestra de  $100 \mu\text{g l}^{-1}$  de Bi(III) que se midió sin el sistema de preconcentración, el porcentaje de saturación de la columna resultó ser del 93%.

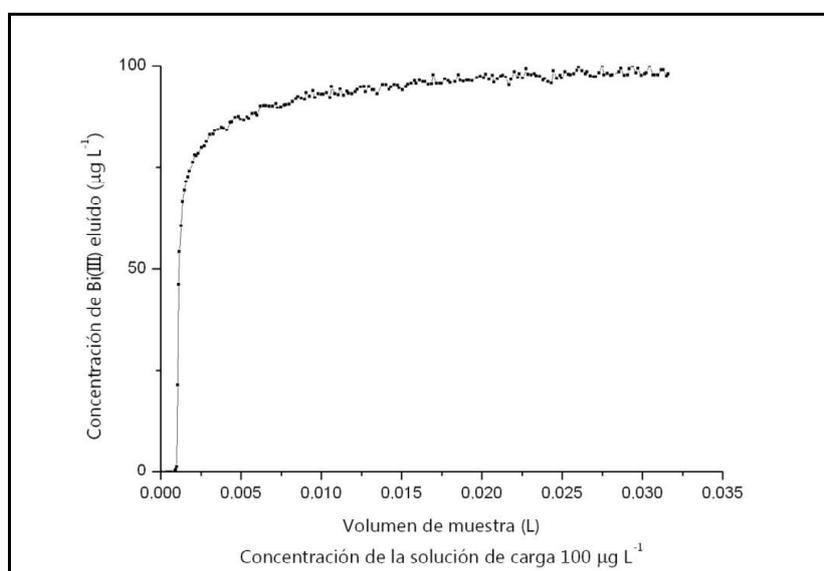


Figura 5. Curva del experimento de capacidad de retención dinámica para obtener la capacidad de retención de Bi(III) de los MWCNT-pro.

En relación a la estabilidad de la columna, fue posible su utilización en más de 690 ciclos de preconcentración/elución y con un volumen máximo de muestra (de una sola vez) de 250 ml sin mostrar deterioro en su capacidad de adsorción ni compactación, que se hubiese evidenciado como sobrepresión en el sistema.

#### 5.6.4. Efecto del pH de carga y concentración del eluyente

En la Figura 6 se observan los resultados obtenidos de las experiencias realizadas. Se graficó el área de la señal de Bi(III) en función de la concentración de eluyente (HCl) y del pH de carga de la muestra. Con los resultados obtenidos se realizó el cálculo de la superficie de respuesta que se observa como un gráfico continuo.

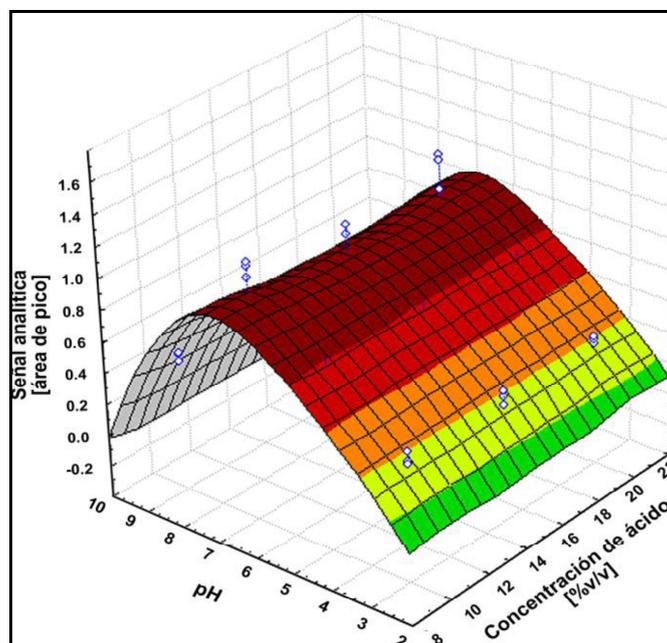


Figura 6. Superficie de respuesta: señal de Bi(III) en función de la concentración del HCl y el pH de carga.

La observación de la superficie de respuesta nos muestra que la concentración del ácido no tiene influencia en la señal de Bi(III), esto pudo ser demostrado mediante el cálculo de ANOVA (p-valor=0,571). Asimismo, podemos observar la influencia clara del pH de carga en el sistema; esto también se verifica con el cálculo de ANOVA (p-valor<0,001). El análisis de la interacción (pH vs concentración de ácido) resultó estadísticamente no significativa (p-valor=0,509).

El pH de carga optimizado se ajustó en 7 y la concentración del ácido eluyente se utilizó en 10% v/v, mínimo evaluado para evitar el deterioro de la columna, siendo además el recomendado por el método del equipo para generar el hidruro de Bi. Como verificación, se estudiaron concentraciones menores al 10% v/v pero se encontró que no lograban eluir completamente al analito.

Si bien el HCl es el ácido recomendado por el fabricante del equipo para la determinación de Bi, con la finalidad de estudiar el desempeño de otros eluyentes, se probaron otros ácidos como tartárico y HNO<sub>3</sub>. Luego de varias pruebas se encontró que el ácido tartárico 0,5 mol l<sup>-1</sup> no eluye al Bi(III), y se descartó.

Por otro lado, se verificó previamente como afectaba la concentración de HNO<sub>3</sub> en la elución y se encontró que el porcentaje de elución aumentaba hasta una concentración de 10% v/v para luego permanecer constante (Figura 7) (similar comportamiento presenta el HCl a concentraciones menores a 10% v/v).

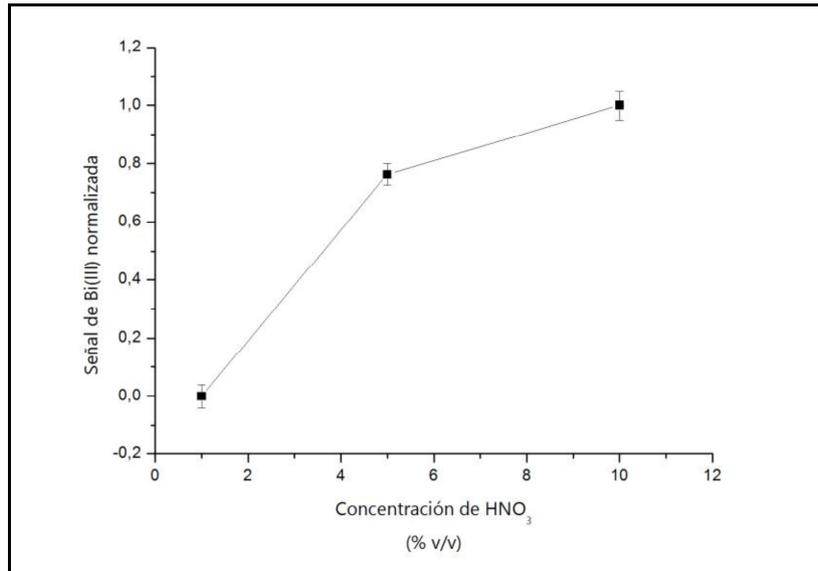


Figura 7. Efecto de la concentración de HNO<sub>3</sub> en la señal de Bi(III).

Al igual que para el eluyente HCl, del análisis de resultados se desprende que el sistema no se ve afectado significativamente por la concentración del ácido pero si por el pH de carga de la muestra y es por ello que se estudió la señal de Bi en función del pH de carga eluyendo con HCl y HNO<sub>3</sub>, ambos 10% v/v. En la Figura 8 se presentan los resultados obtenidos. La tendencia es similar para los dos ácidos y se verificó el mejor desempeño del HCl como eluyente.

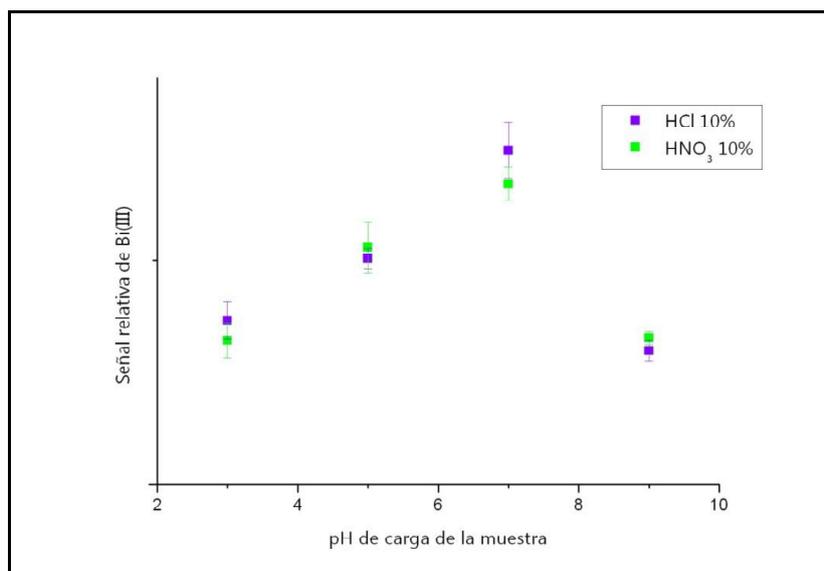


Figura 8. Señal de Bi en función del eluyente (HCl y HNO<sub>3</sub>).

## 6. Efecto de iones concomitantes

Con la finalidad de realizar un mejor ajuste del pH se analizó el comportamiento de la señal de Bi(III) cuando se utilizan distintos buffer con capacidad reguladora en el rango optimizado (7). Utilizando estos buffers, se estudió su capacidad de regular el efecto producido por la presencia de los iones probados como interferentes. Esta alternativa surgió luego de que se realizara la medición de interferencias utilizando como medio de carga DDW a pH 7 (ajustado con NaOH) y se observara una severa disminución de la señal de Bi(III). Se probaron cuatro soluciones buffers: MES (regula en el rango de pH: 5,2-7,2), TRIS (regula en el rango de pH: 7,0-9,0), fosfato de sodio (regula en el rango de pH: 6,2-8,2) y ftalato de potasio (regula en el rango de pH: 4,4-6,4) a concentración de 0,01 mol l<sup>-1</sup>. Para realizar un ajuste fino del pH para cada buffer, se estudió la señal de Bi(III) en el intervalo de una unidad de pH alrededor del pK<sub>a</sub> para cada uno, Figura 9.

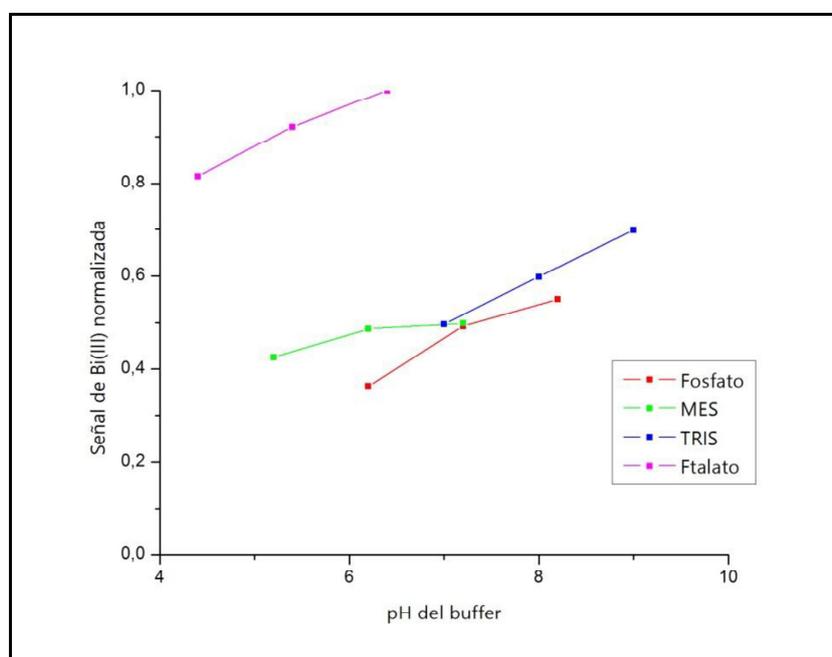


Figura 9. Señal de Bi(III) en función del pH del buffer.

Se estudiaron las potenciales interferencias de Cd, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni y Zn en la generación de la bismutina, ya que estos metales compiten con el analito por la reducción y catalizan la descomposición del  $\text{NaBH}_4$ . También se estudiaron las potenciales interferencias de los elementos que forman hidruros volátiles de los grupos 14, 15 y 16.

En la Tabla 4 se presentan los resultados obtenidos del estudio de interferencias. Los interferentes se evaluaron a dos niveles de concentración: 10 y 100  $\mu\text{g l}^{-1}$  con respecto a una solución de 5  $\mu\text{g l}^{-1}$  de Bi(III). Se consideró interferencia la variación de un  $\pm 5\%$  en la señal de Bi(III). Todas las mediciones se realizaron por triplicado. Al analizar los resultados se observó que el buffer ftalato 0,01  $\text{mol l}^{-1}$  disminuía el efecto de los interferentes en la señal de Bi(III). Esto promovió la repetición del estudio con una concentración del buffer un orden de magnitud mayor (0,1  $\text{mol l}^{-1}$ ). En estas condiciones se logró reducir significativamente la influencia de los interferentes en la señal de Bi(III).

<b>Interferente</b> <b>[<math>\mu\text{g l}^{-1}</math>]</b>	<b>Fosfato de sodio</b> <b>0,01</b> <b><math>\text{mol l}^{-1}</math></b>	<b>MES</b> <b>0,01</b> <b><math>\text{mol l}^{-1}</math></b>	<b>TRIS</b> <b>0,01</b> <b><math>\text{mol l}^{-1}</math></b>	<b>Ftalato de Potasio</b> <b>0,01</b> <b><math>\text{mol l}^{-1}</math></b>	<b>Ftalato de Potasio</b> <b>0,1</b> <b><math>\text{mol l}^{-1}</math></b>	
As	10	0	-44,3	0	18,3	8,9
As	100	0	-34,0	0	17,4	10,0
Cd	10	-6,8	-33,2	-22,1	0	-6,7
Cd	100	-15,3	-20,2	-12,6	0	-7,7
Co	10	-18,2	-44,6	-29,0	0	0
Co	100	-12,6	-36,2	-20,2	-9,6	0
Cr	10	-53,9	-66,4	-27,4	-44,5	0
Cr	100	-56,1	-54,1	-13,1	-22,6	0
Cu	10	-20,1	-34,9	-19,1	-11,0	0
Cu	100	-34,6	-31,1	-18,7	-36,1	0
Fe	10	-66,4	-32,1	-31,7	-22,1	0
Fe	100	-69,2	-28,7	-52,6	-24,4	0
Ge	10	-18,2	-11,2	-28,7	-11,4	-7,0
Ge	100	-14,0	-6,8	-35,5	-7,9	-6,1
Hg	10	-25,1	-44,1	0	-8,2	0
Hg	100	-17,3	-31,9	0	-15,4	0
Mn	10	-13,4	-43,2	-19,9	-10,1	0
Mn	100	-11,6	-30,3	-17,7	-9,1	0
Ni	10	-7,9	-44,1	-14,0	-9,7	0
Ni	100	-14,9	-38,1	-10,0	-18,3	0
Pb	10	-20,6	-32,3	-11,6	-9,9	-9,4
Pb	100	-39,1	-22,2	-8,1	-11,3	-8,2
Sb	10	0	-12,7	-9,0	0	0
Sb	100	-11,6	-33,2	-8,9	-6,4	0
Se	10	-8,0	-39,6	-18,8	-7,5	0
Se	100	-14,2	-34,4	-14,9	-9,2	0
Sn	10	-9,4	-45,2	-9,0	-8,0	8,5
Sn	100	-15,3	-38,5	-8,9	-23,2	10,9
Te	10	-11,9	-39,1	-11,8	-15,3	-11,9
Te	100	-17,1	-34,4	-10,8	-16,2	-11,0
Zn	10	-27,8	-38,4	0	-17,4	0
Zn	100	-21,5	-29,3	0	-14,6	0

Tabla 4. Interferencias de metales pesados y elementos formadores de hidruros en la determinación de Bi(III).

## 7. Desempeño analítico

Se estudió la repetibilidad, entendida como la desviación relativa estándar de 10 muestras utilizando el método de preconcentración/detección con los parámetros optimizados hallándose un valor de 1,5% (RSD) a un nivel de Bi de  $0,1 \mu\text{g l}^{-1}$ . Al realizarse 10 mediciones independiente de una solución de muy baja concentración,  $0,10 \mu\text{g l}^{-1}$ , (criterio de  $3\sigma$ ) se obtuvo un límite de detección de (LOD)  $0,1 \mu\text{g l}^{-1}$ . El límite de cuantificación (LOQ) obtenido es de  $0,36 \mu\text{g l}^{-1}$ . Estos valores se obtienen teniendo en cuenta la pendiente de la recta de calibración del sistema con preconcentración para un volumen de muestra de 5 ml. El factor de preconcentración que se obtuvo de la relación entre las pendientes de las curvas de calibración sin y con preconcentración para 5 ml de muestra y resultó ser igual a 5. Con respecto al factor de enriquecimiento (FE), entendido como la relación entre el máximo volumen de muestra que puede pasarse por la microcolumna respecto al mínimo volumen en el que puede eluirse el analito en forma cuantitativa (1 ml) se obtuvo un FE de 250 [Arpadjan, S. y col. 1997].

El límite de detección que es posible alcanzar con esta metodología está íntimamente relacionado con el volumen de muestra que es posible pasar por la microcolumna y su concentración. Al atravesar la microcolumna un mayor volumen de una dada concentración, la masa de analito retenida por la columna es mayor obteniéndose un aumento de la señal. Si se construyese una curva de calibración con este nuevo volumen, la pendiente obtenida sería mayor. Para verificar esto, se calculó el LOD de la misma forma pero utilizando un volumen de muestra de 10 ml y se obtuvo un LOD de  $0,06 \mu\text{g l}^{-1}$ . Es por ello que es posible disminuir el LOD haciendo pasar un mayor volumen de muestra, sin embargo hay que ponderar el tiempo de análisis que aumenta en función del caudal de carga. Para estimar el volumen máximo se hicieron experiencias independientes donde se pasaron por la microcolumna volúmenes cada vez

mayores de muestra manteniendo constante la masa de analito en cada una. Se analizó el residuo de carga y las primeras y segundas eluciones para verificar si el analito quedaba retenido cuantitativamente en la columna y si era posible eluirlo en una sola elución. Ese estudio mostró que una muestra de 250 ml y una concentración final de  $0,2 \mu\text{g l}^{-1}$  fue retenida por completo y se eluyó en la primera elución.

La linealidad se estudió entre valores cercanos al LOD y  $10 \mu\text{g l}^{-1}$  obteniéndose un coeficiente de correlación de  $R^2 = 0,997$  utilizando 5 ml de muestra.

La cantidad de muestras que pueden procesarse depende esencialmente del volumen de muestra en la cual se quiera determinar al analito. El tiempo necesario para preconcentrar 5 ml de muestra a  $3,2 \text{ ml min}^{-1}$ , utilizando un caudal de elución de  $8,8 \text{ ml min}^{-1}$  considerando el tiempo de adquisición/lectura de muestra y acondicionamiento, es de aproximadamente 3 min, por consiguiente es posible procesar 20 muestras por hora.

Se aplicó el método desarrollado al material de referencia NIST 1643e (elementos traza en aguas). Se obtuvieron valores comparables con los reportados en el certificado, Tabla 5.

Muestra	Bi encontrado ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Bi certificado ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )
NIST 1643e	$13,77 \pm 0,66$	$14,09 \pm 0,15$

Tabla 5. Exactitud del método.

## 8. Análisis de aguas naturales

Se analizaron muestras de agua de distintos orígenes y se buscó información en la bibliografía para comparar los resultados obtenidos. Como se mencionó en la introducción, la información que existe sobre los niveles de

Bi(III) en aguas naturales es escasa y la que se encuentra presenta mucha dispersión. En la Tabla 6 se presentan los resultados obtenidos para las distintas aguas analizadas.

<b>Muestra</b>	<b>[Bi] (ng l<sup>-1</sup>)</b>
Agua de canilla (Córdoba)	< 23
Agua de canilla (Buenos Aires)	< 23
Agua de mar (Buenos Aires)	< 23
Agua de pozo 1 (Buenos Aires)	23,5 ± 1,1
Agua de pozo 2 (Buenos Aires)	28,2 ± 1,1
Agua de río 1 (Mendoza)	178 ± 8
Agua de río 2 (Mendoza)	< 23
Agua termal (Entre Ríos)	38,1 ± 1,9
Agua de la Antártida (Estación Carlini)	166 ± 8
Efluente minero 1 (Córdoba)	25,4 ± 1,2
Efluente minero 2 (Córdoba)	< 23
Efluente minero 3 (San Luis)	< 23
Efluente minero 4 (San Luis)	< 23
Efluente minero 5 (San Luis)	81,0 ± 2,4
Efluente minero 6 (Córdoba)	226 ± 12
Efluente minero 7 (Córdoba)	226 ± 12
Efluente industrial (Buenos Aires)	62,6 ± 3,0
Planta de tratamiento (Buenos Aires)	1580 ± 71

Tabla 6. Concentración de Bi(III) en diferentes aguas (ng l<sup>-1</sup>) (volumen de muestra 25 ml).

En la muestra de agua de mar no se detectó la presencia de Bi(III) (volumen de muestra 25 ml, LOD 23 ng l<sup>-1</sup>). La bibliografía analizada presenta algunas discrepancias con valores entre 10 y 30 ng l<sup>-1</sup> para agua de mar [Filella, M. 2010]. Para el agua corriente los valores reportados son todavía más difíciles de homogeneizar y no es posible determinar un rango de concentración comparable. Las aguas recolectadas en Pcia. de Buenos Aires y Córdoba no presentaron valores de Bi(III) detectables, pero hay bibliografía donde se informan valores elevados en agua corriente. Por ejemplo, se han reportado valores de concentración de Bi(III) de 48 nmol l<sup>-1</sup> (equivalente a 16.500 ng l<sup>-1</sup>) utilizando electrodos químicamente modificados para preconcentrar seguido de la determinación y cuantificación mediante voltametría [Dong, K. L. y col. 1991].

Las aguas de río de la Pcia. de Mendoza arrojaron valores desde < al LOD hasta 178±8 ng l<sup>-1</sup> de Bi(III). En relación a la bibliografía consultada, encontramos valores dispares hallándose concentraciones de hasta 12.000 ng l<sup>-1</sup> en aguas recolectadas en Japón [Yoshimura, W. y col. 1995]. Asimismo, y también en Japón, encontramos reportada una concentración muchísimo menor en el río Takahashi, 2,08 ng l<sup>-1</sup> medidos por ICP MS previo a un proceso de preconcentración [Oshita, K. y col. 2007].

El agua recolectada en la Antártida arrojó una concentración de Bi(III) de 166±8 ng l<sup>-1</sup>. Si bien este valor puede parecer un poco elevado en comparación con aguas de otros orígenes, autores como Boswell y col. reportaron alto contenido de varios elementos en aguas de la Antártida, medidos con un método combinado de espectrometría y extracción por solvente para preconcentrar, obteniendo variaciones de la concentración de Bi(III) en el rango de <200 a 7100 ng l<sup>-1</sup> [Boswell, C. R. y col. 1967].

En las aguas recolectadas en zonas mineras encontramos valores de Bi(III) en el rango que va desde el LOD y los 81 ng l<sup>-1</sup>, mostrando una influencia importante del sitio de toma de muestra. Al igual que para el resto de las aguas

analizadas es difícil encontrar información confiable para poder considerar rangos y hacer comparaciones. Se ha reportado un estudio en las cercanías de la mina de Cu-W en Corea donde se analizó Bi por ICP OES con generación de hidruros en diferentes muestras medioambientales, los cursos de agua analizados presentaron concentraciones variables desde 300 hasta 8.400 ng l<sup>-1</sup> [Jung, M. C. y col. 2002].

El análisis realizado al agua termal obtenida en la Pcia. de Entre Ríos arrojó un resultado de 38,1±1,9 ng l<sup>-1</sup>. Durante la búsqueda bibliográfica se encontró un estudio de agua y sedimento de un campo hidrotermal en Santorini, Grecia, realizado en el marco de un estudio geoquímico. Si bien la cuantificación se realizó con ICP OES, se reportaron valores inferiores a 800 ng l<sup>-1</sup> [Varnavas, S. P. y col. 1988].

## 9. Conclusiones

Fue posible determinar y cuantificar Bi(III) a niveles de ng l<sup>-1</sup> mediante su preconcentración en línea, utilizando como sustrato MWCNT-pro. Una ventaja a destacar del trabajo realizado es la utilización de equipamiento tradicional en laboratorios de análisis químico, tal como la espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros.

El método de SPE desarrollado resultó adecuado para cuantificar Bi(III) a los niveles esperados en aguas naturales, además, la metodología propuesta es versátil, pudiéndose mejorar los límites de detección alcanzables adaptando el volumen de muestra.

Al igual que para la determinación de Hg, el empleo de la mezcla de Epolene<sup>®</sup> con los nanotubos permitió la utilización de la microcolumna en una gran cantidad de ciclos sin mostrar signos de compactación y sobrepresión en el sistema. Esto es posible debido a la cera de polietileno utilizada en relación a la masa de nanotubos (10:1). A pesar de la mínima cantidad de MWCNT-pro

contenidos en la columna, se pudieron alcanzar excelentes límites de detección lo que hizo posible la determinación de Bi en aguas naturales. La heterogeneidad tanto en forma como distribución de las partículas de polietileno ayudaron a evitar la compactación de la microcolumna.

Este estudio es un aporte significativo a un tema muy poco estudiado como es la determinación de Bi en aguas naturales. Los niveles informados aportan información útil para los investigadores involucrados en estudios ambientales.

## Referencias

- Arpadjan, S., Vuchkova, L. y Kostadinova, E. (1997). Sorption of Arsenic, Bismuth, Mercury, Antimony, Selenium and Tin on Dithiocarbamate Loaded Polyurethane Foam as a Preconcentration Method for Their Determination in Water Samples by Simultaneous Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry and Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. *Analyst*, 122, 243-246.
- Boswell, C. R., Brooks, R. R. y Wilson, A. T. (1967). Some trace elements in lakes of McMurdo Oasis, Antarctica. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 31, 731–736.
- Calvo Fornieles, A., García de Torres, A., Vereda Alonso, E. I. y Cano Pavón, J. M. (2013). Determination of antimony, bismuth and tin in natural waters by flow injection solid phase extraction coupled with online hydride generation inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, 28, 364–372.
- Dong, K. L., Kryger, L., Christensen, J. K. y Thomsen, K. N. (1991). Preconcentration and determination of bismuth (III) at a chemically modified electrode containing 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol. *Talanta*, 38, 101–105.
- Fathirad, F., Afzali, D., Mostafavi, A., Shamspur T. y Fozooni, S. (2013). Fabrication of a new carbon paste electrode modified with multi-walled carbon nanotube

- for stripping voltammetric determination of bismuth(III). *Electrochim. Acta*, 103, 206–210.
- Fayazi, M., Afzali, D. y Mostafavi, A. (2011). Pre-concentration procedure using dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of bismuth by flame atomic absorption spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, 26, 2064–2068.
- Filella, M. (2010). How reliable are environmental data on “orphan” elements? The case of bismuth concentrations in surface waters. *J. Environ. Monit.*, 12, 90-109.
- Jung, M. C., Thornton, I. y Chon, H.-T. (2002). Arsenic, Sb and Bi contamination of soils, plants, waters and sediments in the vicinity of the Dalsung Cu–W mine in Korea. *Sci. Total Environ.*, 295, 81–89.
- Koper, A. y Grabarczyk, M. (2014). Determination of Bismuth by Adsorptive Stripping Voltammetry Using Aluminum Oxide for Elimination of Environmental Sample Matrix Interferences. *Electroanalysis*, 26, 697–703.
- Marrero, J., Pérez Arisnabarreta, S. y Smichowski, P. (1999). The effect of six reaction media on the determination of bismuth at trace levels in environmental samples by hydride generation and inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, 14, 1875–1881.
- Oshita, K., Noguchi, O., Oshima, M. y Motomizu, S. (2007). Synthesis of Cross-linked Chitosan Modified with the Glycine Moiety for the Collection/Concentration of Bismuth in Aquatic Samples for ICP-MS Determination. *Anal. Sci.*, 23, 1203–1208.
- Pourreza, N. y Sheikhnajdi, K. (2012). Multi-walled carbon nanotube modified with 1-butyl 3-methyl imidazolium hexafluoro phosphate supported on sawdust as a selective adsorbent for solid phase extraction of Bi(III). *Talanta*, 99, 507–511.

- Şahan, S., Saçmacı, Ş., Şahin, U., Ülgen, A. y Kartal, Ş. (2010). An on-line preconcentration/separation system for the determination of bismuth in environmental samples by FAAS. *Talanta*, 80, 2127–2131.
- Taylor, S. R. (1964). Abundance of chemical elements in the continental crust: a new table. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 28, 1273–1285.
- Varnavas, S. P. y Cronan, D. S. (1988). Arsenic, Antimony and Bismuth in sediments and waters from the Santorini Hydrothermal Field, Greece. *Chem. Geol.*, 67, 295–305.
- Yamini, Y., Chaloosi, M. y Ebrahimzadeh, H. (2002). Solid phase extraction and graphite furnace atomic absorption spectrometric determination of ultra trace amounts of bismuth in water samples. *Talanta*, 56, 797–803.
- Yoshimura, W., Liu, X. D. y Uzawa, A. (1995). Determination of trace amounts of bismuth in natural water by means of coprecipitation with zirconium hydroxide and differential pulse anodic stripping voltammetry. *Bunseki Kagaku*, 44, 1071–1076.
- Zhang, N., Fu, N., Fang, Z., Feng, Y. y Ke, L. (2011). Simultaneous multi-channel hydride generation atomic fluorescence spectrometry determination of arsenic, bismuth, tellurium and selenium in tea leaves. *Food Chem.*, 124, 1185–1188.

Conclusiones

y

Perspectivas



La motivación de este trabajo de Tesis doctoral ha sido el desarrollo de un nuevo material sorbente con una gran capacidad de retención de especies metálicas en solución, y una metodología analítica que en forma coordinada fueran capaces de acoplarse a un sistema de análisis en línea utilizando como detección la espectrometría de absorción atómica para la cuantificación de analitos de interés ambiental. El sistema de pretratamiento fue propuesto con el objetivo de alcanzar los límites de detección necesarios para cuantificar los analitos en las bajas concentraciones a las que se encuentran en aguas naturales no contaminadas. De esta forma fue posible la utilización de equipamiento de menor complejidad que los que se utilizan habitualmente para estos análisis, como la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente. Asimismo, la utilización de equipamiento de menor complejidad permite realizar estas determinaciones en laboratorios de diferentes características y menores recursos. La versatilidad de la metodología desarrollada hace que el sistema de preconcentración de muestra pueda acoplarse también a otras técnicas analíticas.

Este trabajo de Tesis doctoral constituye un aporte al desarrollo de métodos analíticos sensibles, selectivos y confiables para la cuantificación de especies químicas presentes a niveles de trazas y ultratrazas en muestras de origen natural, empleando una técnica analítica de relativamente bajo costo que puede encontrarse aún en los laboratorios de servicios e investigación.

Para el pretratamiento de muestras, en este trabajo se eligió un sistema simple, económico y versátil como es la Separación en Fase Sólida y se buscó a través de la utilización de materiales novedosos, como los nanotubos de carbono, jerarquizar la metodología al introducir selectividad, miniaturización,

automatización y rendimiento. La utilización de nanotubos de carbono, oxidados y funcionalizados, como sorbente específico permitió alcanzar límites de detección del orden de los  $\text{ng l}^{-1}$ .

La metodología analítica desarrollada permitió utilizar microcolumnas diseñadas "a medida" para acoplar con una técnica espectroscópica atómica, como la espectrometría de absorción atómica disponible en los Laboratorios de Química Analítica de CNEA. Durante la preparación del sorbente, el problema más serio a abordar fue evitar la compactación dentro de la columna de los CNTs para controlar así la sobre-presión del sistema. Para ello se implementó el uso de Epolene<sup>®</sup> mezclado en distintas proporciones con los CNTs. Esta cera de polietileno de muy bajo peso molecular fue utilizada por primera vez para este propósito y resultó exitosa para evitar la compactación del sistema y fue parte responsable de que se pudiesen realizar más de 690 ciclos de preconcentración/elución en el caso de la retención de Bi(III) sin sobre-presión. También fue posible, debido a que el material desarrollado resultó ser muy eficiente, disminuir el relleno de las columnas de 20 mg para el caso de la retención de Cu (usando MWCNT-pro como sustrato) a 1 mg; en el caso de la retención de Hg (usando MWCNT-COOH). El sistema microcolumna/relleno (CNTs + Epolene<sup>®</sup>) permitió:

- una exitosa adaptación e implementación en línea
- utilizar microcolumnas de diferentes dimensiones (longitud, diámetro) y tipo de rosca para el acople (exterior, interior)
- evitar los conocidos y habituales problemas de compactación de estos sistemas utilizando una mezcla de nanotubos de carbono con la cera de polietileno
- modificar fácilmente el sentido de carga y elución de las muestras
- recuperar el sustrato para su análisis posterior

Se utilizaron sistemas discontinuos (batch) como primer acercamiento para seleccionar la relación CNTs/especie metálica óptima en solución. Si bien son conocidas las características hidrofóbicas y las fuertes energías de repulsión que presentan los nanotubos comerciales, la realización de las pruebas en batch pusieron de manifiesto parte de las dificultades que presentan estos materiales para su utilización, situación que también es aplicable a la manipulación, funcionalización y caracterización de los mismos. Es por ello, que su oxidación y funcionalización representó un desafío experimental que fue abordado y resuelto con buenos resultados en este trabajo de Tesis doctoral.

Las dificultades encontradas en la preparación de las muestras para los estudios de caracterización pudieron resolverse satisfactoriamente. Se utilizaron una gran variedad de técnicas durante las distintas etapas del proceso de síntesis del sorbente como, SEM, TEM, EDS, TGA, XRD y FTIR. En el capítulo sobre la obtención de los nanotubos funcionalizados se presentó una gran cantidad de información que constituye un aporte para comprender las diferencias en el comportamiento de sorción de los materiales sintetizados. También se demostró la gran resistencia estructural de estos materiales ya que luego de ser reutilizados en un importante número de ciclos se comprobó que seguían manteniendo su esqueleto de base carbono.

La variedad de nanotubos empleados pusieron de manifiesto las posibilidades que tiene este sustrato de comportarse de forma selectiva, quedando demostrado en los estudios de evaluación de la capacidad de retención dinámica. En el caso del Cu se obtuvo una capacidad de retención dinámica de  $0,09 \text{ mg g}^{-1}$  (usando MWCNT-pro), para la retención de Hg se obtuvo  $3,2 \text{ mg g}^{-1}$  (usando MWCNT-COOH), pasando por  $0,1 \text{ mg g}^{-1}$  para la retención de Bi por MWCNT-pro. Esto demuestra las características únicas que

posee cada sistema analito/sorbente/SPE y las posibilidades que existen para el desarrollo de nuevos sorbentes específicos.

El objetivo de retener y preconcentrar analitos de interés ambiental, en este caso, Cu(II), Hg(II) y Bi(III) se alcanzó con éxito permitiendo cuantificarlos a niveles muy bajos ( $\text{ng ml}^{-1}$  o menor) lo que hizo posible detectarlos en aguas naturales no contaminadas. La determinación de Bi(II) a estos niveles en distintas categorías de aguas ha aportado información valiosa sobre un elemento muy poco estudiado.

Cabe resaltar que la afinidad del sistema MWCNT-COOH por el Hg(II) es tan alta que motivó a este Grupo de Trabajo a continuar investigando y proponer nuevas funcionalizaciones utilizando, por ejemplo, aminoácidos como la metionina (es conocida la afinidad del Hg por el azufre) para abordar las posibilidades de desarrollar sistemas de SPE en línea que permitan determinar especies de Hg en forma selectiva, como por ejemplo Hg(II) y metilHg.

---

## Publicaciones

- Parodi, B., Londonio, A., Polla, G. y Smichowski, P. (2015). On-line solid phase extraction of bismuth by HI-HG-AAS using L-proline immobilised on carbon nanotubes combined with factorial design. *Microchemical Journal*, 122, 70-75.
- Parodi, B., Londonio, A., Polla, G., Savio, M. y Smichowski, P. (2014). On-line flow injection solid phase extraction using oxidised carbon nanotubes as substrate for cold vapour-atomic absorption determination of Hg(II) in different kind of waters. *J. Anal. At. Spectrom.*, 29, 880-885.
- Savio M., Parodi B., Martinez L. D., Smichowski P. y Gil R. A. (2011). On-line solid phase extraction of Ni and Pb using carbon nanotubes and modified carbon nanotubes coupled to ETAAS. *Talanta*, 85, 245-251.
- Parodi, B., Savio, M., Martinez, L. D., Gil, R. A. y Smichowski, P.(2011). Study of carbon nanotubes and functionalized-carbon nanotubes as substrates for flow injection solid phase extraction associated to inductively coupled plasma with ultrasonic nebulization. Application to Cd monitoring in solid environmental samples. *Microchemical Journal*, 98, 225-230.

## Presentaciones a Congresos

- "Preconcentración y determinación de Bi en línea por FI-HG-AAS utilizando nanotubos de carbono funcionalizados con L-prolina", 8vo Congreso Argentino de Química Analítica, 3 al 6 de noviembre, 2015, La Plata, Buenos Aires, Argentina.
- "Bismuth preconcentration and determination by FI-HGAAS involving an on-line solid phase extraction system and L-proline immobilized on carbon nanotubes", Colloquium Spectroscopicum Internationale XXXIX, 30 de agosto al 3 de septiembre, 2015, Figueira da Foz, Portugal.
- "Carbon Nanotubes as an efficient substrate for Hg(II) preconcentration and on-line determination by FI-CV-AAS", 13th Rio Symposium on Atomic Spectrometry, 19-24 de octubre, 2014, Mérida, Yucatán, México
- "Nanotubos de carbono: un sustrato eficiente para la preconcentración de Hg(II) utilizando un sistema en línea FI-CV-AAS", 3er Congreso Uruguayo de Química Analítica, 6 al 9 de octubre, 2014, Montevideo, Uruguay.
- "Preconcentración de Hg utilizando nanotubos de carbono en un sistema en línea. Determinación de Hg a nivel de trazas en diferentes tipos de aguas por FI-CV-AAS", 7º Congreso Argentino de Química Analítica, 1 al 4 de octubre, 2013, Ciudad de Mendoza, Argentina.
- "Extracción Continua en Fase Sólida de Ni y Pb Utilizando Nanotubos de Carbono y Nanotubos de Carbono Modificados Acoplados a Espectrometría de Absorción Atómica Electrotérmica (ETAAS)", XVII Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica, del 3 al 6 de mayo, 2011, Ciudad de Córdoba, Argentina.

- "Study of Carbon Nanotubes and Functionalized Carbon Nanotubes as Substrates for flow Injection Solid Phase Extraction. Application to Cd Monitoring in Solid Environmental", 12th International Conference on the Science and Application of Nanotubes, 10 al 17 de Julio, 2011, Cambridge, Inglaterra
- "Aplicación de nuevos substratos a la preconcentración en línea, especiación y determinación de elementos clase en diferentes matrices", 16º Encuentro Nacional de Química Analítica, 23 al 26 de octubre, 2011, Campos do Jordão, Brasil
- "Aplicaciones analíticas de los nanotubos de carbono", X Encuentro CNEA Superficies y Materiales Nanoestructurados 2010, 11 al 14 de mayo, 2010, Centro Atómico Bariloche, Bariloche, Argentina
- "Use of CNT and modified-CNT as substrate for solid phase extraction coupled to USN-ICP OES for the on-line preconcentration of Cd", Eleventh Rio Symposium on Atomic Spectrometry, 24 al 29 de octubre, 2010, Mar del Plata, Argentina
- "Empleo de NTC funcionalizados con aminoácidos para la retención de especies tóxicas", IX Encuentro CNEA "Superficies y Materiales Nanoestructurados 2009", 27 al 30 de abril, 2009.
- "Caracterización de NTC funcionalizados con aminoácidos para la retención y preconcentración de especies tóxicas", XVI Congreso Argentino de Físico Química y Química Inorgánica, 18 al 21 de mayo, 2009, Salta, Argentina



Contents lists available at ScienceDirect

Microchemical Journal

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/microc](http://www.elsevier.com/locate/microc)

# On-line solid phase extraction of bismuth by FI–HG–AAS using L-proline immobilised on carbon nanotubes combined with factorial design



Belén Parodi<sup>a,b</sup>, Agustín Londonio<sup>b,c</sup>, Griselda Polla<sup>d</sup>, Patricia Smichowski<sup>c,e,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto Nacional de Tecnología Industrial, Centro de Investigación y Desarrollo en Mecánica, Av. General Paz 5445 B1650KNA, San Martín, Buenos Aires, Argentina

<sup>b</sup> Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental (3iA), Universidad de San Martín, Campus Miguelete, Martín de Irigoyen 3100, 1650, San Martín, Buenos Aires, Argentina

<sup>c</sup> Comisión Nacional de Energía Atómica, Gerencia Química, Av. Gral Paz 1499, B1650KNA, San Martín, Buenos Aires, Argentina

<sup>d</sup> Comisión Nacional de Energía Atómica, Gerencia Investigación y Aplicaciones, Av. Gral Paz 1499, B1650KNA, San Martín, Buenos Aires, Argentina

<sup>e</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Av. Rivadavia 1917, C1033AAJ, Buenos Aires, Argentina

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 17 March 2015

Received in revised form 17 April 2015

Accepted 17 April 2015

Available online 23 April 2015

### Keywords:

Bismuth

Preconcentration

FI–HG–AAS

L-Proline immobilised on CNTs

Factor analysis

Waters

## ABSTRACT

This study explores further the analytical capabilities of functionalised multiwalled carbon nanotubes with L-proline (pro-MWCNTs) for the reliable preconcentration and determination of Bi(III) in waters using an on-line flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry (FI–HG–AAS) system. To avoid carbon nanoparticles aggregation, the preconcentration was carried out on a microcolumn filled with functionalised pro-MWCNTs and a low molecular weight polyethylene. The optimisation was performed by employing a full factorial design. The factors related to the optimisation process were the concentration of eluent and pH of the sample. The best performance was achieved packing the substrate in a microcolumn of 2.3 mm (i.d) × 25 mm (pro-MWCNTs net length: 10 mm), the pH was 7.0 and the concentration of the eluent (HCl) was 10% (v/v). Under optimal conditions, the adsorption capacity of the substrate was found to be 0.1 mg g<sup>-1</sup> reaching a preconcentration factor (PF) of 160. A detection limit (3σ) of 0.7 ng L<sup>-1</sup> was achieved, when using only 3.0 mg of substrate. Interferences affecting Bi(III) signal were carefully studied. Precision, expressed as relative standard deviation (RSD) turned to be 1.5% at the 0.1 μg L<sup>-1</sup> level (n = 10). Accuracy test for the entire analytical procedure was performed by means of the Standard Reference Material (SRM) NIST 1643e (trace elements in water) and results were in good agreement with the certified values. The system was evaluated for quantitative determination of Bi(III) in different categories of waters.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Bismuth is a naturally occurring element that is found at low levels (127 ng g<sup>-1</sup>) in the upper continental crust [1]. It can exist in four oxidation states. Among them, Bi(V) is a powerful oxidant in aqueous solution in contrast to other elements of Group 15 namely, As and Sb for which the pentavalent state is the most abundant. Bismuth is found as Bi(III) in environmental biological and geological samples [2]. According to Filella [2] Bi is toxic to some prokaryotes, and Bi compounds have been used for more than 200 years to treat ailments resulting from bacterial infections. Other authors reported that the use of this metalloid is increasing, even though it is known to be toxic for humans, animals and plants [3].

Even when Bi and its compounds are used in a variety of industrial and pharmaceutical products, this metalloid has much less studied in

comparison to other elements and consequently, to gain information on its ecotoxicology, behaviour and transport in natural waters is necessary. In an excellent critical review, Filella [2] attributes this lack of information to: (i) the low concentration of Bi in environmental systems, often justified on the grounds of the insolubility of its compounds and (ii) the renowned low toxicity of the element to humans.

Electroanalytical techniques such as adsorptive stripping voltammetry (ASV) [4], and stripping voltammetry [5] have been, and still are, very used for Bi determination. In these studies, limits of detection of 20 μg L<sup>-1</sup> were reported. Atomic spectrometric and plasma-based techniques, in many cases including hydride generation (HG) for increasing detection power, represent another group of techniques successfully used for Bi determination at trace and ultra-traces in water samples [6,7]. An analytical methodology was developed by Calvo Fornieles et al. [8] to provide information on Sb, Bi and Sn content in sea water samples using a preconcentration system and ICP–MS with HG for detection. The authors reported a LOD of 2.0 ng L<sup>-1</sup>. Atomic fluorescence spectrometry (AFS) was also a suitable technique for Bi determination reaching a LOD of 0.2 μg L<sup>-1</sup> [7].

Because of the expected levels of Bi(III) in natural waters and matrices of environmental interest (~ng L<sup>-1</sup> or below) many analytical

\* Corresponding author at: Comisión Nacional de Energía Atómica, Gerencia Química, Av. Gral Paz 1499, B1650KNA San Martín, Buenos Aires, Argentina. Tel.: +54 11 6772 7873; fax: +54 11 6772 7886.

E-mail addresses: [belen@inti.gov.ar](mailto:belen@inti.gov.ar) (B. Parodi), [londonio@cnea.gov.ar](mailto:londonio@cnea.gov.ar) (A. Londonio), [grispoll@cnea.gov.ar](mailto:grispoll@cnea.gov.ar) (G. Polla), [smichows@cnea.gov.ar](mailto:smichows@cnea.gov.ar) (P. Smichowski).

techniques are far below to directly achieve the detection power required. This situation can be improved by adding a preconcentration step. In this direction, the use of different substrates has been reported such as: octadecyl bonded silica cartridges modified with cyanex 301 in conjunction with graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS) [9], Lewatit TP-207 chelating resin and flame atomic absorption for detection [10]. More recently modified multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs) have been tested as a selective sorbent for Bi(III) preconcentration [11]. For many years, our group has been studying the capabilities of biosorption for elemental solid phase extraction using amino acids immobilised on controlled pore glass [12–14]. More recently, amino acids such as L-tyrosine were immobilised on MWCNTs for the selective determination of Tl [15]. The detection limit reported for total Tl by STPF-ETAAS was  $150 \text{ ng L}^{-1}$  while for Tl(III), employing the separation system a much lower value was obtained ( $3 \text{ ng L}^{-1}$ ). As regards Co, the LOD was  $50 \text{ ng L}^{-1}$  [16]. L-Alanine was another amino acid successfully used for Ni, Pb [17] and Cd [18] preconcentration. In conclusion, solid phase extraction methods are rapid, simple and sensitive and can be considered as a low cost alternative in comparison with other techniques such as ICP-MS.

In this study, it was deemed of interest to further investigate the capabilities of multiwalled carbon nanotubes with L-proline (pro-MWCNTs) as a new substrate for Bi(III) determination using an on-line solid phase extraction (SPE) procedure involving its coupling to flow injection–hydride generation–atomic absorption spectrometry (FI-HG-AAS). The optimisation was performed using a factorial design. The conditions were established and Bi(III) determination in different kinds of waters was successfully carried out reaching a high preconcentration factor.

## 2. Experimental

### 2.1. Instrumentation and reagents

A PerkinElmer (Norwalk, CT, USA) Analyst 200 atomic absorption spectrometer provided with a quartz cell in an electrically heated mantle, in conjunction with a PerkinElmer Flow Injection Analysis System (FIAS 100) was used for Bi(III) determination. The gas–liquid separator (Perkin–Elmer) is a modular ‘building block’-type made from chemically resistant plastic with an exchangeable PTFE membrane placed in the screw cap of the separator. An additional peristaltic pump, Minipuls 3 from Gilson (Villiers-Le-Bel, France) was used to deliver the sample.

Connections among components were made with 1.0 mm (i.d.) PTFE tubing. Tygon type pump tubing with an internal diameter of 1.52 mm, 1.14 mm and 1.14 mm (Ismatec, Cole Parmer, Vernon Hills, IL, USA) were employed to propel reagents and eluent, reductant and sample, respectively. The experimental set-up of on-line preconcentration of Bi(III) is depicted in Fig. 1.

A bismuth electrodeless discharge lamp (PerkinElmer) operated at a current of 370 mA and a wavelength of 223.1 nm with a spectral band pass of 1.8 nm was used. Instrumental details and operating conditions are summarised in Table 1.

Deionised distilled water (DDW) was produced by a commercial mixed-bed ion-exchange system Barnstead (Dubuque, IA, USA) fed with distilled water. All reagents were of analytical grade and the presence of Bi was not detected within the working range. Commercially available  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  standard solutions (Merck) of Bi(III) were used. Diluted working solutions were prepared daily by serial dilutions of the stock solution. Sodium tetrahydridoborate(III) solution (0.4% w/v) was prepared daily by dissolving  $\text{NaBH}_4$  (Merck, Darmstadt, Germany) in deionised water, stabilizing in 0.2% (w/v) NaOH and filtering through Whatman N° 42 filter-paper to eliminate turbidity. The resulting solution was stored in polyethylene flask at  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . The cation solutions used in the study of interferences were prepared from analytical-reagents grade chemicals. Buffers solutions tested were: 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany), tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS) (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Carlo Erba, Milan, Italy), potassium phthalate monobasic (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Hydrochloric acid solutions were prepared by step-wise dilution of the concentrated acid (Merck).

All glassware and plastic bottles used were cleaned by rinsing with deionised water, soaking with a 10% (v/v) nitric acid solution for 24 h and then rinsing several times with deionised water. All standards were stored in polyethylene bottles (50 mL) or Falcon® tubes.

Multiwalled carbon nanotubes were purchased from Sun Nanotech Co. Ltd., Jiangxi, China. All chemical (Merck) used for MWCNTs functionalisation ( $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{SOCl}_2$ , DMF, THF, L-proline) were of analytical reagent grade and were used without further purification.

### 2.2. Sample collection, treatment and preconcentration procedure

Water samples were collected in different sites in Argentina. They include: tap water, river water, sea water, effluents from mining

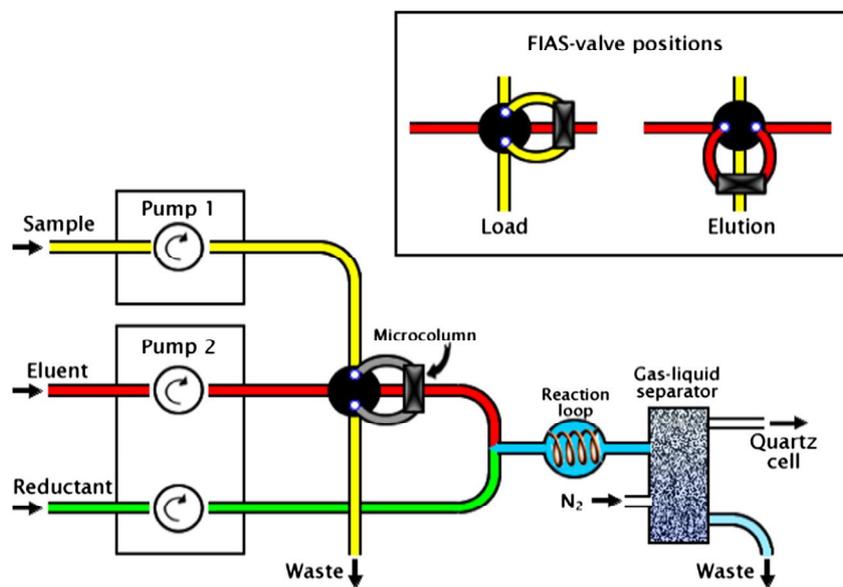


Fig. 1. Operational diagram of the FI-HG-AAS system used for Bi(III) preconcentration.

**Table 1**  
Instrumental details and operating conditions of the FI–HG–AAS system for determination of Bi(III).

Instrument	PerkinElmer AAnalyst 200
Cell temperature	940 °C
EDL lamp current	370 mA
Measurement mode	Peak area
Slit width	1.8 nm
Wavelength	223.1 nm
Hydride generation	
NaBH <sub>4</sub> concentration	0.4% (w/v); NaOH 0.2% (w/v)
Reductant flow rate	4.4 mL min <sup>-1</sup>
Eluent (HCl) flow rate	8.8 mL min <sup>-1</sup>
HCl concentration	10% (v/v)
Carrier gas (N <sub>2</sub> ) flow rate	30 mL min <sup>-1</sup>

activities and effluents from a treatment plant. In addition, a water sample collected in Antarctica was analysed. This sample was collected at the Carlini Station (ex Jubany), 25 de Mayo Island (62°14'18"S, 58°40'0"W).

Collected samples were placed in poly(ethylene terephthalate) PET bottles previously cleaned with 10% (v/v) HNO<sub>3</sub>. Antarctic water was collected in a Teflon® flask. Samples were transported to the laboratory and stored in a dry and dark place until analysis. The tap water, sea water, river water, well water, thermal water and effluent samples were filtered through a 0.45 µm polyvinylidene fluoride syringe filter (Minisart-Sartorius, Göttingen, Germany). As in a previous study [19] Teflon® and PET bottles were used for sampling and storage of waters.

Before starting the experiments, the microcolumn was conditioned for preconcentration by passing one mL of a 10% (v/v) HCl solution, washed with 2.5 mL of DDW. Then, 5.0 mL of analyte solutions were loaded on the microcolumn at a flow rate of 3.2 mL min<sup>-1</sup>. For stripping Bi from the column, a 10% (v/v) HCl solution was passed and Bi was injected in the on-line system. The absorbance measurements (peak area) were proportional to the analyte concentration in the sample and were used for measurements. Samples were analysed as soon as it was possible.

### 2.3. Immobilisation procedure

Firstly, oxidation of MWCNTs was carried out in a mixture of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:HNO<sub>3</sub> (3:1). Commercial MWCNTs were soaked for 30 min in an ultrasound bath and then placed in a water bath at 55 °C for 4 h. The resulting oxidised MWCNTs were dialysed with DDW until complete elimination of the residual acid. L-Proline functionalised MWCNTs (pro-MWCNTs) were obtained by the chemical attachment of L-proline using the following procedure: the oxidised MWCNTs were dispersed in thionylchloride (SOCl<sub>2</sub>) with 2 mL of dimethylformamide (DMF) and the mixture was left to react while stirring at 70 °C for 24 h. The resultant solid material (COCl-MWCNTs) was centrifuged and then washed with tetrahydrofuran (THF). L-Proline and COCl-MWCNTs were mixed with THF at 45 °C for 4 days. The resultant material, pro-MWCNTs was resuspended with ethanol, filtered and dried.

### 2.4. Characteristics of the column and the sorbent material

The preparation and dimension of the microcolumn is a key topic when nanoparticles are used as the filler material. The characteristics of the sorbent and the column geometry greatly influence the analyte retention. According to previous experiences [19], to avoid aggregation and an unacceptable higher back-pressure due the tight packing of the filling material we adopted to fill the column with a mixture of functionalised pro-MWCNTs and inert microparticles of Epolene® (Eastman Chemical Products, Inc., Kingsport, TN, USA), a low-density polyethylene wax that offers good high-temperature stability, low-

temperature flexibility, and very good compatibility with the use of mineral acids.

We performed a careful evaluation of the optimum dimensions of the microcolumn. These tests demonstrated that to reach an efficient Bi(III) preconcentration as well as higher and thinner peaks, a good compromise was: (i) using a small home-made microcolumn of 2.3 mm (i.d.) × 25 mm (pro-MWCNTs net length: 10 mm and a nominal microcolumn capacity ~42 µL), and (ii) carefully assess the filler material and the way of packing it.

The microcolumn was filled with a mixture of pro-MWCNTs and Epolene®. According to our experiments, the optimal proportion was ~90% of Epolene® and ~10% of pro-MWCNTs. In addition to the lack of aggregation, microcolumns resulted to be even better in terms of peak sharpness.

In this study a mixture of ~3.0 mg of pro-MWCNTs and 30 mg of Epolene® was used to fill the microcolumn using the dry packing method. The microcolumn was then connected to the system with PTFE tubing to form the preconcentration system. The microcolumn was preconditioned by the blank solution prior to each cycle. After the elution, the system was washed with 1 mL of a 10% (v/v) HCl solution and then with 2.5 mL of DDW.

To check that Bi(III) was not retained by the low molecular weight polyethylene wax, a test microcolumn was filled only with ~30 mg of this material and inserted in the preconcentration system. No Bi(III) retention was observed which evidenced that Bi(III) was retained by pro-MWCNTs and not by Epolene®.

Scanning electron micrographs of particles of Epolene® with pro-MWCNTs showed a significant dispersion of the nanotubes on the particles with the preservation of their backbone after 690 cycles of Bi(III) preconcentration.

### 2.5. Optimization strategy

Screening studies showed that sample and elution flow rates have no statistical significant influence on Bi retention (see next Section). The optimisation step was carried out considering two factors such as (i) eluent acid concentration and (ii) sample pH using a four levels factorial design. A simple response was analysed as peak area. All experiments were performed in triplicate with a random order to minimize the effects of uncontrolled factors that may introduce bias in the measurements.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Sampling and elution flow rates

Sampling flow rate (SFR) was evaluated between 2.3–4.1 mL min<sup>-1</sup> while the effect of elution flow rate (EFR) was studied between 7–10.5 mL min<sup>-1</sup>. Statistical significance of the effects was checked by analysis of variance (ANOVA) and using p-value significance levels less than 0.05. Sampling flow rate and elution flow rate had no significant effects with p-values of 0.704 and 0.082, respectively. SFR was optimised at 3.2 mL min<sup>-1</sup> and EFR at 8.8 mL min<sup>-1</sup>.

### 3.2. Factorial design

A two factors (acid concentration and pH) factorial design at four levels with 16 runs (by triplicate) was developed in order to determine the influence of the two factors and its interaction on the system.

**Table 2**  
Factors and levels used in the factorial design.

Variable	Minimum (–)	Maximum (+)
Acid concentration (%v/v)	10	20
pH	3	9

Minimum and maximum levels of each factor (Table 2) were chosen according to data from previous experiments. The factorial design was evaluated using the analytical signal (peak area). Significance of the effects was checked by ANOVA and using p-value significance levels (0.05).

Fig. 2 shows the surface response of Bi(III) retention as a function of pH and acid concentration. From observation and evaluation of the surface graphic, the acid concentration does not affect the system, which was demonstrated by the ANOVA test ( $p = 0.5710$ ). On the other hand, the pH statistically affects the on-line preconcentration system ( $p < 0.0001$ ). Besides, the interaction ( $pH \times$  acid concentration) has not shown statistically significant ( $p = 0.5090$ ).

The sample pH optimised value was 7 and acid concentration for stripping Bi(III) from the column was left to the minimum value, 10% (v/v) HCl, in order to prevent microcolumn detriment. Then, when these parameters were fixed, buffers solutions in the range of optimised pH, were prepared and tested in order to improve the adjustment of sample pH for Bi(III) retention and find a reaction medium that can control the interferences at which Bi(III) is expected to be affected. A preliminary study of the effect of selected potential interferences on Bi(III) signal showed the necessity of doing this. To this end, four buffer solutions were prepared as follows: MES (pH range: 5.2–7.2), TRIS (pH range: 7.0–9.0), sodium phosphate (6.2–8.2) and potassium phthalate (pH range: 4.4–6.4) at  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$  concentration. Results are shown and discussed in the next Section.

### 3.3. Interference study

The determination of Bi(III) is prone to interferences in the presence of transition metals and hydride forming elements. The individual effects of potentially interfering metal species were assessed. The interference effects of metals such as Cd, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni and Zn on the generation of  $\text{BiH}_3$  were considered because these elements compete with the analyte for reduction and catalyse  $\text{NaBH}_4$  decomposition. Another group of typical interferents are volatile hydrides elements (Periodic Groups 14, 15 and 16).

As stated before, it was necessary to select an appropriate sample reaction media to better control the interferences on Bi signal. In this direction, several buffer solutions were tested. The best performance in terms of Bi signal was obtained in  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$  phthalate buffer but

the interferences were not completely controlled. When higher concentrations of this buffer were assessed we observed a significant reduction of the interferences for most elements. The best results were obtained with  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  potassium phthalate and it was selected as the best alternative for further work. Interference studies under the optimised working conditions were investigated and Table 3 summarises the results obtained. Variations over  $\pm 5\%$  in the analytical signal of Bi(III) in the presence of other elements were taken as an interference. All samples analysed contained  $5.0 \mu\text{g L}^{-1}$  Bi and the results are the average of three measurements. Enhancing effects were observed only for As (11.1 and 9.5%) and Sn (8.5 and 10.9%) while Cd, Ge, Pb and Te produced a slight depression on Bi signal ( $< 12\%$  in all cases).

### 3.4. Analytical performance and method accuracy

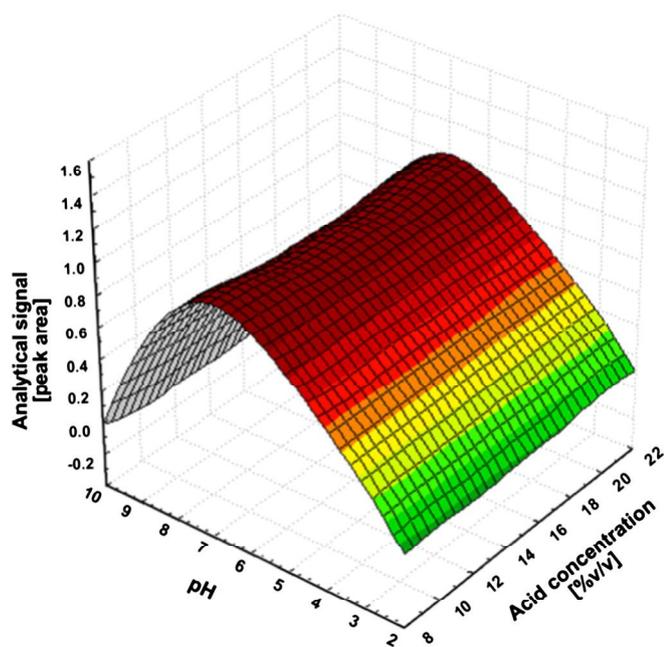
Under the selected physical and chemical variables detailed in the foregoing sections, the analytical performance of the FI-SPE-HG-AAS method using pro-MWCNTs for Bi(III) retention resulted as follows: the repeatability, expressed as relative standard deviation (RSD) was 1.5% for ten replicate measurements. The limit of detection (LOD) calculated as the concentration associated with three times the standard deviation of 10 independent measurements of the procedural blank (3 $\sigma$  criterion) was  $0.7 \text{ ng L}^{-1}$ . The limit of quantification (10 $\sigma$ ) resulted to be  $2.3 \text{ ng L}^{-1}$ . The calibration curve was linear from levels close to the LOD up to  $75 \text{ ng L}^{-1}$ . A good correlation coefficient has been obtained with  $R^2 = 0.997$ .

The sample throughput depends on the mode of operation and on the sample volume used for the analyte determination. The time required for the preconcentration of 5 mL of sample at  $3.2 \text{ mL min}^{-1}$  using an elution flow rate of  $8.8 \text{ mL min}^{-1}$  reading/data acquiring and conditioning was  $\sim 3$  min resulting in a sample throughput of 20 samples per hour. An enrichment factor (EF) of 160 for a sample volume

**Table 3**

Interferences of heavy metals and hydride forming elements in the determination of Bi(III). Results are percentage change in Bi signal ( $5 \mu\text{g Bi L}^{-1}$ ).

Interferent	Interferent concentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	Phosphate 0.01 M	MES 0.01 M	TRIS 0.01 M	Phthalate 0.01 M	Phthalate 0.1 M
As	10	0	-44.3	0	18.3	8.9
As	100	0	-34.0	0	17.4	10.0
Cd	10	-6.8	-33.2	-22.1	0	-6.7
Cd	100	-15.3	-20.2	-12.6	0	-7.7
Co	10	-18.2	-44.6	-29.0	0	0
Co	100	-12.6	-36.2	-20.2	-9.6	0
Cr	10	-53.9	-66.4	-27.4	-44.5	0
Cr	100	-56.1	-54.1	-13.1	-22.6	0
Cu	10	-20.1	-34.9	-19.1	-11.0	0
Cu	100	-34.6	-31.1	-18.7	-36.1	0
Fe	10	-66.4	-32.1	-31.7	-22.1	0
Fe	100	-69.2	-28.7	-52.6	-24.4	0
Ge	10	-18.2	-11.2	-28.7	-11.4	-7.0
Ge	100	-14.0	-6.8	-35.5	-7.9	-6.1
Hg	10	-25.1	-44.1	0	-8.2	0
Hg	100	-17.3	-31.9	0	-15.4	0
Mn	10	-13.4	-43.2	-19.9	-10.1	0
Mn	100	-11.6	-30.3	-17.7	-9.1	0
Ni	10	-7.9	-44.1	-14.0	-9.7	0
Ni	100	-14.9	-38.1	-10.0	-18.3	0
Pb	10	-20.6	-32.3	-11.6	-9.9	-9.4
Pb	100	-39.1	-22.2	-8.1	-11.3	-8.2
Sb	10	0	-12.7	-9.0	0	0
Sb	100	-11.6	-33.2	-8.9	-6.4	0
Se	10	-8.0	-39.6	-18.8	-7.5	0
Se	100	-14.2	-34.4	-14.9	-9.2	0
Sn	10	-9.4	-45.2	-9.0	-8.0	8.5
Sn	100	-15.3	-38.5	-8.9	-23.2	10.9
Te	10	-11.9	-39.1	-11.8	-15.3	-11.9
Te	100	-17.1	-34.4	-10.8	-16.2	-11.0
Zn	10	-27.8	-38.4	0	-17.4	0
Zn	100	-21.5	-29.3	0	-14.6	0



**Fig. 2.** Surface response of Bi(III) retention as a function of pH and acid concentration.

of 160 mL was obtained with respect to the Bi determination by FI–HG–AAS without preconcentration.

Accuracy test for the entire analytical procedure was performed by means of the Standard Reference Material (SRM) NIST 1643e (trace elements in water). Our results were in good agreement with the certified values as follows:  $14.09 \pm 0.15 \mu\text{g L}^{-1}$  Bi (certified) vs  $13.77 \pm 0.66 \mu\text{g L}^{-1}$  Bi (found).

### 3.5. Bismuth in different kind of waters

Information on Bi(III) levels in natural waters is scarce and with much dispersion in the data published. In this context, it is difficult to establish a range of typical concentrations in natural waters for comparative purposes. Table 4 summarises the results of this study for different categories of waters.

Bismuth was not detected in sea water. Even with discrepancies, compiled data stated a concentration of Bi(III) in sea water from different origins ranging from 10 to  $30 \text{ ng L}^{-1}$  [2]. Respect to tap water analysis, the situation is repeated and nor is it possible to find a probably range of concentrations. While in our study, Bi(III) was not detected in samples collected in two different sites; other authors reported levels significantly high. Using a chemically modified electrode for Bi(III) preconcentration prior to its quantification by voltammetry, Dong et al. [20] informed a mean concentration of Bi(III) in tap water of 48 nM (equivalent to  $16,500 \text{ ng L}^{-1}$ ).

River waters collected in Mendoza province showed concentrations between <LOD and  $178 \pm 8 \text{ ng L}^{-1}$  Bi. A wide range of levels of Bi(III) in river water was reported in the literature and concentrations up to  $12,000 \text{ ng L}^{-1}$  were informed for waters collected in Japan [21]. Also in Japan, in Takahashi river, a significant much lower concentration of  $2.08 \text{ ng L}^{-1}$  Bi was measured by ICP–MS and sample preconcentration [22].

Antarctic water collected at Carlini Station exhibited a concentration of  $166 \pm 8 \text{ ng L}^{-1}$ . This level appears to be high if we take into account the concentrations described above. However, Boswell and co-workers [23] determined several elements in high-saline Antarctic waters by a combined spectrochemical and solvent extraction procedure and reported concentrations of Bi(III) varying from <200 to  $7100 \text{ ng L}^{-1}$ .

In mine effluents we found low Bi(III) concentrations, up to  $81.0 \pm 2.4 \text{ ng L}^{-1}$ . Very few studies considered the determination of this element in mining effluents and again it is difficult to establish a range of concentrations for the comparison of results. In the vicinity of a Cu–W mine in Korea, Jung et al. [24] determined Bi(III) by ICP–OES with hydride generation in different environmental compartments.

**Table 4**  
Bismuth concentrations (expressed in  $\text{ng L}^{-1}$ ) in different kind of waters.

Sample	Bi concentration
Tap water (Córdoba)	<LOD
Tap water (Buenos Aires province)	<LOD
Sea water (Mar del Plata)	<LOD
Well water 1 (Buenos Aires province)	$23.5 \pm 1.1$
Well water 2 (Buenos Aires province)	$28.2 \pm 1.1$
River water 1 (Mendoza)	$178 \pm 8$
River water 2 (Mendoza)	<LOD
Thermal water (Entre Ríos)	$38.1 \pm 1.9$
Antarctic water (Carlini Station)	$166 \pm 8$
Mine effluent 1 (Córdoba)	$25.4 \pm 1.2$
Mine effluent 2 (Córdoba)	$2.58 \pm 0.09$
Mine effluent 3 (San Luis)	$3.12 \pm 0.09$
Mine effluent 4 (San Luis)	<LOD
Mine effluent 5 (San Luis)	$81.0 \pm 2.4$
Mine effluent 6 (Córdoba)	$226 \pm 12$
Mine effluent 7 (Córdoba)	$226 \pm 12$
Effluent water (Buenos Aires province)	$62.6 \pm 3.0$
Treatment plant (Buenos Aires province)	$1580 \pm 71$

Stream water samples contained concentrations varying from 300 to  $8400 \text{ ng L}^{-1}$  Bi.

To the best of our knowledge, for thermal waters the information is limited to one publication where waters and sediments from Santorini hydrothermal field, Greece were analysed in the framework of a geochemical study [25]. Even when Bi(III) was quantified by ICP–OES, concentrations  $<800 \text{ ng L}^{-1}$  were informed. In our study, we found a concentration of Bi(III) in thermal waters from the province of Entre Ríos of  $38.1 \pm 1.9 \text{ ng L}^{-1}$ .

## 4. Conclusions

The on-line combination of pro-MWCNTs and FI–HG–AAS is fully able to determine bismuth at  $\text{ng L}^{-1}$  levels. The detection power afforded by this analytical approach is completely adequate to comply with the concentrations of Bi usually expected in different kind of waters. Unfortunately, the detection limits of many studies reported in the literature are well above those required for Bi(III) determination in natural waters.

The mixture of pro-MWCNTs with a low molecular weight polyethylene wax (with no need for substrate immobilisation) avoided agglomerations and overpressures in the on-line system. The pro-MWCNTs microcolumn featured excellent chemical stability and retention efficiency without appreciating Bi(III) breakthrough for sample volumes of 250 mL, and with a long lifetime of up to 690 sorption/elution cycles.

Research work in our lab is underway to expanding the proposed preconcentration method to the use of other nanomaterials such as nanoporous carbons with controlled particle size for the determination of key pollutants in environmental matrices. Efforts will be addressed to the speciation analysis of elements of ecotoxicological interest.

## Acknowledgments

The authors thank Agustín Negri (Physics Department, CNEA) for providing the Antarctic water sample. PS thanks CONICET (Project PIP 486) and ANPCyT (Project PICT 1195) for funds. BP acknowledges Gustavo Lafogiannis for his kind cooperation.

## References

- [1] S.R. Taylor, Abundance of chemical elements in the continental crust: a new table, *Geochim. Cosmochim. Acta* 28 (1964) 1273–1285.
- [2] M. Filella, How reliable are environmental data on 'orphan' elements? The case of bismuth concentrations in surface waters, *J. Environ. Monit.* 12 (2010) 90–109.
- [3] M. Fayazi, D. Afzali, A. Mostafavi, Pre-concentration procedure using dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of bismuth by flame atomic absorption spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 26 (2011) 2064–2068.
- [4] A. Koper, M. Grabarczyk, Determination of bismuth by adsorptive stripping voltammetry using aluminum oxide for elimination of environmental sample matrix interferences, *Electroanalysis* 26 (2014) 697–703.
- [5] F. Fathirad, D. Afzali, A. Mostafavi, T. Shamspur, S. Fozooni, Fabrication of a new carbon paste electrode modified with multi-walled carbon nanotube for stripping voltammetric determination of bismuth(III), *Electrochim. Acta* 103 (2013) 206–210.
- [6] J. Marrero, S. Pérez Arisnabarreta, P. Smichowski, The effect of six reaction media on the determination of bismuth at trace levels in environmental samples by hydride generation and inductively coupled plasma–atomic emission spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 1875–1881.
- [7] N. Zhang, N. Fu, Z. Fang, Y. Feng, L. Ke, Simultaneous multi-channel hydride generation atomic fluorescence spectrometry determination of arsenic, bismuth, tellurium and selenium in tea leaves, *Food Chem.* 124 (2011) 1185–1188.
- [8] A. Calvo Fornieles, A. García de Torres, E.I. Vereda Alonso, J.M. Cano Pavón, Determination of antimony, bismuth and tin in natural waters by flow injection solid phase extraction coupled with online hydride generation inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 28 (2013) 364–372.
- [9] Y. Yamini, M. Chalooosi, H. Ebrahimzadeh, Solid phase extraction and graphite furnace atomic absorption spectrometric determination of ultra trace amounts of bismuth in water samples, *Talanta* 56 (2002) 797–803.
- [10] S. Şahan, Ş. Saçmacı, U. Şahin, A. Ülgen, Ş. Kartal, An on-line preconcentration/separation system for the determination of bismuth in environmental samples by FAAS, *Talanta* 80 (2010) 2127–2131.
- [11] N. Pourreza, K. Sheikhnajdi, Multi-walled carbon nanotube modified with 1-buthyl 3-methyl imidazolium hexafluoro phosphate supported on sawdust as a selective adsorbent for solid phase extraction of Bi(III), *Talanta* 99 (2012) 507–511.

- [12] P.H. Pacheco, R.A. Olsina, P. Smichowski, L.D. Martinez, On-line preconcentration and speciation analysis of inorganic vanadium in urine using L-methionine immobilised on controlled pore glass, *Talanta* 74 (2008) 593–598.
- [13] P.H. Pacheco, R.A. Gil, P. Smichowski, G. Polla, L.D. Martinez, On-line preconcentration and speciation analysis of inorganic vanadium in urine using L-methionine immobilised on controlled pore glass, *J. Anal. At. Spectrom.* 23 (2008) 397–401.
- [14] A.A. Menegário, P. Smichowski, P.S. Tonello, G. Polla, E.P. Oliveira, R.E. Santelli, On-line redox speciation analysis of antimony using L-proline immobilized on controlled pore glass and hydride generation inductively coupled plasma optical emission spectrometry for detection, *Anal. Chim. Acta* 625 (2008) 131–136.
- [15] P.H. Pacheco, R.A. Gil, P. Smichowski, G. Polla, L.D. Martinez, L-Tyrosine immobilized on multiwalled carbon nanotubes: a new substrate for thallium separation and speciation using stabilized temperature platform furnace-electrothermal atomic absorption spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 656 (2009) 36–41.
- [16] P.H. Pacheco, P. Smichowski, G. Polla, L.D. Martinez, Solid phase extraction of Co ions using L-tyrosine immobilized on multiwall carbon nanotubes, *Talanta* 79 (2009) 249–253.
- [17] M. Savio, B. Parodi, L.D. Martinez, P. Smichowski, R.A. Gil, On-line solid phase extraction of Ni and Pb using carbon nanotubes and modified carbon nanotubes coupled to ETAAS, *Talanta* 85 (2011) 245–251.
- [18] B. Parodi, M. Savio, L.D. Martinez, R.A. Gil, P. Smichowski, Study of carbon nanotubes and functionalized-carbon nanotubes as substrates for flow injection solid phase extraction associated to inductively coupled plasma with ultrasonic nebulization. Application to Cd monitoring in solid environmental samples, *Microchem. J.* 98 (2011) 225–230.
- [19] B. Parodi, A. Londonio, G. Polla, M. Savio, P. Smichowski, On-line flow injection solid phase extraction using oxidised carbon nanotubes as the substrate for cold vapour-atomic absorption determination of Hg(II) in different kinds of water, *J. Anal. At. Spectrom.* 29 (2014) 880–885.
- [20] K.L. Dong, L. Kryger, J.K. Christensen, K.N. Thomsen, Preconcentration and determination of bismuth (III) at a chemically modified electrode containing 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol, *Talanta* 38 (1991) 101–105.
- [21] W. Yoshimura, X.D. Liu, A. Uzawa, Determination of trace amounts of bismuth in natural water by means of coprecipitation with zirconium hydroxide and differential pulse anodic stripping voltammetry, *Bunseki Kagaku* 44 (1995) 1071–1076.
- [22] K. Oshita, O. Noguchi, M. Oshima, S. Motomizu, Synthesis of cross-linked chitosan modified with the glycine moiety for the collection/concentration of bismuth in aquatic samples for ICP-MS determination, *Anal. Sci.* 23 (2007) 1203–1208.
- [23] C.R. Boswell, R.R. Brooks, A.T. Wilson, Some trace elements in lakes of McMurdo Oasis, Antarctica, *Geochim. Cosmochim. Acta* 31 (1967) 731–736.
- [24] M.C. Jung, I. Thornton, H.-T. Chon, Arsenic, Sb and Bi contamination of soils, plants, waters and sediments in the vicinity of the Dalsung Cu–W mine in Korea, *Sci. Total Environ.* 295 (2002) 81–89.
- [25] S.P. Varnavas, D.S. Cronan, Arsenic, Antimony and Bismuth in sediments and waters from the Santorini Hydrothermal Field, Greece, *Chem. Geol.* 67 (1988) 295–305.

# On-line flow injection solid phase extraction using oxidised carbon nanotubes as the substrate for cold vapour-atomic absorption determination of Hg(II) in different kinds of water

Cite this: *J. Anal. At. Spectrom.*, 2014, 29, 880

Belén Parodi,<sup>ab</sup> Agustín Londonio,<sup>bc</sup> Griselda Polla,<sup>d</sup> Marianela Savio<sup>e</sup> and Patricia Smichowski<sup>\*cf</sup>

A study was carried out to investigate the concentrations of Hg(II) in different categories of water samples at ng L<sup>-1</sup> levels. The capabilities of oxidised carbon nanotubes (ox-CNTs) were studied to assess if this substrate serves as an efficient material for Hg(II) preconcentration using an on-line flow injection cold vapour-atomic absorption spectrometry (FI-CV-AAS) system. Carbon nanotubes are characterized by a marked tendency to aggregate, which negatively affects the retention of Hg whenever integrated in flow systems as a packed column. For this reason, the preconcentration was carried out in a microcolumn filled with a mixture of ox-CNTs and a low molecular weight polyethylene. The preparation of the microcolumn was studied in detail. Concerning column design, the best performance was achieved when packing the substrate in a microcolumn of 2.25 mm (i.d.) × 20 mm length. The effect of chemical and physical parameters including the pH of the solutions, the eluent type and the concentration was systematically examined. Mercury was retained at pH 5.0 and 15% (v/v) HCl was the best alternative for Hg(II) elution. Under optimal conditions, the adsorption capacity of the substrate was found to be 3.2 mg g<sup>-1</sup> reaching a preconcentration factor (PF) of 150. The high adsorption capacity of this substrate allowed reaching a detection limit (3σ) of 1.9 ng L<sup>-1</sup>, when using a sorbent column containing only 1.0 mg of ox-CNTs. The limit of quantification (10σ) resulted to be 6.3 ng L<sup>-1</sup>. Precision, expressed as relative standard deviation (RSD), turned out to be 1.6% at the 0.1 μg L<sup>-1</sup> level (*n* = 8). The system was evaluated for quantitative determination of Hg in river water, sea water and effluents.

Received 19th December 2013  
Accepted 13th February 2014

DOI: 10.1039/c3ja50396h

www.rsc.org/jaas

## Introduction

Different sources are responsible for the presence of toxic elements such as Hg in environmental matrices. In urban areas, coal burning, refining, cement production, smelters, transportation, municipal solid waste incineration, and different kinds of industries are responsible for the major inputs of anthropogenic emission of Hg.<sup>1,2</sup> Mercury is also emitted by

natural sources namely volatilisation of Hg<sup>0</sup> from surface waters, emissions from volcanoes, and degassing of Hg from top soil and vegetation.<sup>3</sup> Studies carried out in size-classified road dust demonstrated that in Buenos Aires Hg is a traffic related element (TRE).<sup>4</sup> It was mostly accumulated in the smaller fraction of road dust and its presence was linked with the exhaust of liquid fuel combustion from vehicles.

In natural waters, Hg concentrations are extremely low (ppt levels) which require the use of a very sensitive technique such as inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for its quantification. However, direct analysis of sea water samples by ICP-MS presents some difficulties due to the high saline content.<sup>5</sup> The alternative of sample dilution has the risk that the sensitivity of the technique is not enough for its quantification at the concentrations typically found in sea water.

Cold vapour atomic absorption spectrometry (CV-AAS) and CV-atomic fluorescence spectrometry (AFS) have been demonstrated to be appropriate techniques for Hg determination.<sup>6</sup> Notwithstanding an impressive number of analytical advantages, CV-AAS has a drawback that its detection power is sometimes inadequate to comply with the requirements posed by the

<sup>a</sup>Instituto Nacional de Tecnología Industrial, Centro de Investigación y Desarrollo en Mecánica, Av. General Paz 5445, B1650KNA-San Martín, Buenos Aires, Argentina

<sup>b</sup>Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental (3iA), Universidad de San Martín, Peatonal Belgrano 356, San Martín, Buenos Aires, Argentina

<sup>c</sup>Comisión Nacional de Energía Atómica, Gerencia Química, Av. Gral Paz 1499, B1650KNA-San Martín, Buenos Aires, Argentina. E-mail: smichows@cnea.gov.ar; Fax: +54 11 6772 7886; Tel: +54 11 6772 7873

<sup>d</sup>Comisión Nacional de Energía Atómica, Gerencia Investigación y Aplicaciones, Av. Gral Paz 1499, B1650KNA-San Martín, Buenos Aires, Argentina

<sup>e</sup>Instituto de Química de San Luis (UNSL-CONICET), Área de Química Analítica, Facultad de Química Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis, Chacabuco y Pedernera, D5700BWQ-San Luis, Argentina

<sup>f</sup>Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Av. Rivadavia 1917, C1033AAJ-Buenos Aires, Argentina

determination of Hg in some environmental matrices such as water. Therefore, it is not surprising that alternative ways to exploit the potential of this technique has been its combination with preconcentration systems involving specific substrates. In this way, the coupling of a microcolumn, filled with an effective substrate, with flow injection-cold vapour-atomic absorption spectrometry (FI-CV-AAS) offers the possibility of reaching very low detection limits and acceptable throughput at a reasonable cost. This approach is a widely accepted and applied sample preparation technique due to its simplicity, offering relatively fast extraction and preconcentration capabilities particularly attractive for avoiding the use of solvents. The appropriate selection of the sorbent is one of the most critical steps in solid phase extraction (SPE) method development. As substrates, carbon nanotubes (CNTs) have demonstrated to be an effective sorbent for metallic and organometallic compound preconcentrations.<sup>6–8</sup> Their large sorption capacity is linked to the distortion of plane graphene sheets into a helical or cylindrical fashion. The main adsorption mechanism of metal ions onto CNTs is considered to be surface complexation with functional groups, so the performance is mainly determined by the nature and the concentration of these groups. In addition, the surface of CNTs can be easily modified, resulting in functionalised adsorbents with distinctive properties.<sup>9</sup>

Considering the above advantages, it was deemed of interest to further investigate the capabilities of ox-CNTs as a new substrate for Hg(II) determination using an on-line SPE procedure involving its coupling with FI-CV-AAS. The main factors influencing preconcentration and determination of Hg(II) were examined thoroughly, and they included characteristics of the microcolumn, sample pH, sample flow rate and volume, and eluent concentration and flow rate. The conditions were established and Hg(II) determination in different kinds of water was successfully carried out reaching a high preconcentration factor.

## Experimental

### Instrumentation and reagents

A PerkinElmer (Norwalk, CT, USA) Analyst 200 atomic absorption spectrometer provided with a quartz cell in an electrically

heated mantle, in conjunction with a PerkinElmer Flow Injection Analysis System (FIAS 100), was used for Hg(II) determination. The gas-liquid separator (PerkinElmer) is a modular 'building block'-type made from chemically resistant plastic with an exchangeable PTFE membrane placed in the screw cap of the separator. An additional peristaltic pump, Minipuls 3 from Gilson (Villiers-Le-Bel, France), was used to deliver the sample. Connections among components were made with 1.0 mm (i.d.) Teflon tubing. Tygon type pump tubing with an internal diameter of 1.52 mm, 1.14 mm and 1.14 mm (Ismatec, Cole Parmer, Vernon Hills, IL, USA) was employed to propel reagents, eluent, reductant and sample, respectively. The experimental set-up of on-line preconcentration of Hg(II) is depicted in Fig. 1.

A mercury electrodeless discharge lamp (PerkinElmer) operating at a current of 190 mA and a wavelength of 253.7 nm with a spectral band pass of 0.7 nm was used. Instrumental details and operating conditions are summarized in Table 1.

Deionised distilled water (DDW) was produced using a commercial mixed-bed ion-exchange system Barnstead (Dubuque, IA, USA) fed with distilled water. All reagents were of analytical grade and the presence of Hg was not detected within the working range. Commercially available 1000 mg L<sup>-1</sup> standard solutions (Merck, Darmstadt, Germany) of Hg were used. Diluted working solutions were prepared daily by serial dilutions of the stock solution. Sodium tetrahydroborate(III) solution was prepared daily by dissolving NaBH<sub>4</sub> (Merck) in DDW, stabilizing in 0.1% (w/v) NaOH (Merck) and filtering through Whatman no. 42 filter-paper to eliminate turbidity. The resulting solution was stored in a polyethylene flask at 4 °C. The cation solutions used in the study of interference were prepared from analytical-reagent grade chemicals.

All glassware and plastic bottles used were cleaned by rinsing with deionised distilled water, soaking with a 10% (v/v) nitric acid solution for 24 h and then rinsing several times with deionised water. All standards were stored in polyethylene bottles (50 mL) or Falcon® tubes (Corning Inc., Tewksbury, MA, USA).

### Sample collection and treatment

Water samples were collected from different sites in Argentina. They include river water, sea water, effluents from mining

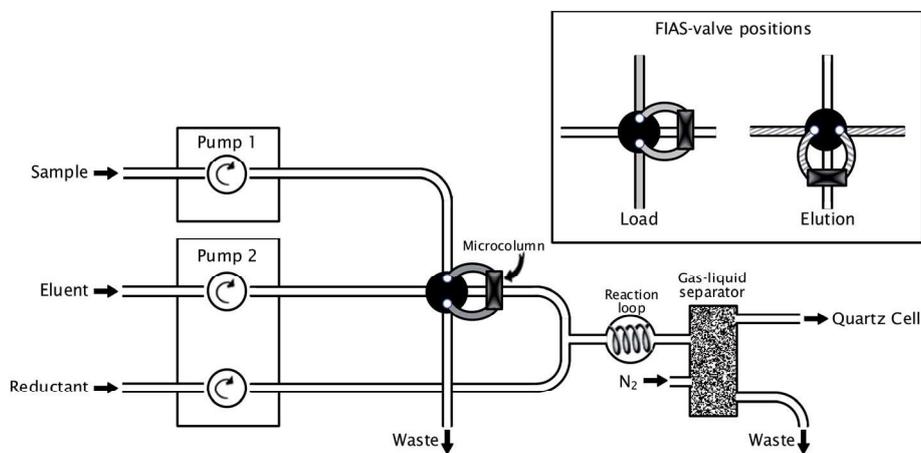


Fig. 1 Operational scheme of the FI-CV-AAS system used for Hg preconcentration.

**Table 1** Characteristics of the FI-CV-AAS system for determination of Hg

Instrument characteristics and settings	
Cell temperature	110 °C
EDL lamp current	190 mA
Measurement mode	Peak area
Slit width	0.7 nm
Wavelength	253.7 nm
Cold vapour generation	
NaBH <sub>4</sub> concentration	0.2% (w/v); NaOH 0.1% (w/v)
Reductant flow rate	5.5 mL min <sup>-1</sup>
Hydrochloric acid flow rate	10 mL min <sup>-1</sup>
Hydrochloric acid concentration	15% (v/v)
Carrier gas (N <sub>2</sub> ) flow rate	30 mL min <sup>-1</sup>

activities and effluents from a treatment plant. In addition, a water sample collected from Antarctica was analysed. This sample was collected at the Carlini Station (ex Jubany), 25 de Mayo Island (62° 14' 18" S 58° 40' 0" W).

Collected samples were placed in poly(ethylene terephthalate) (PET) bottles previously cleaned with 10% HNO<sub>3</sub>. Antarctic water was collected in a Teflon® flask. Samples were transported to the laboratory and stored in a dry and dark place until analysis. The sea water, river water and effluent samples were filtered through 0.45 µm polyvinylidene fluoride syringe filters (Waters Corp., Milford, MA, USA) and just before the pre-concentration step, the pH was adjusted to the corresponding optimum value. Samples were analysed as soon as it was possible. Fadini and Jardim studied and compared the use of Teflon® and PET bottles for sampling and storage of water samples prior to Hg determination.<sup>10</sup> They reported that undetectable levels of contamination, either by leaching from sampling vessels or metal losses, were detected when these materials were tested for mercury.

An issue of concern is the presence of Hg in the water samples in the form of various inorganic and organic species. Different oxidising agents, mixtures and procedures were reported for sample treatment.<sup>11–13</sup> In this study, samples were irradiated for 0.5 h with a 78 W UV lamp in order to photo-oxidise organo-Hg compounds.

### Substrate and microcolumn preparation

The most used, effective and simple modification of CNTs is their oxidation using acids. The application of extreme conditions leads to the opening of the tube caps and the subsequent formation of holes in the side walls and, as a consequence, oxygen functional groups (*e.g.*, -OH, -C=O, -COOH) are created.<sup>14</sup> Oxidation of CNTs was carried out in a mixture of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : HNO<sub>3</sub> (3 : 1). Carbon nanotubes were soaked for 2 h in an ultrasound bath and then placed in a water bath at 55 °C for 7 h. The resulting ox-CNTs were dialyzed with DDW until complete elimination of the residual acid. The oxygen-containing groups created on the CNT surface increase their

solubility in polar media. After this step, ox-CNTs were filtered and dried at room temperature.

A mixture of ~1.0 mg of ox-CNTs and 10 mg of tiny pellets of a low molecular weight polyethylene wax namely Epolene® (Eastman Chemical Products, Inc., Kingsport, TN, USA) was packed in a home-made microcolumn (20 mm length × 2.25 mm i.d. with a net length of the substrate of 5.5 mm and a nominal microcolumn capacity of ~22 µL) using the dry packing method. Several column dimensions were tested and the best results in terms of Hg(II) retention and quantitative elution were achieved with a microcolumn of the mentioned dimensions. The microcolumn was then connected to the system with PTFE tubing to form the preconcentration system. The microcolumn was preconditioned by the blank solution prior to each cycle. After the elution, the ox-CNTs were washed with 0.5 mL of 15% (v/v) HCl solution and then with 2.0 mL of DDW.

## Results and discussion

### Characteristics of the column and the filling material

The preparation and dimensions of the microcolumn is a key topic when CNTs are used as the filling material. Screening experiments showed that the characteristics of the sorbent and the column geometry greatly influenced the Hg(II) preconcentration efficiency. On the other hand, it is known that CNTs are characterised by a marked tendency to aggregate, which negatively affects the retention of different elements whenever packed in a microcolumn and integrated in a flow system. Tests were undertaken to exploit if ox-CNTs packed in different home-made microcolumns and inserted in the flow-through system were adequate for Hg(II) preconcentration. The experiments showed limited success because of the high backpressure reached and consequently resulting in poor analytical performance. To surmount this limitation, Boonjob *et al.*<sup>15</sup> proposed an ingenious approach using a microsolid-phase extraction procedure based on the insertion of a dedicated stirred-flow sorptive microchamber integrated in a fully automated sequential injection (SI) assembly for expedient handling and reuse of carbon nanoparticles. In order to find a simpler procedure for Hg(II) preconcentration while avoiding further nanomaterial functionalisation, the mixture of ox-CNTs and a material with polymeric characteristics as a filling material was assessed as a new alternative to avoid ox-CNT aggregation.

We performed a careful evaluation of the optimum dimensions of the microcolumn and especially the characteristics of the filling material. These tests demonstrated that to reach an efficient Hg(II) preconcentration as well as higher and thinner peaks, a good compromise was (i) using a small microcolumn of 2.25 mm (i.d.) × 20 mm (ox-CNTs net length: 55 mm) and (ii) carefully assessing the filling material and the way of packing it. We decided to pack the microcolumn with a mixture of ox-CNTs and inert microparticles of a low molecular weight polyethylene wax (Epolene®) to avoid sorbent aggregation and an unacceptable high back-pressure due the tight packing of the filling material. Epolene® is a low-density polyethylene wax that offers good high-temperature stability, low colour, low-temperature

flexibility, and very good compatibility with the use of mineral acids. According to our experiments, the optimal proportion was ~90% of Epolene® and ~10% of ox-CNTs. In addition to the lack of aggregation, microcolumns resulted to be even better in terms of peak sharpness. To check that Hg(II) was not retained by the low molecular weight polyethylene wax, a test microcolumn was filled only with ~10 mg of this material and inserted into the preconcentration system. No Hg(II) retention was observed which evidenced that Hg(II) was retained by ox-CNTs and not by Epolene®.

Epolene® is a substrate with some interesting characteristics: about 75% of the particles have a particle size of ~800 µm with significant dispersion in particle sizes and shapes which contributes to avoiding ox-CNT aggregation. Particle size distribution of Epolene® was studied by laser diffraction using a Malver Mastersizer 2000® instrument (Malvern Instruments Limited, Malvern, UK). Five consecutive measurements were made of the two samples and the results averaged to produce the overall size distribution. In Fig. 2 it is shown that the percentage of particles, by volume, is between 1–2000 µm. No particles <1 µm were detected in the sample analyzed of Epolene®. The scanning electron micrograph of Epolene® (Fig. 3a) exhibits a typical morphology of the polymer. Fig. 3b and c show the distribution of ox-CNTs onto one particle of Epolene® at two magnifications. It is important to emphasise the significant dispersion of the nanotubes on the particle with the preservation of their backbone after 450 cycles of Hg(II) preconcentration.

The selection of the chemical and physical parameters influencing Hg(II) retention was studied in order to achieve appropriate sensitivity, selectivity and precision for the subsequent mercury determination at low concentration in water samples.

### Influence of pH on Hg(II) retention on ox-CNTs

The pH value of the sample solution plays a crucial role in sorption of different ions on ox-CNTs.<sup>16,17</sup> The sorption of metal ions on ox-CNTs increases as pH increases because the ox-CNT surface becomes more deprotonated, causing electrostatic interactions between metal ions and oxygen functional groups (–COO– and –O–). In this context, the isoelectric point (IEP) of ox-CNTs shifts to lower pH values. When the pH of the solution is higher than the IEP of the ox-CNTs, the negative charge on the surface provides electrostatic attractions that are favourable for adsorbing cations. The decrease of pH leads to the

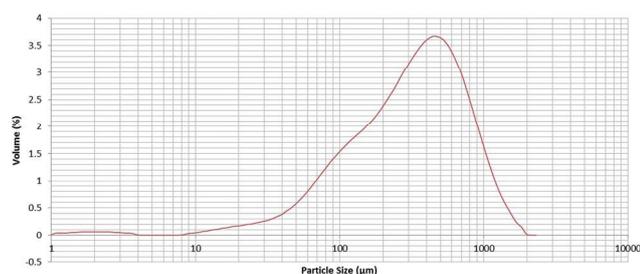


Fig. 2 Average particle size distribution of Epolene®.

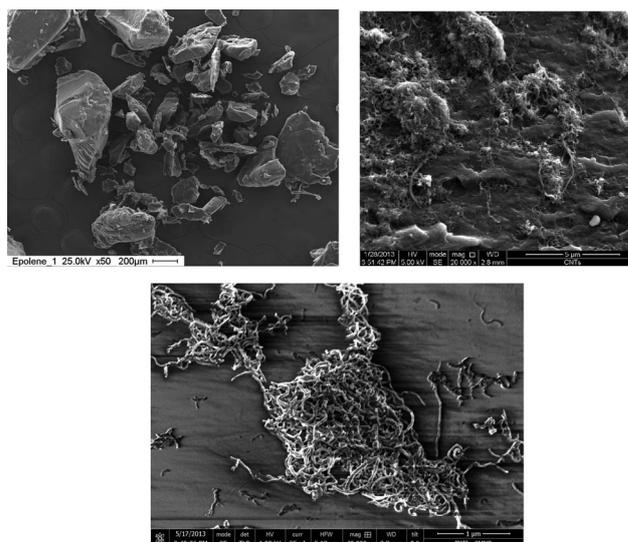


Fig. 3 (a) Scanning electron micrograph of Epolene®; (b and c) scanning electron micrographs of one particle of Epolene® with ox-CNTs after 450 cycles of Hg preconcentration ((b): 20 000× and (c): 40 000×).

neutralisation of surface charge, so the adsorption of cations onto ox-CNTs decreases quickly.

In order to evaluate the effect of pH, a series of sample solutions of Hg(II) of 0.5 µg L<sup>-1</sup> were adjusted to different pH values (between 1.0 and 9.0) and the preconcentration/elution was carried out. Aliquots of Hg(II) solutions of 1.0 mL were loaded on the microcolumn at a flow rate of 1.7 mL min<sup>-1</sup>. In order to optimise the sorption conditions for the retention of Hg(II) on the sorbent, the peak area was recorded as a function of the pH. Mercury was retained in all the wide range of pHs tested and retention was maximum at pH 5. Beyond this pH a noticeable decrease in the adsorption is advised. At pHs higher than 8, the decrease of Hg(II) adsorption may be attributed to metal hydrolysis. According to these findings, pH 5 was selected for further experiments.

### Eluent type and concentration

Hydrochloric acid was tested as an eluent to promote Hg(II) desorption from the sorbent material. The elution step involves exchange between analyte ions and H<sup>+</sup>. In addition chloride ions could remove mercury ions by forming HgCl<sub>2</sub>.<sup>18</sup>

Hydrochloric acid was examined within a wide range of concentration ranging from 1.0 to 20% (v/v). Maximum absorbance readouts for Hg were recorded at a concentration of 15% (v/v). A transient signal was obtained and the peak area was proportional to Hg(II) concentration in the loaded solution.

### Influence of sample volume

The effect of sample volume was also investigated on the recorded Hg signal. To this end, the mass of the analyte was kept constant but the increasing sample volume (2 mL to 200 mL) was examined. This test showed no influence of sample volume on the Hg signal in the range of concentrations examined.

### Loading and elution flow rate

In flow sorptive on-line preconcentration systems, the loading flow rate and loading time are crucial variables to which the sensitivity of the method and the preconcentration factor are directly related. Beyond being one of the steps that controls the time of analysis, the rate of the sample through the microcolumn, it influences the time of contact between the analyte and the active sites (edges) and consequently the microcolumn capacity. The effect of loading flow rate on Hg absorbance was studied in the range of 0.5–2.7 mL min<sup>-1</sup> and the elution flow rate was kept constant at 10 mL min<sup>-1</sup>. Experimental results revealed that the analytical signal increased continuously given a maximum at 1.75 mL min<sup>-1</sup> and then diminished progressively. An almost linear increase of the absorbance within the assayed range reveals a very fast mass transfer onto the ox-CNTs that ensures quantitative uptake of the analyte. This is without doubt an advantage because elevated enrichment factors are expected to be obtained in high-throughput assays. A flow rate of 1.75 mL min<sup>-1</sup> sufficed for obtaining reasonable low sample consumption. It was not necessary to work at lower loading flow rates because no increase of the back pressure was observed.

The influence of the stripping flow rate upon desorption and detection of mercury was also examined within the range of 6.5–10 mL min<sup>-1</sup>. No significant differences were observed in the range of flow rates examined. A flow rate of 10 mL min<sup>-1</sup> was adopted for further study.

### Microcolumn re-use studies

The stability and regeneration of the microcolumn were also investigated. The microcolumn can be re-used after regeneration with 10 mL of 15% HCl and then with ultrapure water. The microcolumn was stable without either deterioration or decrease in Hg(II) recovery. This study comprised at least 450 preconcentration cycles and no decrease in capacity of the microcolumn was observed.

### Interference study

The determination of Hg is prone to interference in the presence of transition metals and hydride forming elements. The individual effects of potentially interfering metal species were assessed. The interference effects of metals such as Cd, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni and Zn on the generation of Hg vapour were considered because these elements compete with the analyte for reduction and catalyse NaBH<sub>4</sub> decomposition. Another group of typical interferents are volatile hydride elements (periodic group 14, 15 and 16).

Interference studies under optimised working conditions were investigated. Variations over ±5% in the analytical signal of Hg in the presence of other elements were taken as interference. All samples analysed contained 2.5 µg L<sup>-1</sup> Hg(II) and the results are the average of three measurements. Results are summarised in Table 2. Enhancing effects were observed for Bi and Mn while As, Al, Fe, Mo and Sb produced a depression on the Hg signal (<11.5 in all cases).

### Analytical performance and method accuracy

Under the selected physical and chemical variables detailed in the foregoing sections, the analytical performance of the FI-SPE-CV-AAS method using ox-CNTs for Hg(II) retention resulted as follows: the repeatability, expressed as relative standard deviation (RSD), was 1.6% for ten replicate measurements; the limit of detection (LOD), calculated as the concentration associated with three times the standard deviation of 10 independent measurements of the procedural blank (3σ criterion) was 1.9 ng L<sup>-1</sup>; the limit of quantification (10σ) resulted to be 6.3 ng L<sup>-1</sup>; the calibration curve was linear from levels close to the limit of quantification (LOQ) upto 500 µg L<sup>-1</sup>. A good correlation coefficient has been obtained with R<sup>2</sup> = 0.998.

The sample throughput depends on the mode of operation and on the sample volume used for the analyte determination. The time required for the preconcentration of 4 mL of sample at 1.75 mL min<sup>-1</sup>, using an elution flow rate of 10 mL min<sup>-1</sup>, reading/data acquiring and conditioning was about 3 min, resulting in a sample throughput of 20 samples per hour. An enrichment factor (EF) of 150 for a sample volume of 200 mL was obtained with respect to the Hg determination by FI-CV-AAS without preconcentration.

The Certified Reference Material (CRM) SLRS-5 (River water Reference Material for Trace Metals (NRCC, Ottawa, Canada)) available in our laboratory does not report either certified or informative values for Hg. Consequently, to obtain at least recovery data, known amounts of Hg(II) standards were added to the different real water samples. An aliquot of 10 mL of the spiked samples was preconcentrated in the FI system and a plot of the recovered concentrations *versus* added concentrations was obtained (three replicates of each concentration were analysed). Although they cannot replace the accuracy test, some information is gained about the good performance of the effective control of phenomena of contamination, absorption, and losses on the FI-tubing walls. The average recoveries obtained ranged from 96 to 103%. Table 3 shows the results of

**Table 2** Interference of heavy metals and hydride forming elements in the determination of Hg(II) by CV-AAS. Results are percentage change in Hg signal (Hg: 2.5 µg L<sup>-1</sup>; NaBH<sub>4</sub>: 0.2%)

Species	Interferent concentration (mg L <sup>-1</sup> )	% variation
Al(III)	10	-11.0
As(III)	5	-10.4
Bi(III)	5	11
Cd(II)	5	0
Cu(II)	10	0
Fe(III)	10	-11.0
Mn(II)	10	9.7
Mo(VI)	5	-11.1
Ni(II)	5	0
Pb(II)	5	0
Sb(III)	10	-10.2
Se(IV)	10	0
Sn(II)	10	0
Zn(II)	10	0

**Table 3** Recovery test for different kinds of water samples. Concentrations are expressed in  $\mu\text{g L}^{-1}$

Sample	Hg added	Hg found	Recovery (%)
CRM SLRS-5	2.0	$1.94 \pm 0.03$	97
Tap water (Buenos Aires)	1.5	$1.52 \pm 0.02$	101
Well water (Córdoba)	1.2	$1.22 \pm 0.02$	101
Well water 1 (Buenos Aires province)	1.0	$1.05 \pm 0.02$	105
Well water 2 (Buenos Aires province)	2.0	$1.92 \pm 0.03$	96
Antarctic water (Carlini Station)	1.5	$1.54 \pm 0.03$	103

the recovery test for samples spiked with different  $\text{Hg(II)}$  concentrations.

#### Mercury concentrations in different kinds of water samples

Different categories of water samples were collected from different places in Argentina and were analysed by means of the proposed preconcentration system by following the procedure already described in the Experimental section. In most water samples  $\text{Hg(II)}$  levels were below the detection limit. The analytical results obtained for three real water samples containing  $\text{Hg(II)}$  are (in  $\text{ng L}^{-1}$ ) as follows: (1) sea water:  $330 \pm 8$  (Mar del Plata); (2) river water (Buenos Aires):  $85.0 \pm 1.5$ ; (3) municipal effluent:  $342 \pm 8$  (Buenos Aires province); and (4) effluent from mining activities:  $514 \pm 10$  (Córdoba province). Mercury concentration values for the real samples were obtained by a standard addition technique (three replicates).

## Conclusions

On the basis of the findings of this study, the preconcentration of  $\text{Hg(II)}$  using ox-CNTs in combination with FI-CV-AAS resulted in a fully adequate method for determining mercury in water samples at  $\text{ng L}^{-1}$  levels. Taking into account the extremely low levels of mercury in water samples, a preconcentration step is necessary when a technique such as CV-AAS, available in most laboratories, is used for detection.

The mixture of ox-CNTs with a low molecular weight polyethylene wax (with no need for substrate immobilization) avoided agglomerations and overpressures in the on-line system. The ox-CNT microcolumns featured excellent chemical stability and retention efficiency without appreciable  $\text{Hg(II)}$  breakthrough for sample volumes of 200 mL, and with a long lifetime of up to 450 sorption per elution cycle.

This method is rapid, simple and sensitive and can be considered as a low cost alternative, in comparison with other techniques such as ICP-MS, to analyse waters with complex matrices such as sea water and effluents.

Research work in our lab is underway to expand the proposed preconcentration method to other nanomaterials or composites and analytes/species for the determination of key pollutants in environmental matrices.

## Acknowledgements

The authors thank Agustín Negri (Physics Department, CNEA) for providing the Antarctic water sample. PS thanks CONICET (Project PIP 486) and ANPCyT (Project PICT 1195) for funds. BP acknowledges Gustavo Lafogiannis for his kind cooperation.

## References

- 1 H. Biester, G. Mueller and H. F. Schoeler, *Sci. Total Environ.*, 2002, **284**, 177–189.
- 2 F. M. G. Tack, T. Vanhaesebroeck, M. G. Verloo, K. V. Rompaey and E. V. Rannst, *Environ. Pollut.*, 2005, **134**, 173–179.
- 3 N. Pirrone, P. Costa, J. M. Pacyna and R. Ferrara, *Atmos. Environ.*, 2001, **35**, 2997–3006.
- 4 A. Londonio, F. Fujiwara, R. Jiménez Rebagliati, D. Gómez and P. Smichowski, *Microchem. J.*, 2012, **105**, 77–82.
- 5 L. R. Bravo-Sánchez, B. San Vicente de la Riva, J. M. Costa-Fernández, R. Pereiro and A. Sanz-Medel, *Talanta*, 2001, **55**, 1071–1078.
- 6 X. Shang, *At. Spectrosc.*, 2007, **28**, 35–40.
- 7 P. Liang, Y. Liu, J. Zeng and H. Lu, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, **19**, 1489–1492.
- 8 A. Stafie and K. Pyrzynska, *Microchem. J.*, 2008, **89**, 29–33.
- 9 J. Muñoz, M. Gallego and M. Valcárcel, *Anal. Chem.*, 2005, **77**, 5389–5395.
- 10 P. S. Fadini and W. F. Jardim, *Analyst*, 2000, **125**, 549–551.
- 11 B. Welz, D. L. Tsalev and M. Sperling, *Anal. Chim. Acta*, 1992, **261**, 91–103.
- 12 J. L. Capelo, I. Lavilla and C. Bendicho, *Anal. Chem.*, 2000, **72**, 4979–4984.
- 13 J. C. A. de Wuilloud, R. G. Wuilloud, M. F. Silva, R. A. Olsina and L. D. Martínez, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2002, **57**, 365–374.
- 14 R. Sitko, B. Zawisza and E. Malicka, *Trends Anal. Chem.*, 2012, **37**, 22–31.
- 15 W. Boonjob, M. Miró, M. A. Segundo and V. Cerdá, *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 5237–5244.
- 16 R. A. Gil, S. Pasini-Cabello, A. Takara, P. Smichowski, R. Olsina and L. D. Martínez, *Microchem. J.*, 2007, **86**, 156–160.
- 17 V. Datsyuk, M. Kalyva, K. Pepagelis, D. Tasis, A. Siokou, L. Kallitsis and C. Galiotis, *Carbon*, 2008, **46**, 833–840.
- 18 K. Pillay, E. M. Cukrowska and N. J. Coville, *Microchem. J.*, 2013, **108**, 124–130.



## On-line solid phase extraction of Ni and Pb using carbon nanotubes and modified carbon nanotubes coupled to ETAAS

Marianela Savio<sup>a</sup>, Belén Parodi<sup>b,c</sup>, Luis D. Martinez<sup>a</sup>, Patricia Smichowski<sup>d,e,\*\*</sup>, Raúl A. Gil<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Química de San Luis (CCT-San Luis)-Área de Química Analítica, Facultad de Química Bioquímica y Farmacia Universidad Nacional de San Luis, Chacabuco y Pedernera, D5700B WQ-San Luis, Argentina

<sup>b</sup> Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI), Centro de Investigación y Desarrollo en Mecánica, Colectora de Avenida General Paz 5445, B1650KNA-San Martín, Buenos Aires, Argentina

<sup>c</sup> Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental, Universidad de San Martín, Belgrano 3565, B1650KNA-San Martín, Argentina

<sup>d</sup> Comisión Nacional de Energía Atómica, Gerencia Química, Av. Gral Paz 1499, B1650KNA-San Martín, Buenos Aires, Argentina

<sup>e</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Av. Rivadavia 1917, C1033AAJ-Ciudad de Buenos Aires, Argentina

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 15 February 2011

Received in revised form 15 March 2011

Accepted 23 March 2011

Available online 6 April 2011

#### Keywords:

Ni

Pb

FI-SPE-ETAAS

Carbon nanotubes

Oxidized carbon nanotubes

L-Alanine aminoacid

### ABSTRACT

A study about the capabilities of three kinds of nanomaterials namely, carbon nanotubes (CNT), oxidized carbon nanotubes (ox-CNT) and L-alanine immobilized on carbon nanotubes (ala-CNT) to serve as sorbents for preconcentrating Ni and Pb using an on-line system coupled to electrothermal atomic absorption spectroscopy (ETAAS) technique, was accomplished. The solid phase extraction was performed in a conical minicolumn used as sorbent holder. After loading a fixed volume of the analytes, they were eluted with a discrete volume (50  $\mu\text{L}$ ) of nitric acid, placed directly into the platform of a L'Vov tube. After that, each analyte was determined individually. Ni and Pb retention was strongly influenced by pH but exhibiting different behaviors. The study demonstrated that the sorbent based on ox-CNTs was the one that exhibited the highest capacity and linearity for both analytes when compared with CNT or ala-CNT. The analytical performance was evaluated for the three sorbents to establish the best conditions regarding sensitivity, reproducibility and accuracy. The precision expressed as relative standard deviations ( $n=6$ ) were 3.9 and 0.5% for  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$ , respectively. The limit of detection (LOD), calculated as the concentration required to yield a net peak equal to three times the standard deviation of the background signal ( $3\sigma$ ) was 30 and 10  $\text{ng L}^{-1}$  for  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  respectively. Alternatively, the limit of quantification ( $10\sigma$ ) was calculated and resulted to be 0.79 and 0.07  $\mu\text{g L}^{-1}$  for  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  respectively. After optimization, the method that involved the use of ox-CNT associated to an on-line preconcentration was tested in samples of relevant environmental importance. Accuracy was evaluated analyzing a certified reference material namely, Municipal Sludge (QC MUNICIPAL SLUDGE A) and a reference sample of Lake Sediment (TRAP-LRM from IJS).

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Lead and nickel can be released into the atmosphere from several industrial processes, including oil and coal burning power plants, trash incinerators, and metallurgy industry. Thus, the exposition to these elements may take place by air, soil, drinking water, food samples and mainly by skin contact [1–3]. Lead is classified as prevalent toxic metal, which constitutes a major environmen-

tal health problem [3,4]. Although nickel is considered an essential element, excessive Ni amount in the organism is reported as very toxic [1]. Exposure to nickel metal and soluble compounds should not exceed 0.05  $\text{mg/cm}^3$  in Ni equivalents per 40-h work week.

The determination of Ni and Pb at trace level is an important issue in the context of environmental protection, human health, food and agricultural chemistry as well as high purity materials [5–8]. They are normally present at low concentration, therefore sensitive, reproducible and accurate analytical methods are required for their determination. Many techniques have a significant drawback because their detection power is sometimes inadequate to comply with the requirements posed by the determination of Ni and Pb at trace levels in media such as environmental matrices [6]. Considering the spectroanalytical techniques, electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS) remains a popular technique for trace element determinations in a variety

\* Corresponding author at: Instituto de Química de San Luis (CCT-San Luis)-Área de Química Analítica, Facultad de Química Bioquímica y Farmacia Universidad Nacional de San Luis, Chacabuco y Pedernera, D5700B WQ-San Luis, Argentina.

\*\* Corresponding author at: Comisión Nacional de Energía Atómica, Gerencia Química, Av. Gral Paz 1499, B1650KNA-San Martín, Buenos Aires, Argentina.

E-mail addresses: [smichows@cnea.gov.ar](mailto:smichows@cnea.gov.ar) (P. Smichowski), [ragil@unsl.edu.ar](mailto:ragil@unsl.edu.ar) (R.A. Gil).

of samples as a consequence of its high sensitivity and superior detection power [4,8–11]. However, for ultra-trace determinations, ETAAS can be employed in conjunction with preconcentration methodologies to improve sensitivity and selectivity [8].

Nowadays, trace elemental determination has been performed in association with solid-phase extraction (SPE)/preconcentration techniques among others, basically aiming at the enrichment of metallic species and/or matrix separation with the advantage of easy coupling to flow injection systems (FI). Methods based on sorbent extraction have proven to be the most attractive ones due to their specificity and high preconcentration efficiency [6,11,12]. Additionally, systems based on FI-SPE-ETAAS increase sensitivity as well as sample throughput and sample/reagent consumption [13–15]. The choice of selective adsorbent is a critical factor to obtain full recovery and high enrichment factor. It should be based also on analyte, sample matrix and technique for final detection, whereas higher enrichment factors can be obtained using adequate experimental conditions (e.g., time of loading sample, sorbent mass, and volume of eluent) [6,16].

Carbon nanotubes (CNTs) have been proposed as a novel solid phase extractant for various inorganic and organic compounds/elements at trace levels [4,16–22], thus they have come under intense multidisciplinary study because of their unique physical and chemical properties and their possible applications. [4,6,23–26] Their large sorption capacity is linked to well develop internal pore structures, a large specific surface area, and the presence of a wide variety of surface functional groups [6–8]. The primary adsorption mechanism of metal ions to CNTs is perceived to be surface complexation with functional groups, so the performance is mainly determined by the nature and the concentration of these groups, which could be different due to the modification and functionalization of the graphitic surface [9,19–22]. Nowadays, work has progressed in developing diverse chemical varieties of CNTs which suggests a wide range of possible SPE materials (e.g. MWCNTs, SWCNTs, functionalized, non-functionalized, etc.) including different chemical possibilities and applications in SPE methods [6,9,23–25].

Taking into account the properties of the carbon nanotubes and the sensitivity of ETAAS coupled to FI, a study was undertaken to develop a method to determine Ni and Pb at ultra-trace levels. To this aim, a column-solid phase approach was evaluated using three kinds of nanomaterials i.e. carbon nanotubes (CNT), oxidized carbon nanotubes (ox-CNT) and alanine immobilized on carbon nanotubes (ala-CNT) in order to establish the best conditions regarding sensitivity, reproducibility and accuracy. The effect of several variables such as sample pH and flow rate, column capacity, eluent type concentration, and interference of foreign ions were studied. The method was adapted to the analysis of solid samples such as sediments and sludges.

## 2. Experimental

### 2.1. Standards and reagents

All solutions were prepared with Ultrapure water (18 M $\Omega$  cm) obtained from a Mili-Q, EASY pure RF (Barnsted, Iowa, USA). The acid used was HNO<sub>3</sub> from Fluka (Germany). To alkalize solutions, NaOH (Merck, Germany), and NH<sub>4</sub>OH (Cicarelli, Argentine) were used. All glasses and other lab materials were cleaned by soaking in 10% HNO<sub>3</sub> and rinsing with ultrapure water. Synthetic standard stock solutions (1000 mg L<sup>-1</sup>) of Ni<sup>+2</sup> and Pb<sup>+2</sup> were from Fluka (Switzerland).

A certified reference material namely, Municipal Sludge (QC MUNICIPAL SLUDGE A) from DK-2970 Horsholm, Denmark and

**Table 1**  
Instrumental operating conditions and furnace temperature program.

Parameter	Ni	Pb		
Wavelength	221.47 nm	283.30 nm		
Spectral bandpass	0.2 nm	0.2 nm		
Lamp current	14 mA	14 mA		
Background correction	Deuterium lamp	Deuterium lamp		
Furnace program (Ni/Pb)				
Stage	Temperature (°C)	Time (s)		Argon gas flow (L min <sup>-1</sup> )
		Ramp	Hold	
Drying	120/150	10/10	–	0.1
	250/250	5/5	–	1.0
Pyrolysis	800/800	10/10	10/10	1.0
	800/800	–	3/3	0.0 (read)
Atomization	2500/2500	–	5/2	0.0 (read)
	2600/2500	–	2/2	1.0

a reference sample of Lake Sediment (TRAP-LRM from IJS) from Ljubljana, Slovenia were employed for method validation.

Multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs) were purchased from Sun Nanotech Co. Ltd., Jiangxi, China.

All chemical (Merck) used for nanotubes functionalization (HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, SOCl<sub>2</sub>, DMF, THF, L-alanine) were of analytical reagent grade and were used without further purification.

### 2.2. Instrumentation

Measurements were performed with a Shimadzu Model AA-6800 atomic absorption spectrometer (Tokyo, Japan) equipped with a deuterium background corrector, an EX7-GFA electrothermal atomizer and an ASC-6100 autosampler. L'vov graphite tubes (Shimadzu, Tokyo, Japan) were used in all experiments. Nickel and lead hollow-cathode lamps (Hamamatsu, Photonics K., Japan) were employed as the radiation sources. The wavelengths used were 221.47 nm and 217.00 nm for Ni and Pb, respectively. The ETAAS instrumental and operating conditions are listed in Table 1. A Minipulse 3 peristaltic pump Gilson (Villiers-Le-Bell, France) was also used. Sample injection was achieved using a Rheodyne (Cotati, CA, USA) Model 50, four-way and of six ports, two positions, rotary valves. The three conical minicolumns were prepared by placing 4 mg of each of the three nanomaterials i.e. carbon nanotubes (CNT), oxidized carbon nanotubes (ox-CNT) and alanine immobilized on carbon nanotubes (ala-CNT) into an empty conical tip using the dry packing method. To avoid filling losses when the sample solution passed through the conical minicolumn, a small amount of quartz wool was placed at both the ends. The column was then mounted on the furnace autosampler arm to form the preconcentration system. Prior to use, a 5% nitric acid solution was passed through the CNTs minicolumn. After that, the column was washed with ultra-pure water until reaching neutral pH. Tygon type pump tubing (Ismatec, Cole Parmer, Vernon Hills, IL, USA) was employed to propel the sample, reagents and eluent.

Microwave digestion was performed with a Milestone START D microwave furnace (Italy) and Milestone hermetically sealed 100 mL internal volume, 1 cm wall thickness polytetrafluoroethylene (PTFE) reactors.

### 2.3. Sample treatment

Aliquots of 0.25 g of a certified reference material (CRM) namely, Municipal Sludge were placed into PTFE vessels. Then, 4 mL of 65% HNO<sub>3</sub>, 2 mL of 40% HF and 2 mL of 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were added and submitted to the temperature program showed in Table 2.

**Table 2**  
Main steps of the MW digestion for Municipal Sludge and Lake Sediment (Section 2.3).

Stage		Municipal sludge		Lake sediment	
		Time (min)	Temperature (°C) <sup>a</sup>	Time (min)	Temperature (°C) <sup>a</sup>
1	Ramp	20	180	10	220
2	Step	20	180	20	220
3	–			10	Room temperature
4	Ramp			10	220
5	Step			20	220
Total time (min)		40		70	

<sup>a</sup> Threshold power applied = 0.5 KW.

In the case of Lake Sediment, 0.2 g of this reference sample was placed into PTFE vessels and two stages were required to reach its complete dissolution of the CRM. At first, 4 mL of 96% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 3 mL of 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> were added. Once it finished, the rotor was cooled by air until the solution reached room temperature. Then, vessels were opened and the second stage was carried out by adding 4 mL of 65% HNO<sub>3</sub>, 2 mL 40% of HF and 2 mL of 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The digestion cycle adopted is detailed in Table 2.

Finally, all the vessels were opened and the solutions transferred to marked polyethylene flasks and made to a final volume of 50 mL with ultrapure water.

#### 2.4. Immobilization procedure

Commercial mutiwalled CNTs were treated with a mixture of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:HNO<sub>3</sub> (3:1), used as oxidant agent, in two consecutively steps: 2 h in ultrasound bath followed by 7 h in a water bath at 55 °C. This procedure cleaned and eliminated possible residues present in CNTs due to the generation process. This method allowed the generation of –COOH and –OH groups on CNTs surface, improving their solubility. The reaction was easy to start at the end caps because of the heavy strain of the hexagon–heptagon pairs [25]. In this way, the end caps were quickly removed leaving open-ended tubes, functionalized with carboxylic acid (COOH) groups [26]. The oxidized CNTs (ox-CNTs) were filtered and washed repeatedly with ultrapure water until complete elimination of the residual acid. The resultant powder was dispersed in a solution of thionylchloride (SOCl<sub>2</sub>); 2 ml of dimethylformamide (DMF) were added and stirred at 70 °C for 24 h. The resultant substrate (CNT-COCl) was centrifuged and the remaining solid was washed with tetrahydrofuran (THF). L-Alanine and CNT-COCl were mixed in THF at 45° for 4 days. The resultant solid was resuspended with ethanol, filtered and dried at room temperature.

Fig. 1 shows a scanning electron microscopy (SEM) photograph of CNTs previous and after the immobilization.

#### 2.5. Pre-concentration procedure and determination

Aiming to optimize the overall analysis time, the discontinuous nature of the electrothermal atomizer must be synchronized with the continuous mode of the FI-SPE. A scheme of the pre-concentration manifold includes a six-port rotary valve containing the conical minicolumn (Fig. 2).

Before starting, the conical mini-column is conditioned for pre-concentration by passing some mL of a 5% HNO<sub>3</sub> solution, washed with ultra-pure water and finally conditioned at the correct pH value (valves V<sub>1</sub> in position B and V<sub>2</sub> in position a).

##### 2.5.1. Loading

Analyte solutions were loaded separately on the minicolumns at a flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup> with valve V<sub>1</sub> in position S and valve V<sub>2</sub> in load position a (2 min).

##### 2.5.2. Injection

After loading, the sample line (S) was emptied. The peristaltic pump (P) was stopped and the injection valve V<sub>2</sub> was switched to the injection position (b). Finally, the conical minicolumn, mounted in the arm of the furnace autosampler, was automatically moved into the dosing hole of the graphite tube, and the retained metal was eluted at a flow rate of 0.2 mL min<sup>-1</sup> with 50 µL of 5% HNO<sub>3</sub> solution directly into the graphite furnace.

##### 2.5.3. Reading

After injection (elution), the autosampler arm was moved back to the conditioning position and the temperature program was started. During this period, the minicolumn was washed with 5% HNO<sub>3</sub> solution, ultra-pure water and conditioned at the correct pH. The absorbance measurements (peak height) were proportional to the analyte concentration in the sample and were used for all measurements. The operating conditions were established and the determinations carried out.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. pH studies

The pH value plays an important role with respect to the adsorption of different ions on CNTs [5,19,25,27]. The surface charge depends on the pH of the surrounding electrolyte. The oxidation of CNTs with concentrated acids lead to the surface functionalization with oxygen-containing groups, and the isoelectric point (IEP) of MWNTs shifts to the lower pH values [5]. When the pH of the solution is higher than the IEP of the oxidized CNTs, the negative charge on the surface provides electrostatic attractions that are favorable for adsorbing cations. The decrease of pH leads to the neutralization of surface charge, so the adsorption of cations onto CNTs decreases quickly.

In order to evaluate the effect of pH, a series of sample solutions of Ni<sup>+2</sup> and Pb<sup>+2</sup> were adjusted to different pH values (between 1.0 and 9.0) and processed according to the recommended procedure (Section 2.4). Aliquots of 2 mL were loaded on the column at a flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup>. In order to optimize the sorption conditions for the retention of Ni<sup>+2</sup> and Pb<sup>+2</sup> on the different CNTs, the intensity of the analytes signal was recorded as a function of the pH. The effect of pH on Ni<sup>+2</sup> and Pb<sup>+2</sup> retentions are shown in Fig. 3a and b. As it can be seen, Ni<sup>2+</sup> adsorption was achieved between pH 3.0 and 9.0 with the three sorbent tested. Lead started to be adsorbed at pH 3.0 as well, but a noticeably decreasing in the adsorption is advised at pH 8.0, probably due to hydrolysis of the metal ion.

Comparing the retention of both Ni<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup> on the different CNTs it can be synthesized as follows: ox-CNTs > ala-CNTs > non-modified CNTs. Under these dynamic conditions it is evident that the appearance of oxygen-containing groups on the CNTs surface is the main responsible for the retention of these two metal ions. Accordingly, pH 7 for Ni<sup>+2</sup> and pH 3 for Pb<sup>+2</sup> were selected for further experiments and ox-CNT were selected as the best alternative

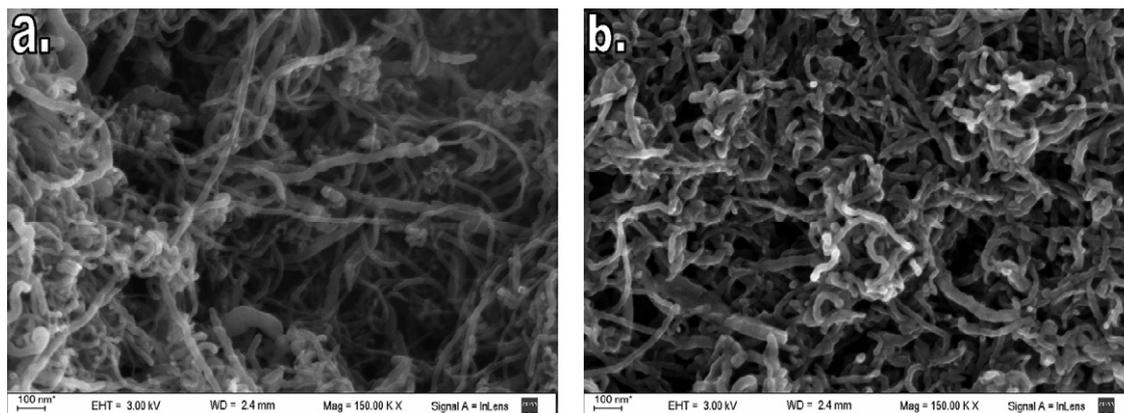


Fig. 1. A scanning electron microscopy (SEM) photographs of (a) CNTs previous immobilization and (b) after immobilization (L-ala CNTs).

for their superior adsorption capacity. All these studies were carried out with synthetic  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  solutions with a concentration of  $20 \mu\text{g L}^{-1}$ .

### 3.2. Metals extraction and preconcentration performance

Parameters affecting  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  preconcentration were evaluated employing the proposed FI-SPE-ETAAS system. The analytical parameters studied were the following.

#### 3.2.1. Loading flow rate

Beyond being one of the steps that controls the time of analysis, the rate of the sample through the minicolumn, it influences the time of contact between the analyte and the active sites (edges) and consequently the column capacity. In this study it was verified that the analytical signal diminished progressively when the loading flow rate was increased from  $1.0$  to  $10.0 \text{ mL min}^{-1}$ , whilst it remained constant at lower flow rates. This was carried out by comparing the signals from the mass expected from the metal stripped from the column with that of a directly injected sample. With the objective of avoiding tight packing of the filling material, with the consequent increasing of the back pressure, it was decided to work at a flow rate of  $1.0 \text{ mL min}^{-1}$  as optimum (Fig. 4).

#### 3.2.2. Eluent

The elution step involves an exchange between analyte ions and  $\text{H}^+$  [28]. A satisfactory eluent should effectively elute the analyte in a discrete volume in order to obtain the best analyte recovery. Nitric and hydrochloric acid have turned out to be good eluents in many on-line preconcentration systems. Both acids were tested at different concentrations in order to evaluate and compare the analytes recovery. Despite the fact that similar recoveries could be achieved with both of them,  $\text{HNO}_3$  was preferable due to the better repetitively obtained in ETAAS measurements. In this way, different concentrations were tested and we verified that quantitative recoveries were obtained when  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  were retained on ox-CNT and eluted with 5%  $\text{HNO}_3$ . With the purpose of achieving the best analytical performance, this configuration was used in the application studies (Section 3.6).

As it is stated in Section 2.4, the elution of  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  is carried out with the column positioned in the dosing hole of the L'vov tube. This fact implies that the elution step is essentially the injection of the sample into the atomizer. Accordingly, the elution flow rate is a parameter of study for two main reasons: (1) the elution step is known to be an ionic exchange process that needs enough contact time to occur, and (2) the discrete volume of eluent should be properly deposited on the tube platform. In this sense, several eluent flow rates were tested and no significant changes were observed in the absorbance with flow rates up to  $1.0 \text{ mL min}^{-1}$ . However,

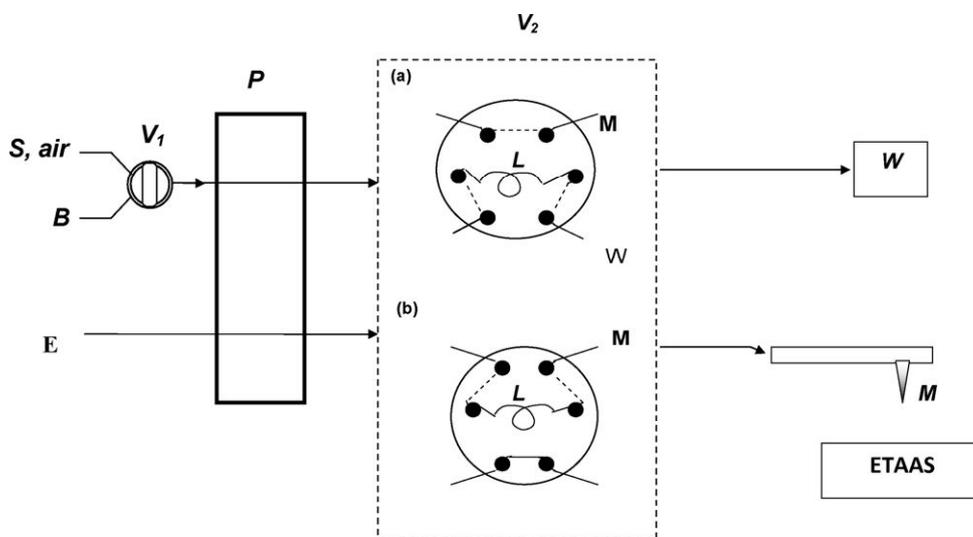


Fig. 2. Schematic diagram of the instrumental setup. Manifold of the FI-SPE-ETAAS method that include a selection valve ( $V_1$ ), a two-way (a, load and b, injection) six-port rotary valve ( $V_2$ ) with a fix-volume injection loop (L), an external 4-lines peristaltic pump (P), and a conical minicolumn (M).

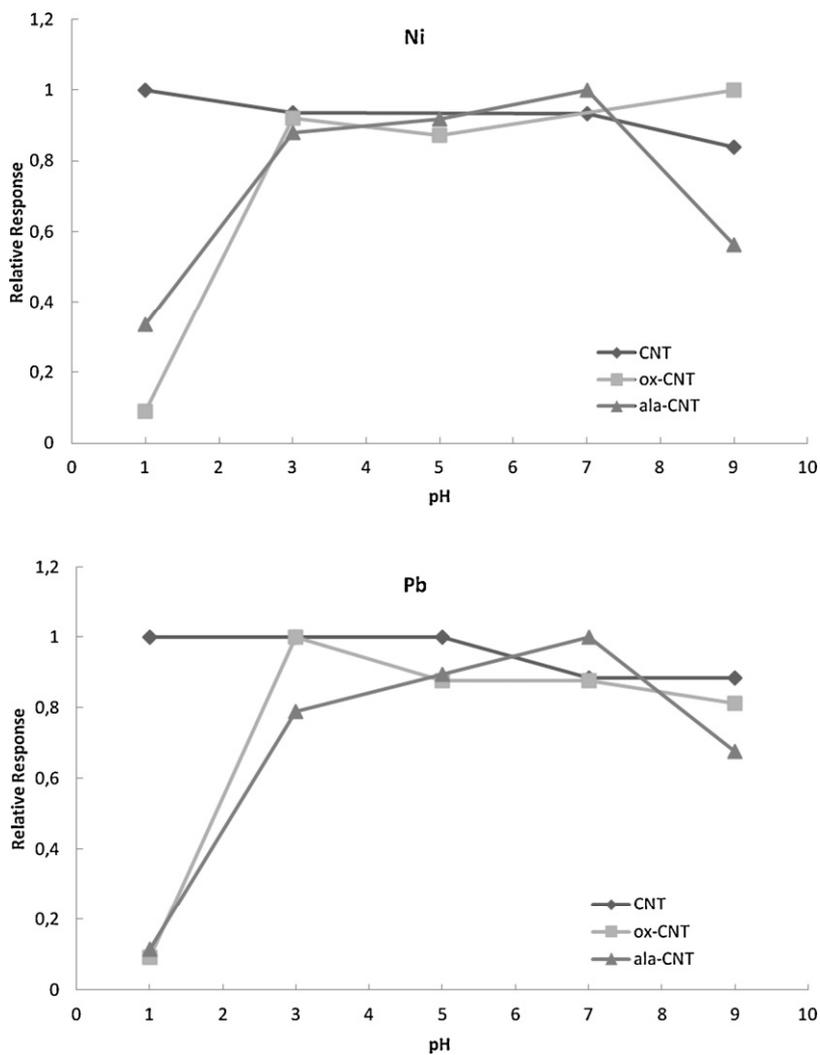


Fig. 3. Effect of the sample pH on analyte retention on the three diferents carbon nanotubes columns.

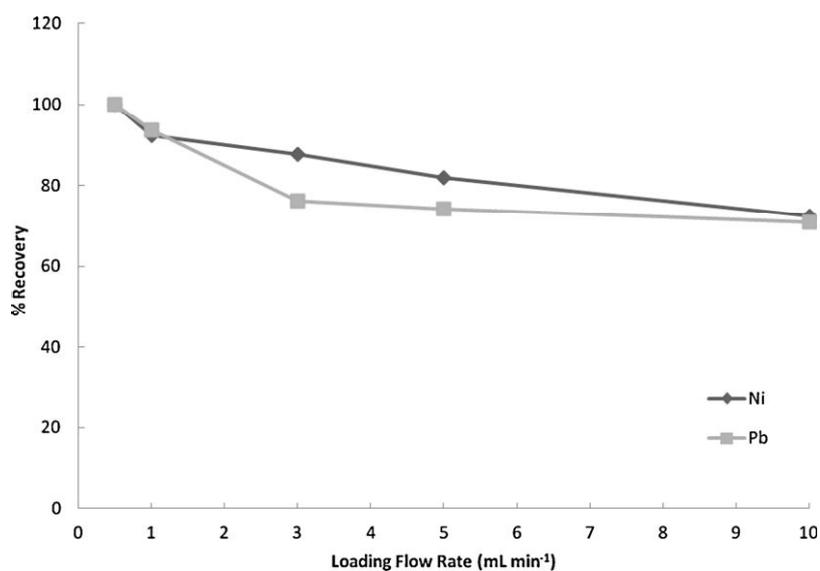


Fig. 4. Effect of the sample loading flow rate on the recovery of the analytes on ox-CNTs.

**Table 3**

Some commonly encountered ions were tested, and they were tolerated up to at least the levels specified down.

Coexisting	Tolerance ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
Cd(II)	350
Co(II)	300
Cu(II)	900
Cr(III)	700
Fe(III)	8600
Hg(II)	150
K(I)	16,000
Sb(III)	400
Zn(II)	2100

working at high flow rates, the injection step was hardly reproduced and the uncertainty increased. Accordingly, a flow rate of  $0.2 \text{ mL min}^{-1}$  was selected, assuring repeatability of the elution and injection steps.

### 3.3. Column re-use

The stability and regeneration of the column were investigated. The column can be re-used after regeneration with 2 mL of 5%  $\text{HNO}_3$  and then with a few milliliters of distilled water. The columns were stable up to 300 adsorption cycles without either deterioration or decrease in  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  species recovery.

### 3.4. Analytical performance

The time required for the pre-concentration of 2.0 mL of sample ( $1.0 \text{ mL min}^{-1}$ ), elution/injection ( $0.2 \text{ mL min}^{-1}$ ), reading/data acquiring and conditioning was about 3 min, allowing 20 determinations per hour. The relative standard deviation (RSD) for six replicate measurements of solutions containing  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  of  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  was 3.9 and 0.5%, respectively. The pre-concentration factors, evaluated here as the ration between the slopes of the calibration plots made with solutions before and after pre-concentration were 38 and 40 for Ni and Pb respectively. The limit of detection (LOD), calculated as the concentration required to yield a net peak equal to three times the standard deviation of the background signal ( $3\sigma$ ) was 30 and  $10 \text{ ng L}^{-1}$  for  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  respectively. Despite the fact that Ni was expected to have the lowest detection limits, the background in the line 221.47 nm line where high enough to diminish the detection capacity making the limit of detection a little bit higher than expected. Alternatively, the limit of quantification ( $10\sigma$ ) was calculated and resulted to be 0.79 and  $0.07 \mu\text{g L}^{-1}$  for  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  respectively. The calibration plot was linear from LOQ up to 5 and  $2 \mu\text{g L}^{-1}$  for  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$ , respectively.

### 3.5. Interference studies

The effects of potential interference ions at the concentration levels at which they may occur in the studied samples were tested. For this purpose, synthetic  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  solutions were prepared and the signal was monitored by the proposed method based on FI-SPE-ETAAS with the ox-CNTs minicolumn. The results (Table 3) indicate that samples could be analyzed without matrix effects due to cations, allowing calibration with simple aqueous standards.

### 3.6. Application to environmental samples

This FI-SPE-ETAAS method involving ox-CNT as sorbent material was employed to determine  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  in two environmental samples that had certified or reference values of  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  (i.e. QC MUNICIPAL SLUDGE A, and a lake sediment TRAP-LRM from IJS).

**Table 4**

Determination of Ni and Pb in environmental samples.

	Sample	Experimental values ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	Certified values ( $\text{mg kg}^{-1}$ )
Ni	Municipal sludge	$19.8 \pm 0.8$	$21.5 \pm 1.9$
	Lake sediment	$37.9 \pm 1.3$	$39.8 \pm 1.1$
Pb	Municipal sludge	$60.0 \pm 1.5$	$61.7 \pm 4.9$
	Lake sediment	$1401 \pm 29.5$	$1373 \pm 32.0$

Confidence limits:  $t_{(0.05;2)}S/n^{0.5}$ .

The average concentrations of  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  found as well as the certified values are shown in Table 4. In all cases the calibration was run against aqueous standards solutions.

## 4. Conclusion

The coupling FI-SPE-ETAAS exhibited ideal properties as a consequence of increasing the speed of preconcentration and the overall analysis process, reducing sample consumption and contamination risks. Furthermore, it is clear that the intimate contact between CNTs and liquid phases allows the direct extraction of metals from the samples. The evaluation of the retention capacity showed that oxidized carbon nanotubes (ox-CNTs) were the CNTs configuration with the highest adsorption capability being the best suitable substrate for preconcentration. The rapid uptake of both metals other than usually interfering cations, the almost instantaneous release of adsorbed analytes during the elution step and the possibility of column re-using for 300 cycles of retention/elution are ideal properties. In addition, the coupling used allows access to the limits of detection of  $\text{ng L}^{-1}$  levels overlapping to a certain extent that afforded by ICP-MS.

The methodology proposed has proved to be simple, reliable, sensitive, and reproducible, with a high sample throughput. Therefore, the method could be applied to the accurate determination of  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  in other samples with complex matrices.

## Acknowledgements

The authors thank to Instituto de Química de San Luis from the Universidad Nacional de San Luis and Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (UNSL-CONICET), and Agencia Nacional de Promoción Científica (FONCYT) for financial support.

## References

- [1] R.S. Amaisa, J.S. Ribeiro, M.G. Segatelli, I.V.P. Yoshida, P.O. Luccas, C.R.T. Tarley, Sep. Purif. Technol. 58 (2007) 122.
- [2] M. Savio, R.A. Olsina, L.D. Martinez, P. Smichowski, R.A. Gil, Microchem. J. 96 (2010) 243.
- [3] M. Tuzen, K.O. Saygi, M. Soylak, J. Hazard. Mater. 152 (2008) 632.
- [4] Z. Zang, Z. Hu, Z. Li, Q. He, X. Chang, J. Hazard. Mater. 172 (2009) 958.
- [5] K. Pyrzynska, TrAC Trends Anal. Chem. 29 (2010) 718.
- [6] R.A. Gil, S.N. Goyanes, G. Polla, P. Smichowski, R.A. Olsina, L.D. Martinez, J. Anal. At. Spectrom. 22 (2007) 1290.
- [7] L.M. Ravelo-Pérez, A.V. Herrera-Herrera, J. Hernández-Borges, M.A. Rodríguez-Delgado, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 2618.
- [8] A. Duran, M. Tuzen, M. Soylak, J. Hazard. Mater. 169 (2009) 466.
- [9] T. Shamspur, A. Mostafavi, J. Hazard. Mater. 168 (2009) 1548.
- [10] P.H. Pacheco, P. Smichowski, G. Polla, L.D. Martinez, Talanta 79 (2009) 249.
- [11] Z. Fang, Flow Injection Separation and Preconcentration, VCH Publishers, Inc., New York, 1993.
- [12] M. Burguera, J.L. Burguera, P. Carrero, C. Rondón, Talanta 58 (2002) 1157.
- [13] J.L. Burguera, M. Burguera, Spectrochim. Acta Part B 56 (2001) 1801.
- [14] C.F. Poole, Trends Anal. Chem. 22 (2003) 362.
- [15] S. Iijima, T. Ichihashi, Nature 363 (1993) 603.
- [16] S. Iijima, Nature 354 (1993) 56.
- [17] P.H. Pacheco, R.A. Gil, P. Smichowski, G. Polla, L.D. Martinez, Anal. Chim. Acta 656 (2009) 36.
- [18] K. Pyrzynska, M. Bystrzejewski, Colloids Surf. A 362 (2010) 102.
- [19] M. Tuzen, K.O. Saygi, C. Usta, M. Soylak, Bioresour. Technol. 99 (2008) 1563.
- [20] M. Tuzen, M. Soylak, J. Hazard. Mater. 147 (2007) 219.

- [21] K. Pyrzynska, *Anal. Sci.* 23 (2007) 631.
- [22] M. Valcarcel, S. Cardenes, B.M. Simonet, Y. Moliner-Martinez, R. Lucena, *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 34.
- [23] J. Muñoz, M. Gallego, M. Valcarcel, *Anal. Chem.* 77 (2005) 5389.
- [24] F. Avilés, J.V. Cauich-Rodríguez, L. Moto-Tah, A. May-Pat, R. Vargas-Coronado, *Carbon* 47 (2009) 2970.
- [25] J. Zhang, H. Zou, Q. Qing, Y. Yang, Q. Li, Z. Liu, X. Guo, Z. Du, *J. Phys. Chem. B* 107 (2003) 3712.
- [26] J. Shen, W. Huang, L. Wu, Y. Hu, M. Ye, *Mater. Sci. Eng. A* 464 (2007) 151.
- [27] P. Liang, Y. Liu, L. Guo, J. Zeng, H. Lu, *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 1489.
- [28] P.H. Pacheco, R.A. Olsina, P. Smichowski, L.D. Martinez, *Microchem. J.* 91 (2009) 159.



# Study of carbon nanotubes and functionalized-carbon nanotubes as substrates for flow injection solid phase extraction associated to inductively coupled plasma with ultrasonic nebulization

## Application to Cd monitoring in solid environmental samples

Belen Parodi <sup>a,b</sup>, Marianela Savio <sup>c</sup>, Luis D. Martinez <sup>c,d</sup>, Raúl A. Gil <sup>c,d,\*</sup>, Patricia Smichowski <sup>d,e,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto Nacional de Tecnología Industrial, Centro de Investigación y Desarrollo en Mecánica Av. Gral. Paz 5445, B1650KNA, San Martín, Argentina

<sup>b</sup> Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental, Universidad de San Martín, Belgrano 3565, B1650KNA, San Martín, Argentina

<sup>c</sup> Instituto de Química de San Luis (UNSL-CONICET), Área de Química Analítica, Facultad de Química Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis, Chacabuco y Pedemera, San Luis, D5700BWQ, Argentina

<sup>d</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

<sup>e</sup> Comisión Nacional de Energía Atómica, Gerencia Química, Av. Gral Paz 1499, San Martín-Buenos Aires, B1650KNA, Argentina

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 21 December 2010

Received in revised form 3 February 2011

Accepted 3 February 2011

Available online 18 February 2011

#### Keywords:

Cd

SPE–USN–ICPOES

Carbon nanotubes (CNTs)

Oxidized-carbon nanotubes (ox-CNTs)

L-alanine aminoacid (ala-CNTs)

### ABSTRACT

A research was performed to evaluate the capabilities of carbon nanotubes (CNTs) and modified CNTs to serve as sorbents for preconcentrating Cd together with on-line ultrasonic nebulization (USN)-inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICPOES). Three different carbon nanotubes substrates namely, carbon nanotubes (CNTs), oxidized-carbon nanotubes (ox-CNTs) and L-alanine-carbon nanotubes (ala-CNTs) were studied systematically and the main factors influencing the preconcentration and determination of Cd were examined thoroughly. The CNTs evaluated showed dissimilar adsorption behaviors leading to increasing preconcentration factors when used in the proposed on-line solid phase extraction (SPE) system as follows: CNT < ala-CNT < ox-CNT. Aiming to achieve the best analytical performance, ox-CNTs were used as they enable quantitative retention of Cd at pH 7.0 and instantaneous elution of the analyte with 10% HNO<sub>3</sub>. Under optimal conditions, the adsorption capacity on ox-CNTs was found to be 130 μmol g<sup>-1</sup> and the detection limit (3σ) achieved was 1.03 μg L<sup>-1</sup>. The precision of the method expressed as the relative standard deviation (RSD) turned to be 3.0%. The flow injection method involving use of ox-CNTs as sorbent and USN-ICPOES for detection was successfully applied to the determination of Cd in different kinds of environmental samples.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Cadmium is a heavy metal, known to be extremely toxic and occurs in almost all soils, surface waters and plants, and it is readily mobilized by human activities [1–3]. As a result, Cd has been named as a potential health threat moreover is considered as one of the priority pollutants for monitoring in most countries and international organizations [2,3].

In the direct determination of extremely low concentrations of Cd by atomic spectrometric techniques, inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICPOES) has gained strong recognition due to the following advantages: multi-elemental analysis capability, large dynamic linear range, high accuracy and precision and high productivity [4]. Ultrasonic nebulization (USN) is usually employed to

enhance the detection limits of ICPOES measurements, although special attention should be paid to the severe matrix effects that produce differences between standards and samples [5].

Nowadays, trace elemental determination is performed in association with solid phase extraction (SPE)/preconcentration techniques, basically aiming at the enrichment of metallic species and/or matrix separation with the advantages of achieving high concentration factor, simple operation, the ability to handle large volume samples in systems free from contamination, rapid phase separation, and the possibility of coupling with different analytical techniques [3,6–11]. Moreover, systems based on flow solid phase preconcentration increase the analytical sensitivity as well as sample throughput and sample/reagent consumption [4,12]. The combination FI-SPE-ICPOES does not only provide improvements in detection limits but also lead noticeably in enhancing the analytical performance of the methods [5].

The choice of a suitable adsorbent for on-line column preconcentration systems is a critical factor to obtain full recoveries and high enrichment factors. Since its discovery [13,14], carbon nanotubes

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [belen@inti.gov.ar](mailto:belen@inti.gov.ar) (B. Parodi), [msavio@unsl.edu.ar](mailto:msavio@unsl.edu.ar) (M. Savio), [ldm@unsl.edu.ar](mailto:ldm@unsl.edu.ar) (L.D. Martinez), [ragil@unsl.edu.ar](mailto:ragil@unsl.edu.ar) (R.A. Gil), [smichows@cnea.gov.ar](mailto:smichows@cnea.gov.ar) (P. Smichowski).

(CNTs) have been proposed and used as a novel solid phase extractant for various inorganic and organic compounds/elements at trace levels [15–21]. Considering the unique physical and chemical properties of these carbonaceous materials and their potential applications they have come under intense multidisciplinary study during the last years. Their large sorption capacity is linked to well-developed internal pore structures, a large specific surface area, and the possibility of binding a wide variety of functional groups to their surface. The main adsorption mechanism of metal ions to CNTs is considered to be surface complexation with functional groups, so the performance is mainly determined by the nature and the concentration of these groups. Extensive effort have conducted a marked progress in the utilization of CNTs for removal of metal ions [3,16,22–25]. Owing to their small particle size, CNTs could generate high back pressure in some manifolds employed in flow injection (FI) systems. Elsewhere, this drawback has been solved by constructing non-compacted mini-columns, which permitted the use of higher volumes of sample and reagents flow rates [12].

Considering the above advantages, it was deemed of interest to investigate further the capabilities of these new substrates for SPE on-line coupled to a USN-ICPOES system for detection. The on-line solid phase extraction on carbon nanotubes (CNTs), oxidized-carbon nanotubes (ox-CNTs) and L-alanine-carbon nanotubes (ala-CNTs) was studied systematically. Our studies evidenced that ox-CNTs coupled to USN-ICPOES exhibited the best analytical performance for Cd preconcentration and determination. The main factors that influenced the preconcentration and determination of Cd were examined thoroughly, and they included sample pH, sample flow rate and volume, and eluent concentration and flow rate. The conditions were established and Cd determinations in sediments and sludges were successfully carried out.

## 2. Experimental

### 2.1. Standards and reagents

All solutions were prepared with Ultrapure water (18.2 MΩ cm) obtained from a Mili-Q, EASY pure RF (Barnsted, Iowa, USA). The acid used was HNO<sub>3</sub> from Fluka (Germany). To alkalize the solutions, NaOH from Merck (Germany), and NH<sub>4</sub>OH from Cicarelli (Argentina) were used. All glasses and other lab materials were cleaned by soaking in 10% HNO<sub>3</sub> and rinsing with ultrapure water. Synthetic standard stock solution (1000 mg L<sup>-1</sup>) of Cd was from Fluka (Switzerland).

Welding Ar from Air Liquide (Rio Cuarto, Córdoba, Argentina) was used for ICPOES determinations.

A certified reference material namely, Municipal Sludge (QC MUNICIPAL SLUDGE A) from DK-2970 Horsholm, Denmark and a reference sample of Lake Sediment (TRAP-LRM from IJS) from Ljubljana, Slovenia were employed for method validation.

Multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs) were purchased from Sun Nanotech Co. Ltd., Jiangxi, China.

All chemical (Merck) used for nanotubes functionalization (HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, SOCl<sub>2</sub>, DMF, THF, and L-alanine) were of analytical reagent grade and were used without further purification.

### 2.2. Instrumentation

All measurements were performed with a sequential ICP spectrometer, Baird ICP-2070 (Bedford, MA, USA). The 1 m Czerny–Turner monochromator had a holographic grating with 1800 grooves mm<sup>-1</sup>. A U-5000 AT ultrasonic nebulizer from CETAC Technologies (Omaha, NE, USA), with an on-line desolvation system was used. The ICPOES and USN experimental conditions are listed in Table 1. Minipuls 3 peristaltic pumps from Gilson (Villiers-Le-Bel, France) were used to deliver samples, reagents and wastes. Sample injection was achieved using a Rheodyne (Cotati, CA, USA) Model 50, four-way and of six

**Table 1**  
ICPOES and USN experimental conditions.

ICP conditions	
RF generator power plasma	1.0 kW
Frequency of RF generator	40.68 MHz
Gas flow rate	8.5 L min <sup>-1</sup>
Auxiliary gas flow rate	1 L min <sup>-1</sup>
Observation height-above load coil.	15 mm
Cd analytical line	228.814 nm
Ultrasonic nebulizer conditions	
Heater temperature	140 °C
Condenser temperature	4.0 °C
Carrier gas flow rate	1 L min <sup>-1</sup>

ports, two positions, rotary valves. Three conical mini-columns were prepared by placing 4.0 mg of the three kinds of nanomaterials i.e. carbon nanotubes (CNTs), oxidized-carbon nanotubes (ox-CNTs) and L-alanine immobilized on carbon nanotubes (ala-CNTs) into an empty conical tip using the dry packing method. To avoid filling losses when the sample solution passed through the conical mini-column, a small amount of quartz wool was placed at both ends. The conical design of the mini-column allowed a higher enrichment factor due to a reduction of the dispersion [12]. The column was then connected to the peristaltic pump with PTFE tubing to form the preconcentration system. Tygon type pump tubing with an internal diameter of 1.52 mm (Ismatec, Cole Parmer, Vernon Hills, IL, USA) was employed to propel the sample, reagents and eluent. The (I) 228.802×2 nm spectral line was used and the emission measurements were expressed as peak height emission corrected against the reagent blanks.

Microwave digestion was performed with a Milestone START D microwave furnace (Italy) and Milestone hermetically sealed 100 mL internal volume, 1 cm wall thickness polytetrafluoroethylene (PTFE) reactors.

### 2.3. Sample treatment

Aliquots of 0.25 g of a certified reference material (CRM) namely, Municipal Sludge, were placed into PTFE vessels. Then, 4 mL of 65% HNO<sub>3</sub>, 2 mL of 40% HF and 2 mL of 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were added and submitted to the temperature program shown in Table 2.

In the case of Lake Sediment, 0.2 g of this reference sample was placed into PTFE vessels and two stages were required for digestion. At first, 4 mL of 96% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 3 mL of 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> were added. Then, the rotor was cooled by air until the solution reached room temperature. Vessels were opened and the second stage was carried out by adding 4 mL of 65% HNO<sub>3</sub>, 2 mL 40% of HF and 2 mL of 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The digestion cycle adopted is detailed in Table 2.

**Table 2**  
Main steps for the microwave oven digestion of Municipal Sludge and Lake Sediment samples.

Stage	Municipal sludge			Lake sediment		
	Time (min)	Temperature (°C)	Power (W)	Time (min)	Temperature (°C)	Power (W)
1 Ramp	20	180	Up to 500	10	220	Up to 500
2 Step	20	180	Up to 500	20	220	Up to 500
3 –				10	Room temperature	0
4 Ramp				10	220	Up to 500
5 Step				20	220	Up to 500
Total Time (min)	40			70		

Finally, all the vessels were opened and the digests were transferred to marked polyethylene flasks and made to a final volume of 50 mL with ultrapure water.

#### 2.4. Immobilization procedure

Commercial multiwalled CNTs were treated with a mixture of  $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{HNO}_3$  (3:1), used as oxidant agent, in two consecutively steps: 2 h in ultrasound bath followed by 7 h in a water bath at 55 °C. This procedure cleaned and eliminated possible residues present in CNTs, generated during their preparation, and allowed the generation of –COOH and –OH groups on CNTs surface, improving their solubility. The reaction was easy to start at the end caps because of the heavy strain of the hexagon–heptagon pairs [26]. In this way, the end caps were quickly removed leaving open-ended tubes, functionalized with carboxylic acid (COOH) groups [27]. The oxidized CNTs (ox-CNTs) were filtered and washed repeatedly with ultrapure water until complete elimination of the residual acid. The resultant powder was dispersed in a solution of thionylchloride ( $\text{SOCl}_2$ ); 2 mL of dimethylformamide (DMF) were added and stirred at 70 °C for 24 h. The resultant substrate (CNT-COCl) was centrifuged and the remaining solid was washed with tetrahydrofuran (THF). L-alanine and CNT-COCl were mixed in THF at 45° for 4 days. The resultant solid was resuspended with ethanol, filtered and dried at room temperature.

Fig. 1 shows scanning electron microscopy (SEM) photographs of CNTs previous and after the immobilization process.

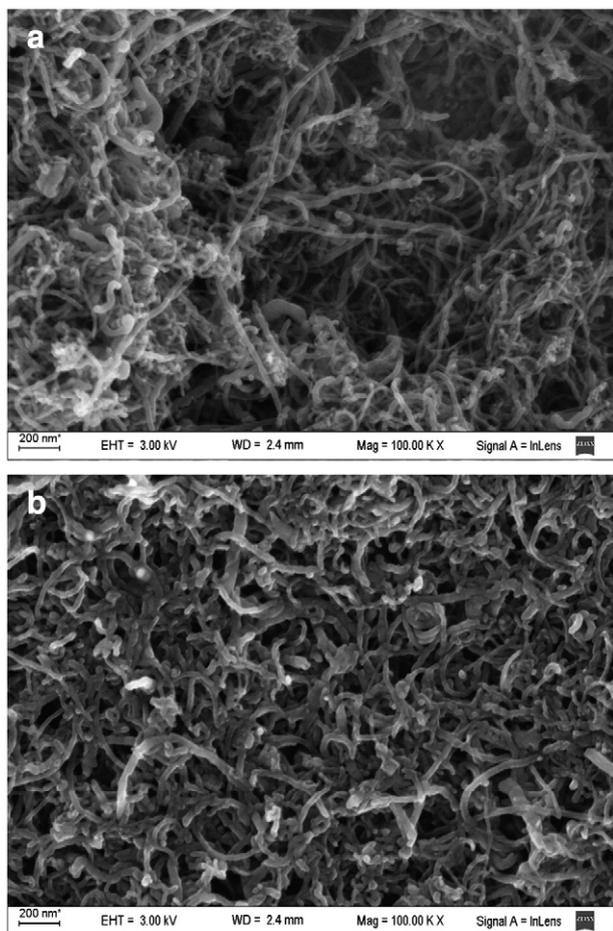


Fig. 1. A scanning electron microscopy (SEM) photographs of (a) CNTs previous immobilization and (b) after immobilization (L-ala-CNTs).

#### 2.5. Columns capacity studies

The column capacity is defined as the amount of metal ion captured by the adsorbent until the metal ion concentration in the column effluent has increased to the concentration of the influent solution. The uptake and release of  $\text{Cd}^{2+}$  using CNTs, ox-CNTs and ala-CNTs were studied with respect to pH, influent flow rate, influent concentration and compared using the same on-line procedure. Before starting the experiments, a cleaning step of 2 min with 10%  $\text{HNO}_3$  was performed. After that, a 0.05 mol  $\text{L}^{-1}$  ammonium acetate solution (pH 7.0) was pumped through the column for 2 min at 1.0 mL  $\text{min}^{-1}$  to recondition the column to neutral pH. The different solutions were prepared by dilution from metal standard stock solution into 0.05 mol  $\text{L}^{-1}$  ammonium acetate. Different volumes of 10 mg  $\text{L}^{-1}$  solutions were then passed through the column at a flow rate of 1.0 mL  $\text{min}^{-1}$ . Once the effluent concentration reached the influent concentration (columns saturation), Cd was eluted from the column with a 10%  $\text{HNO}_3$  solution. Finally, the column was reconditioned and the process started again. The breakthrough curves were then plotted, and calculations related to the amount of metals bound to the column were performed with Origin® Pro 7.5™ software.

#### 2.6. On-line solid phase extraction procedure

The uptake and release of Cd using CNTs, ox-CNTs and ala-CNTs were studied with respect to pH, influent flow rate, influent concentration using an on-line procedure. Before starting the experiments, a cleaning step of 2 min with 10%  $\text{HNO}_3$  was performed. The flow injection system and the experimental set up are shown in Fig. 2. Before loading, the column was conditioned at the desired pH with valve  $V_1$  in position B. An aliquot of sample was then loaded on the conical mini-column (M) at flow rate of 1 mL  $\text{min}^{-1}$  with valve  $V_1$  in position S and valve  $V_2$  in load position (a). Finally, valve  $V_2$  was switched to the injection position (b) and  $\text{Cd}^{2+}$  retained was eluted with a 10% (v/v) nitric acid solution. After that, the eluate was on-line

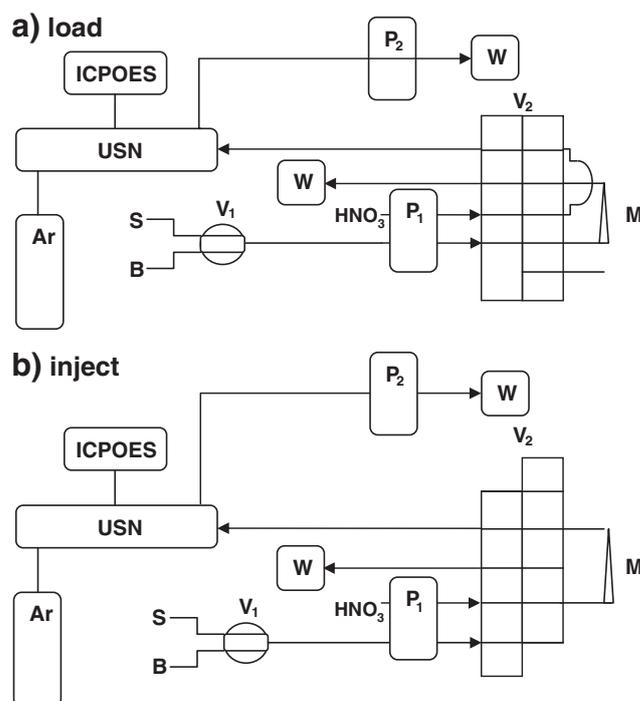


Fig. 2. Flow injection system used for preconcentration, separation and subsequent determination of  $\text{Cd}^{2+}$ .

introduced into the USN unit and subsequently carried to the ICP torch. The operation conditions were established and the determination was carried out.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. pH studies

The pH value plays an important role on the adsorption of different ions on CNTs [11,21,28]. The surface charge depends on the pH of the surrounding electrolyte. The oxidation of CNTs with  $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{HNO}_3$  leads to the surface functionalization with oxygen-containing groups, and the isoelectric point (IEP) of CNTs shifts to lower pH values [28,29]. When the pH of the solution is higher than the IEP of the oxidized CNTs, the negative charge on the surface provides electrostatic attractions that are favorable for adsorbing cations. The decrease of pH leads to the neutralization of surface charge, so the adsorption of cations onto CNTs decreases quickly [30].

On studying the effect of pH, a series of sample solutions of  $\text{Cd}^{2+}$  were adjusted to a pH range of 1.0–9.0 and processed according to the recommended procedure. Aliquots of 5 mL were loaded onto the column at a flow rate of  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . In order to optimize the  $\text{Cd}^{2+}$  sorption conditions on the different types of CNTs assessed, the intensity of  $\text{Cd}^{2+}$  signal was recorded as a function of the pH. The effect of pH on  $\text{Cd}^{2+}$  retention is illustrated in Fig. 3. As can be seen, the maximum adsorption was from pH 3.0 to 9.0 when ox-CNTs were used for preconcentration. The same tendency was observed when ala-CNTs were used as sorbent. Although the adsorption was negligible for unmodified CNTs, the dependence with pH was almost the same. All these studies were carried out with  $100 \mu\text{g L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$  solutions.

#### 3.2. Column capacity

The adsorption capacity is an important factor to consider because it determines the amount of sorbent required to quantitatively concentrate the analyte from a given solution [11]. Ox-CNTs resulted to be the substrate with the highest adsorption capability as it is illustrated in Fig. 4. The following tendency is noticed: ox-CNTs > ala-CNTs > CNTs for  $\text{Cd}^{2+}$ , with a maximum retention capacity of  $130.01 \mu\text{mol of Cd}^{2+} \text{ g}^{-1}$  at pH 7.0 on ox-CNTs, evidencing that the incorporation of specific functional groups in the surface enables differential analyte–adsorbent interaction.

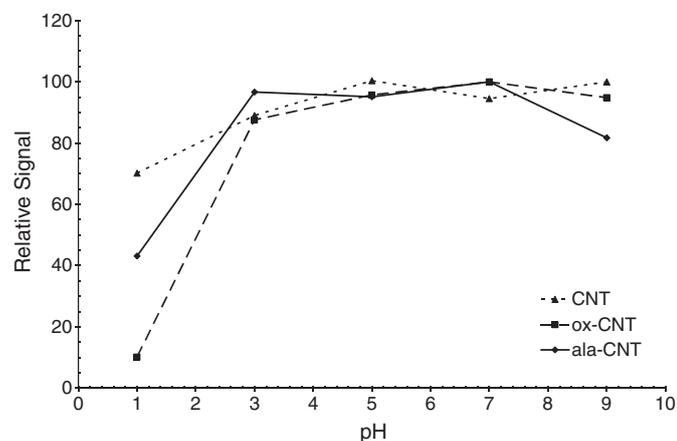


Fig. 3. Effect of pH on  $\text{Cd}^{2+}$  retention.

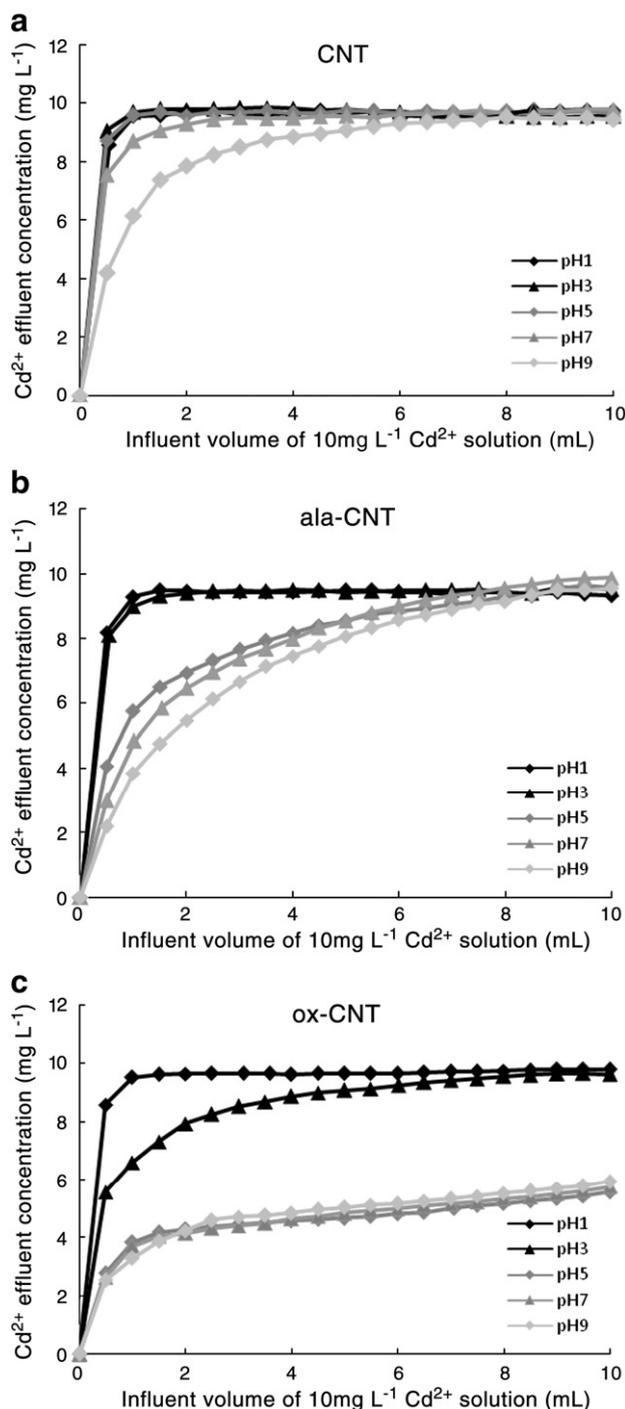


Fig. 4. Breakthrough curves for the three types of CNTs assessed for  $\text{Cd}^{2+}$  retention at pH values ranging from 1.0 to 9.0. Influent solution concentration:  $10 \text{ mg L}^{-1}$ ; flow rate:  $1 \text{ mL min}^{-1}$ .

#### 3.3. Metal releasing and preconcentration performance

Parameters affecting  $\text{Cd}^{2+}$  preconcentration were evaluated employing FI-SPE-USN-ICPOES as the detection system.

The sample loading flow rate on the column is one of the parameters that controls the time of analysis, and on the other hand influences the contact time between the analyte and the active sites (edges), and consequently the column capacity. In this study, it was verified that the analytical signal diminished progressively when the loading flow rate was increased from  $0.5$  to  $2.0 \text{ mL min}^{-1}$ . This evaluation was carried out by comparing the signals of a Cd solution

stripped from the column with that obtained by a direct injection of the sample. Taking these facts into account, and with the objective of avoiding tight packing of the filling material with the consequent increasing of the back pressure that could damage the FI system, it was decided to select a flow rate of  $1.0 \text{ mL min}^{-1}$  as optimum as it could be seen in Fig. 5.

The elution step involves an exchange between analyte ions and  $\text{H}^+$  [31]. Then, nitric acid was chosen as eluent to promote  $\text{Cd}^{2+}$  desorption from the sorbent material. A transient signal was obtained (signal vs time) and the peak height was proportional to the analyte concentration in the loaded solution. The shapes of the peaks obtained are of great importance, and special attention should be paid since the enrichment factor is strongly affected by this profile. The exchange kinetics between  $\text{H}^+$  and  $\text{Cd}^{2+}$  could be analyzed by comparing the peak profiles at different experimental conditions (i.e. acid concentration). Fig. 6 shows the relative signal (peak height) obtained with increasing concentrations of  $\text{HNO}_3$ . The narrowest peak profiles, and consequently, the best enrichment factors were obtained when Cd was retained on ox-CNTs and eluted with 10%  $\text{HNO}_3$ . With the purpose of achieving the best analytical performance, this configuration was selected for the application studies (Sections 3.5 and 3.6).

The elution flow rate has a direct influence not only on the metal releasing from the CNTs, but also plays an important role in the nebulization. Several eluent flow rates were tested and a compromise flow rate of  $1.4 \text{ mL min}^{-1}$  was selected, assuring repeatability of the elution and injection steps.

### 3.4. Column re-use studies

The stability and regeneration of the column were also investigated. The column can be re-used after regeneration with 2 mL of 10%  $\text{HNO}_3$  and then with ultrapure water. The column was stable without either deterioration or decrease in  $\text{Cd}^{2+}$  recovery. This study comprised at least 300 preconcentration cycles and no decrease in capacity of the column was observed.

### 3.5. Analytical performance

The time required for the preconcentration of 5.0 mL of sample ( $1.0 \text{ mL min}^{-1}$ ), elution/injection ( $1.4 \text{ mL min}^{-1}$ ), reading/data acquiring and conditioning was about 6.0 min, resulting in a sample throughput of 10 samples per hour. A 120-fold total enhancement factor for a sample volume of 5.0 mL was obtained with respect to the  $\text{Cd}^{2+}$  determination by ICPOES without preconcentration (12-fold for the FI-SPE and 10-fold for the USN). The relative standard deviation (RSD) for six replicate measurements was 3.0%. The limit of detection (LOD), calculated as the concentration associated with three times the standard deviation of 10 independent measurements of the proce-

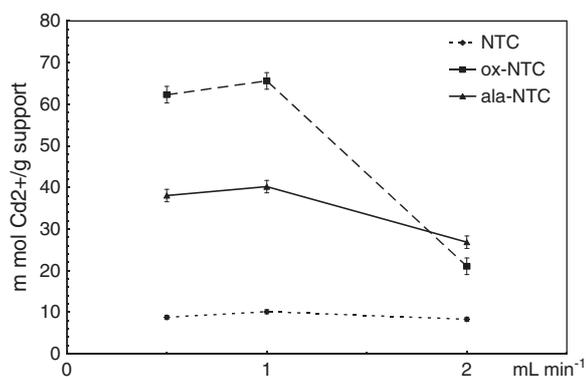


Fig. 5. Effect of influent flow rate on Cd retention.

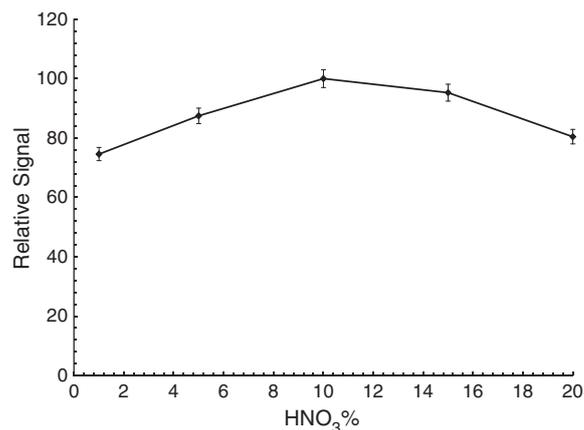


Fig. 6. Effect of nitric acid concentration on Cd elution when ox-CNTs were used for analyte retention.

dural blank ( $3\sigma$  criterion) was  $1.03 \mu\text{g L}^{-1}$ . The limit of quantification ( $10\sigma$ ) resulted to be  $3.42 \mu\text{g L}^{-1}$ . The calibration curve was linear from levels close to the LOD up to  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ , with a correlation coefficient of 0.989.

### 3.6. Interference studies

The effects of potential interference species at the concentration levels at which they may occur in the studied sample were tested. For this purpose, synthetic Cd solutions were prepared and the signal was monitored. The presence of cations such as Co(II), Cu(II), Cr(III), Fe(III), Hg(II), K(I), Ni(II), Pb(II) and Zn(II) were tolerated at least up to 3.0, 90, 7.0, 8600, 1.5, 1600, 3.2, 110, 210  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectively without deterioration of Cd signal.

### 3.7. Application to the analysis of environmental samples

A FI-SPE-USN-ICPOES method involving ox-CNTs as sorbent material was employed to determine Cd in two environmental samples that have certified or reference values of Cd (i.e., QC MUNICIPAL SLUDGE A, and a lake sediment TRAP-LRM from IJS). The average concentrations of Cd found in each sample was in good agreement with the certified values for this analyte as shown in Table 3. In all cases the calibration was run against aqueous standards solutions.

## 4. Conclusions

Three kinds of nanomaterials are proposed to device a FI-SPE system for Cd preconcentration from environmental samples with complex matrices. The evaluation of the retention capacity showed that unmodified CNTs were the configuration with the lowest adsorption capability. The study demonstrated that the surface functionalization of CNT is necessary to achieve superior adsorption capacities.

This system of preconcentration associated with USN-ICPOES allowed the determination of Cd in environmental samples with

Table 3  
Determination of Cd in environmental samples.

Sample	Experimental values ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	Confidence limits ( $\pm$ ) <sup>a</sup>	Certified values ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	Confidence limits ( $\pm$ )
Municipal sludge	1.4	0.1	1.33	0.22
Lake sediment	39.3	2.0	44.4	1.00

<sup>a</sup>  $2\sigma$ .

good reproducibility and accuracy at ultra trace levels. The method is simple and can be easily adapted to any laboratories and is suitable for routine analysis competing with modern powerful techniques.

### Acknowledgements

The authors thank Instituto de Química de San Luis from the Universidad Nacional de San Luis and Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (UNSL-CONICET), and Agencia Nacional de Promoción Científica (FONCYT) for financial support.

### References

- [1] J.R. Larison, G.E. Likens, J.W. Fitzpatrick, J.G. Crock, Cadmium toxicity among wildlife in the Colorado Rocky Mountains, *Nature* 406 (2000) 181–183.
- [2] J. Xiao, Q. Zhou, H. Bai, Application of multiwalled carbon nanotubes treated by potassium permanganate for determination of trace cadmium prior to flame atomic absorption spectrometry, *J. Environ. Sciences* 19 (2007) 1266–1271.
- [3] Z. Zang, Z. Hu, Z. Li, Q. He, X. Chang, Synthesis, characterization and application of ethylenediamine-modified multiwalled carbon nanotubes for selective solid-phase extraction and preconcentration of metal ions, *J. Hazard. Mater.* 172 (2009) 958–963.
- [4] J.S. Suleiman, B. Hu, C. Huang, N. Zhang, Determination of Cd, Co, Ni and Pb in biological samples by microcolumn packed with black stone (Pierre noire) online coupled with ICP-OES, *J. Hazard. Mater.* 157 (2008) 410–417.
- [5] R.A. Gil, S. Pasini-Cabello, A. Takara, P. Smichowski, R.A. Olsina, L.D. Martínez, A novel on-line preconcentration method for trace molybdenum determination by USN-ICP OES with biosorption on immobilized yeasts, *Microchem. J.* 86 (2007) 156–160.
- [6] S. Chen, C. Liu, M. Yang, D. Lu, L. Zhu, Z. Wang, Solid-phase extraction of Cu, Co and Pb on oxidized single-walled carbon nanotubes and their determination by inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Hazard. Mater.* 170 (2009) 247–251.
- [7] T. Shamspur, A. Mostafavi, Application of modified multiwalled carbon nanotubes as a sorbent for simultaneous separation and preconcentration trace amounts of Au(III) and Mn(II), *J. Hazard. Mater.* 168 (2009) 1548–1553.
- [8] L.M. Ravelo-Pérez, A.V. Herrera-Herrera, J. Hernández-Borges, M.Á. Rodríguez-Delgado, Carbon nanotubes: solid-phase extraction, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2618–2641.
- [9] M. Tuzen, K.O. Saygi, M. Soylak, Solid phase extraction of heavy metal ions in environmental samples on multiwalled carbon nanotubes, *J. Hazard. Mater.* 152 (2008) 632–639.
- [10] V. Camel, Review Solid phase extraction of trace elements, *Spectrochim. Acta, Part B* 58 (2003) 1177–1233.
- [11] P. Liang, Y. Liu, L. Guo, J. Zeng, H. Lu, Multiwalled carbon nanotubes as solid-phase extraction adsorbent for the preconcentration of trace metal ions and their determination by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 1489–1492.
- [12] Z. Fang, *Flow Injection Separation and Preconcentration*, VCH Publishers, Inc., New York, 1993.
- [13] S. Iijima, T. Ichihashi, Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter, *Nature* 363 (1993) 603–605.
- [14] S. Iijima, Helical microtubules of graphitic carbon, *Nature* 354 (1993) 56–58.
- [15] R.A. Gil, S. Cerutti, J.A. Gásquez, R.A. Olsina, L.D. Martínez, Preconcentration and speciation of chromium in drinking water samples by coupling of on-line sorption on activated carbon to ETAAS determination, *Talanta* 68 (2006) 1065–1070.
- [16] P.H. Pacheco, R.A. Gil, P. Smichowski, G. Polla, L.D. Martínez, L-tyrosine immobilized on multiwalled carbon nanotubes: a new substrate for thallium separation and speciation using stabilized temperature platform furnace-electrothermal atomic absorption spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 656 (2009) 36–41.
- [17] K. Pyrzynska, M. Bystrzejewski, Comparative study of heavy metal ions sorption onto activated carbon, carbon nanotubes, and carbon-encapsulated magnetic nanoparticles, *Colloids Surf., A* 362 (2010) 102–109.
- [18] R.A. Gil, S.N. Goyanes, G. Polla, P. Smichowski, R.A. Olsina, L.D. Martínez, Application of multi-walled carbon nanotubes as substrate for the on-line preconcentration, speciation and determination of vanadium by ETAAS, *J. Anal. At. Spectrom.* 22 (2007) 1290–1295.
- [19] M. Tuzen, K.O. Saygi, C. Usta, M. Soylak, *Pseudomonas aeruginosa* immobilized multiwalled carbon nanotubes as biosorbent for heavy metal ions, *Bioresour. Technol.* 99 (2008) 1563–1570.
- [20] M. Tuzen, M. Soylak, Multiwalled carbon nanotubes for speciation of chromium in environmental samples, *J. Hazard. Mater.* 147 (2007) 219–225.
- [21] K. Pyrzynska, Application of carbon sorbents for the concentration and separation of metal ions, *Anal. Sci.* 23 (2007) 631–637.
- [22] M. Valcarcel, S. Cardenas, B.M. Simonet, Y. Moliner-Martinez, R. Lucena, Carbon nanostructures as sorbent materials in analytical processes, *Trend. Anal. Chem.* 27 (2008) 34–43.
- [23] J. Muñoz, M. Gallego, M. Valcarcel, Speciation of organometallic compounds in environmental samples by gas chromatography after flow preconcentration on fullerenes and nanotubes, *Anal. Chem.* 77 (2005) 5389–5395.
- [24] F. Aviles, J.V. Cauich-Rodriguez, L. Moto-Tah, A. May-Pat, R. Vargas-Coronado, Evaluation of mild acid oxidation treatments for MWCNT functionalization, *Carbon* 47 (2009) 2970–2975.
- [25] V. Datsyuk, M. Kalyva, K. Papagelis, J. Parthenios, D. Tasis, A. Siokou, I. Kallitsis, C. Galiotis, Chemical oxidation of multiwalled carbon nanotubes, *Carbon* 46 (2008) 833–840.
- [26] J. Zhang, H. Zou, Q. Qing, Y. Yang, Q. Li, Z. Liu, X. Guo, Z. Du, Effect of chemical oxidation on the structure of single-walled carbon nanotubes, *J. Phys. Chem. B* 107 (2003) 3712–3718.
- [27] J. Shen, W. Huang, L. Wu, Y. Hu, M. Ye, Study on amino-functionalized multiwalled carbon nanotube, *Mater. Sci. Eng. A* 464 (2007) 151–156.
- [28] A.H. El-Sheikh, Effect of oxidation of activated carbon on its enrichment efficiency of metal ions: comparison with oxidized and non-oxidized multi-walled carbon nanotubes, *Talanta* 75 (2008) 127–134.
- [29] K. Pyrzynska, Carbon nanostructures for separation, preconcentration and speciation of metal ions, *Trend. Anal. Chem.* 29 (2010) 718–727.
- [30] P. Liang, Y. Liu, Li Guo, Determination of trace rare earth elements by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry after preconcentration with multiwalled carbon nanotubes, *Spectrochim. Acta B* 60 (2005) 125–129.
- [31] P.H. Pacheco, R.A. Olsina, P. Smichowski, L.D. Martínez, Adsorption behaviour of cadmium on L-methionine immobilized on controlled pore glass, *Microchem. J.* 91 (2009) 159–164.