

DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES Cr(III) Y Cr(VI) EN MEDIO ACUOSO

Development of an analytical method for the determination of Cr(III) and Cr(VI) species in an aqueous medium

Charity ANDRADE^{1*}, Ana CÁCERES², Gabriela LÓPEZ² y Ever MORALES³

¹ Universidad del Zulia, Departamento de Química, Laboratorio de Química Ambiental, Apartado Postal 526, Maracaibo-Zulia, República Bolivariana de Venezuela.

² Universidad del Zulia, Departamento de Química, Laboratorio de Desarrollo de Métodos Analíticos, Apartado Postal 526, Maracaibo-Zulia, República Bolivariana de Venezuela.

³ Carrera de Ingeniería Ambiental, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, Manabí, Ecuador.

*Autor para correspondencia: ceandrade@fec.luz.edu.ve

(Recibido: junio de 2021; aceptado: marzo de 2022)

Palabras clave: cromatografía iónica, especies de cromo, gradiente.

RESUMEN

El cromo está presente en la naturaleza principalmente como las especies Cr(III) y Cr(VI). El Cr(III) se conoce como oligoelemento esencial, mientras que el Cr(VI) presenta toxicidad aguda. Se desarrolló un método cromatográfico (HPLC-iónico) para la determinación de ambas especies de cromo en medio acuoso contaminado durante su tratamiento por fitorremediación. Para esto se requirió la formación previa del complejo aniónico $[\text{Cr(III)-EDTA}]^-$. Se evaluó en modo isocrático la fuerza iónica de la fase móvil y en modo gradiente la velocidad de flujo y el tiempo de gradiente. El Cr(VI) presentó una fuerte interacción con la fase estacionaria, siendo adecuada la determinación con 9.0 mM Na_2CO_3 /3.0 mM NaHCO_3 , de mayor fuerza iónica. Para Cr(III) la determinación fue con 2.8 mM Na_2CO_3 /3.4 mM NaHCO_3 . Mediante el uso del gradiente de concentración se logró separar y cuantificar simultáneamente ambas especies en las siguientes condiciones: fase móvil A: 2.8 mM Na_2CO_3 /3.4 mM NaHCO_3 con introducción gradual de B: 9.0 mM Na_2CO_3 /3.0 mM NaHCO_3 , a $t = 0.5$ min, velocidad de flujo de 1.5 mL/min y volumen de muestra de 50 μL . El uso de HPLC-iónico representa una alternativa eficiente, rápida y con menor impacto ambiental que las técnicas convencionales con la notable ventaja de la determinación simultánea de estas especies.

Key words: ion chromatography, chromium species, gradient.

ABSTRACT

Chromium is present in nature mainly as Cr(III) and Cr(VI) species. Cr(III) is known as an essential trace element, whereas Cr(VI) presents acute toxicity. A chromatographic method (HPLC-ionic) was developed for the determination of both chromium species in contaminated aqueous medium during their treatment by phytoremediation. For this, the previous formation of the anionic complex $[\text{Cr(III)-EDTA}]^-$ was required. The ionic

strength of the mobile phase was evaluated in isocratic mode, while the flow velocity and gradient time were evaluated in gradient mode. Cr(VI) showed a strong interaction with the stationary phase and the determination with 9.0 mM Na₂CO₃/3.0 mM NaHCO₃ of greater ionic strength was adequate, whilst for Cr(III) determination was performed with 2.8 mM Na₂CO₃/3.4 mM NaHCO₃. The use of a concentration gradient allowed for the separation and quantification of both species simultaneously with the appropriate conditions: mobile phase A: 2.8 mM Na₂CO₃²⁻/3.4 mM NaHCO₃ with the gradual introduction of B: 9.0 mM Na₂CO₃/3.0 mM NaHCO₃, $t = 0.5$ min, flow rate of 1.5 mL/min, and sample volume of 50 μ L. The use of HPLC-ionic represents an efficient, fast alternative with less environmental impact than conventional techniques with the remarkable advantage of the simultaneous determination of these species.

INTRODUCCIÓN

En los sistemas naturales, la especiación de los metales es de gran complejidad y determina su movilidad y biodisponibilidad en el ambiente; por lo tanto, la especiación de metales desempeña un papel clave en la determinación de la bioacumulación potencial y la toxicidad de los metales, siendo de interés la evaluación de sus riesgos ecológicos (Allen 1993). Entre los métodos de determinación/especiación de cromo, las técnicas más utilizadas son la espectrometría de absorción en la región ultravioleta-visible (UV-visible), seguida de la espectrometría de absorción atómica (AAS) con fuente de llama o electrotrémica (Amaro et al. 2005).

En general, estas técnicas son sensibles y apropiadas para la determinación de Cr(VI) y cromo total, respectivamente, en aguas ambientales y residuales, aunque presentan una selectividad limitada. La espectroscopía atómica ofrece las mejores propiedades analíticas, es decir, mayor intervalo lineal, menores límites de detección y mayor reproducibilidad. Dentro de estas técnicas la espectroscopía de emisión atómica con fuente de plasma por inducción (ICP-AES) es la que presenta mejores características (Amaro et al. 2005). Sin embargo, es importante destacar que el método por ICP-AES sólo puede utilizarse para la determinación de cromo total, requiriendo de etapas previas de separación para obtener información sobre especiación. Los métodos cromatográficos son especialmente atractivos para la separación en estos estudios debido a que pueden diferenciar entre varias formas químicas de algunos elementos (Hernández et al. 2017, 2018).

Las técnicas cromatográficas asociadas a espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) tienen mayor selectividad y, en general, permiten la separación de Cr(VI) de complejos de Cr(III). Además, son al menos de 10 a 100 veces más sensibles que las técnicas no cromatográficas como

la fluorescencia de rayos X, la quimioluminiscencia y los métodos colorimétricos (los más utilizados), debido al menor tiempo de análisis y a los límites de detección (LOD) de hasta 0.1 μ g/L (Dimitrakopoulos et al. 2012, Wyantuti et al. 2015, Breslin y Branagan 2019). Por ello, para lograr LOD más bajos, la ICP-MS suele ser preferida como método de detección debido a su sensibilidad superior y la falta de interferencias significativas, con LOD comparables con el uso de métodos electrotrémicos cuyos LOD son de 0.01 μ g/L (Milačič y Ščančar 2020, Spanu et al. 2021).

En la presente investigación se desarrolló un método analítico basado en la cromatografía líquida de alta resolución de intercambio iónico (HPLC-iónico) con detección por conductividad para la separación y cuantificación simultánea de las especies Cr(III) y Cr(VI) en agua, con la finalidad de monitorear de manera rápida, eficiente y accesible la especie química presente en aguas contaminadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Se utilizaron, como sales de cromo, cloruro de cromo (III) (CrCl₃ • 6H₂O, ultrapuro, Sharlau) y dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇, 99.8 %, Riedel de Haën). Para la fase móvil se utilizaron carbonato de sodio (Na₂CO₃) y bicarbonato de sodio (NaHCO₃). La sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), grado reactivo, se utilizó para la formación del complejo aniónico de la especie de Cr(III).

Sistema cromatográfico

Se utilizó un sistema de cromatografía líquida Shimadzu provisto de una columna aniónica AS9-SC (4 × 250 mm) Ion Pac Dionex, una columna de resguardo AG9-SC (4 × 50 mm) Ion Pac Dionex, membrana supresora de iones Dionex ASR 300, 4 mm de autorregeneración y detector de conductividad

controlado mediante el programa LCsolution. Las condiciones generales de operación fueron: fase móvil: $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$, velocidad de flujo entre 0.5 y 2.0 mL/min, volumen de inyección de 50 μL y temperatura de 25 °C.

Determinación de las especies Cr(III) y Cr(VI) en medio acuoso

Tratamiento de la muestra

La determinación de la especie Cr(VI) se realizó en forma de ion cromato (CrO_4^{2-}) de manera directa por inyección de soluciones estándares. Por su parte, para la determinación mediante cromatografía aniónica del Cr(III) se realizó la complejación de este ion con la sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ya que se presenta en medio acuoso con pH ácido y ligeramente ácido en forma catiónica (Cr^{3+} , $\text{Cr}(\text{OH})_2^+$). La formación del complejo aniónico $[\text{Cr}(\text{III})\text{-EDTA}]^-$ se evaluó en cuanto al tiempo de calentamiento (5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 75 y 90 min) a 50 °C, el pH (2, 3 y 4) y la relación molar Cr(III):EDTA (1:1, 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 y 1:50).

En el caso de muestras de agua provenientes de los ensayos de fitorremediación, se filtraron con membranas de 0.45 μm antes de ser analizadas.

Separación y cuantificación de las especies Cr(III) y Cr(VI)

Se analizó la respuesta ante la variación de la fuerza iónica de la fase móvil (relación carbonato/bicarbonato) en modo isocrático, como se describe en el **cuadro I**.

La determinación de las condiciones adecuadas para la detección de las especies Cr(III) y Cr(VI) en medio acuoso se realizó inicialmente de manera individual y luego se evaluó la separación de dichas especies en soluciones estándares con mezclas de éstas. La selección de condiciones adecuadas se realizó

en función de la respuesta obtenida en los parámetros de calidad cromatográfica como área (A), eficiencia (N), asimetría (As), anchura de pico (Wi), factor de retención (k'), resolución (Rs) y factor de separación entre bandas adyacentes (α).

En cuanto a la separación de las especies Cr(III) y Cr(VI) de manera simultánea, se analizó la variación de la respuesta en los parámetros cromatográficos de acuerdo con: (a) diferencia en la concentración y pH de la fase móvil, y (b) uso del gradiente de concentración en la fase móvil. Las concentraciones usadas en la fase móvil y sus correspondientes valores de pH se muestran en el **cuadro I**.

En cuanto al uso del gradiente de concentración, las corridas se iniciaron con la fase móvil A (2.8 mM Na_2CO_3 /3.4 mM NaHCO_3 , pH = 10.50) con introducción gradual de B (9.0 mM Na_2CO_3 /3.0 mM NaHCO_3 , pH = 10.90), hasta alcanzar el 100% de esta última en el tiempo t. Para ello se evaluaron dos factores, velocidad de flujo a tres niveles (1.0 1.5 y 2.0 mL/min) y tiempo de gradiente a ocho niveles (0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 y 2.0 min). El tiempo entre corridas para garantizar la estabilidad de la fase móvil A fue de 5 min.

La validación de los métodos se realizó mediante la evaluación de los parámetros: precisión, exactitud, límite de detección y de determinación, sensibilidad e intervalo de linealidad (Cámara et al. 2004).

Análisis estadístico

Las condiciones adecuadas para la separación y cuantificación de las especies de cromo se seleccionaron luego de la aplicación de un análisis de varianza (ANDEVA) de dos vías con diseño factorial 3×8 para velocidad de flujo y tiempo de gradiente, utilizando el programa estadístico Minitab 17.0.

Para realizar la comparación entre métodos se aplicó un ANDEVA de una vía con una prueba de

CUADRO I. FASES MÓVILES EMPLEADAS EN LA SEPARACIÓN ISOCRÁTICA DE LAS ESPECIES Cr(VI) Y Cr(III).

pH	$[\text{HCO}_3^-]$ (mM)	$[\text{CO}_3^{2-}]$ (mM)	Fuerza FM (mM)	$[\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}]$	Especie evaluada		
					Cr(VI)	Cr(III)	Ambas
10.24	6.0	3.0	9.0	2.00	No	Si	No
10.40	2.8	2.2	5.0	1.27	Si	Si	No
10.52	3.4	2.8	6.2	1.21	Si	Si	Si
10.33	1.7	1.8	3.5	0.94	Si	No	No
10.65	3.4	4.2	7.6	0.81	No	No	Si
10.76	4.0	6.0	10.0	0.67	No	No	Si
10.90	3.0	9.0	12.0	0.33	Si	Si	No

FM: fase móvil.

Tukey para la comparación de medias a un nivel de significancia del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Formación del complejo aniónico entre la especie Cr(III) y el ácido etilendiaminotetraacético

La reacción de formación del complejo Cr(III)-EDTA se ha descrito como una reacción compleja que se realiza en dos etapas. La primera es una fase lenta en la cual se realiza la preasociación y entrada del EDTA a la esfera interna, y la segunda una fase rápida que implica el desplazamiento de todos los ligandos de H_2O y OH^- por EDTA (Cerar 2015).

Experimentalmente, esta reacción logró completarse luego de una semana a temperatura ambiente, por lo que se hizo necesario evaluar la aplicación de calentamiento para acelerar la obtención del complejo, entre otros parámetros de importancia, como la relación molar metal:EDTA y el pH.

Al evaluar la influencia de los tiempos de calentamiento establecidos con una temperatura de 50°C sobre la absorbancia del complejo Cr(III)-EDTA se demostró que no existe diferencia significativa ($p > 0.05$) en los valores de absorbancia medidos con tiempos de calentamiento superiores a 60 min. Por otra parte, se demostró que no hay diferencia significativa ($p > 0.05$) al adicionar a la relación molar de reactivo para la formación del complejo EDTA en proporción 1:20 o superior. Algunos autores han reportado uso excesivo de EDTA, sin precisar la cantidad (Susuki y Serita 1985), en tanto que otros (más recientes) han referido el uso de EDTA en relación 100 mg/L Cr:1.9 mM EDTA, lo que corresponde a una relación molar 1:1 para la formación del complejo (Coetzee et al. 2004).

Por su parte, el espectro de absorción en la región UV-visible del complejo formado entre el Cr(III) y el

EDTA se obtuvo para valores de pH 2, 3 y 4, mostrando dos máximos de absorbancia, uno a 556 y 565 nm y otro de menor intensidad a 401 y 407 nm para pH 3 y 4, respectivamente. A pH 2 se registraron dos máximos con una absorbancia significativamente menor a 595 y 410 nm. De manera similar, Fernández y Alonzo (1956) reportaron que en el intervalo de pH comprendido entre 1.5 y 4.0, se alcanza el máximo valor de absorción y permanece prácticamente constante, decreciendo progresivamente al aumentar el pH de 4 a 13.

Por lo expuesto anteriormente, la formación del complejo para la presente investigación se realizó adicionando una relación molar Cr(III):EDTA de 1:20, aplicando calentamiento a 50°C durante 1 h, en un intervalo de pH de 3 a 4, midiendo la absorbancia a 556 nm.

Determinación de las especies Cr(VI) y Cr(III) mediante HPLC-iónico modo isocrático con detección por conductividad

Para la separación de las especies de cromo se partió del uso de la fase móvil 1.8 mM Na_2CO_3 /1.7 mM NaHCO_3 en condiciones isocráticas, realizando variaciones en la concentración de la fase móvil para cada especie de manera individual y luego de forma simultánea.

En la determinación de cromo hexavalente Cr(VI) como ion cromato (CrO_4^{2-}), éste mostró una fuerte interacción con la fase estacionaria debido a que los iones polivalentes (como es el caso del oxianión cromato) son retenidos con mucho mayor fuerza que las especies con una sola carga (Skoog et al. 2001). Esto provoca una retención alta en los sitios activos de la columna, que se refleja en altos tiempos de retención ($t_R > 1.8$ min) y en el aumento de éste a medida que disminuyen la fuerza iónica de la fase móvil o su pH (**Cuadro II**).

De acuerdo con los parámetros cromatográficos, la fase móvil compuesta por 3.0 mM NaHCO_3 /

CUADRO II. PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS OBTENIDOS EN LA DETERMINACIÓN DE Cr(VI) EN FUNCIÓN DE LAS FASES MÓVILES UTILIZADAS, EMPLEANDO UNA DISOLUCIÓN ESTÁNDAR DE 4 mg Cr(VI)/L, FLUJO DE 2 mL/min, VOLUMEN DE INYECCIÓN 50 μL EN MODO ISOCRÁTICO.

FM: Na_2CO_3 / NaHCO_3	Fuerza iónica	pH	t_R	Área	W_i	As	N
1.8 mM/ 1.7 mM	0.0045	10.33	6.521	40512	0.756	1.304	1188
2.2 mM/ 2.8 mM	0.0058	10.40	5.185	40789	0.582	1.363	1270
2.8 mM/ 3.4 mM	0.0073	10.52	3.946	39365	0.548	1.095	831
9.0 mM/3.0 mM	0.0195	10.90	1.806	41285	0.211	1.262	1164

FM: fase móvil, t_R : tiempo de retención (min), W_i : ancho de pico en la base (min), As: asimetría, N: eficiencia.

9.0 mM Na_2CO_3 favoreció la elución del ion cromato. Debido a su alta carga negativa, este ion requiere de una fase móvil con una alta fuerza iónica para ser eluido. Es decir, un aumento del pH para disminuir la interacción del ion cromato como resultado de un aumento en la concentración del contraión CO_3^{2-} . Esto propicia que el analito se eluya más rápidamente de la columna cromatográfica, observándose la disminución en el tiempo de retención, de manera que esta fase móvil provoca un aumento en el área del pico y disminuye de manera significativa su anchura con alta eficiencia.

En el caso de la especie Cr(III), se identificaron inicialmente los tiempos de retención del pico perteneciente al complejo aniónico $[\text{Cr(III)-EDTA}]^-$ y del pico correspondiente al exceso de EDTA. Para la determinación del Cr(III), por su alta fuerza iónica la fase móvil 9.0 mM Na_2CO_3 /3.0 mM NaHCO_3 usada en la determinación del Cr(VI) no

permitió la retención efectiva del complejo monoaniónico $[\text{Cr(III)-EDTA}]^-$, al igual que la fase móvil 3.0 mM Na_2CO_3 /6.0 mM NaHCO_3 (**Cuadro III**). En cambio, con el el ion $[\text{Cr(III)-EDTA}]^-$ se logró una mejor separación con menor fuerza iónica (2.8 mM Na_2CO_3 /3.4 mM NaHCO_3). Con esta fase móvil se logra una menor anchura de pico y mayor eficiencia, con resolución o separación entre los picos de Cr(III) y EDTA mayor a 1.5, lo cual indica una separación completa de los picos.

En cuanto a la determinación simultánea de las dos especies, en la **figura 1** se pueden observar, de izquierda a derecha: el pico 1, perteneciente al ion cloruro (Cl^-) correspondiente a la sal de cromo utilizada como estándar ($\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$); el pico2, correspondiente al exceso de EDTA; el pico 3 del complejo $[\text{Cr(III)-EDTA}]^-$, y el pico 4 correspondiente al ion cromato. Las pruebas se realizaron con un estándar de concentración 4 mg Cr(III)/L y

CUADRO III. PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS EN LA DETERMINACIÓN DE Cr(III) POR HPLC-IÓNICO UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FASE MÓVIL PARA UN ESTÁNDAR DE 4 mg Cr(III)/L EN MODO ISOCRÁTICO*.

$\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$	Fuerza iónica	t_R	Área	W_i	As	R	k'	N
1.8 mM/ 1.7 Mm	0.0045	1.900	880617	0.105	1.265	1.902	0.845	1574
2.2 mM/ 2.8 Mm	0.0058	2.608	431230	0.343	1.660	2.064	2.477	938
2.8 mM/ 3.4 Mm	0.0073	1.596	593112	0.166	1.410	1.564	1.128	1474
3.0 mM/6.0 Mm	0.0090	0.917	5228082	0.165	1.281	NA	NA	494
9.0 mM/3.0 Mm	0.0195	0.930	5945929	0.176	2.601	NA	NA	446

*Condiciones cromatográficas: columna analítica AS9-SC, velocidad de flujo 2 mL/min, volumen de inyección de 50 μL , tiempo total de corrida 5 min.

t_R : tiempo de retención (min), W_i : ancho de pico en la base (min), As: asimetría, R: resolución, k' factor de retención, N: eficiencia.

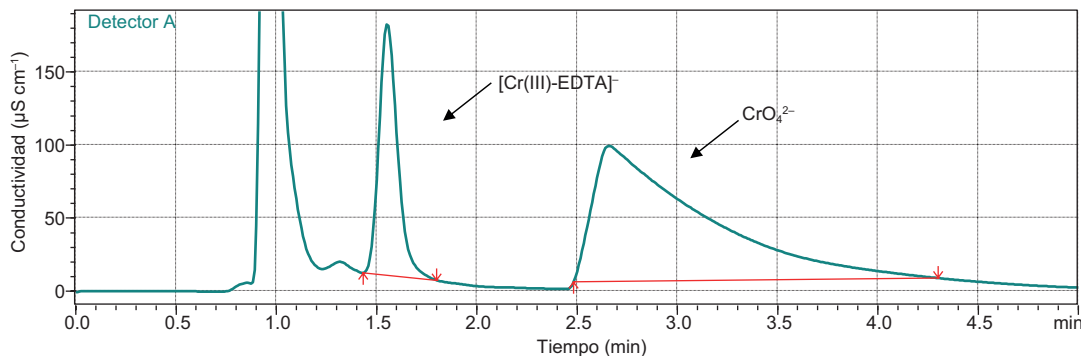


Fig. 1. Separación de las especies Cr(III) y Cr(VI) con la fase móvil 2.8 mM Na_2CO_3 /3.4 mM NaHCO_3 , para un estándar de 4 mg Cr(III)/L y 250 mg Cr(VI)/L. Condiciones cromatográficas: columna analítica AS9-SC, velocidad de flujo 2 mL/min, volumen de inyección de 50 μL , tiempo total de corrida 5 de min, modo isocrático. Pico 1: ion cloruro (Cl^-), pico2: exceso de EDTA, pico 3: complejo $[\text{Cr(III)-EDTA}]^-$, pico 4: ion cromato.

250 mg Cr(VI)/L debido a la diferencia en cuanto a intensidad de las especies. Esto se debe a que la conductividad iónica molar depende de factores como la carga y dimensión del ion, la viscosidad del medio y la temperatura, y es directamente proporcional a la carga del ion (Castellan 1998), por lo que se puede observar una mayor área bajo la curva para el ion polivalente.

La separación de ambas especies con la mayoría de las fases móviles evaluadas se logró con una buena resolución ($R > 1.5$; **Cuadro IV**). Sin embargo, el ion cromato (CrO_4^{2-}) mostró una fuerte interacción con la fase estacionaria, la cual se ve reflejada en una marcada simetría posterior ($As > 4.0$) que supera el valor adecuado en cuanto a parámetros de calidad analítica ($As < 1.5$). Esta asimetría posterior exhibe la dificultad del ion para abandonar la fase estacionaria y establece, por tanto, la necesidad de utilizar una fase móvil con mayor fuerza iónica.

La fuerte interacción del ion cromato con la fase estacionaria también determina un mayor tiempo de retención respecto a la especie Cr(III) como $[\text{Cr(III)-EDTA}]^-$, separada en este caso en forma del complejo monoaniónico, así como una baja eficiencia (79 y 119) para la determinación de este ion. Por otra parte, al utilizar una fase móvil con mayor fuerza iónica (4.2 mM CO_3^{2-} y 6.0 mM CO_3^{2-}) para la separación de ambas especies, se obtuvo un factor de retención menor a la unidad, lo que implica una elución muy rápida de la especie Cr(III).

Los resultados anteriores indican que se requiere mayor fuerza iónica de la fase móvil para mejorar

la elución de la especie Cr(VI). Sin embargo, como se expuso anteriormente, este tipo de fase móvil no favorece la retención de la especie Cr(III). Por ello se adoptó un nuevo enfoque en la búsqueda de la separación de estas especies, como es el uso del gradiente de concentración.

Determinación de las especies Cr(VI) y Cr(III) mediante HPLC-iónico modo gradiente

Los parámetros cromatográficos obtenidos para cada uno de los factores indicaron que con las diferentes velocidades se realizó una separación adecuada de las especies: $As < 1.5$, $R > 1.5$, k' en el intervalo de 0.8 a 3.0, además, de un factor de separación entre bandas adyacentes (α) > 2.5 . Sin embargo, se notaron diferencias en cuanto a la eficiencia obtenida, por lo que se realizó el análisis estadístico tomando como variable de respuesta el número de platos teóricos (N). El ANDEVA de dos vías aplicado al diseño factorial 3×8 para los factores velocidad de flujo y tiempo de gradiente, indicó que ambos factores mostraron efectos significativos frente a la eficiencia como respuesta. El factor tiempo de gradiente desde 0.1 hasta 0.5 min obtuvo la mayor eficiencia sin diferencia significativa ($p > 0.05$), en tanto que para el factor velocidad de flujo la mayor significancia en la eficiencia se observó con un nivel bajo de 1 mL/min. No obstante, tanto la velocidad de 1 mL/min como la de 1.5 mL/min se encuentran por encima del promedio general, generando las mejores eficiencias, con diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto al uso de una velocidad de 2 mL/min.

CUADRO IV. PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS EN LA SEPARACIÓN DE LAS ESPECIES Cr(VI) Y Cr(III) POR CROMATOGRAFÍA IÓNICA MODO ISOCRÁTICO, UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LA FASE MÓVIL PARA UN ESTÁNDAR DE 4 mg Cr(III)/L Y 250 mg Cr(VI)/L*, VELOCIDAD DE FLUJO DE 2 mL/min, VOLUMEN DE INYECCIÓN DE 50 μL .

FM: $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ (Fuerza iónica)	Especie	t_R	Área	W_i	As	R	k'	α	N
1.8 mM/1.7 mM (0.0045)	Cr(III)	1.85	1644546	0.132	1.17	3.902	0.845	2.759	1010
	Cr(VI)	3.59	3125479	0.810	4.65	1.887	3.162		79
2.8 mM/3.4 mM (0.0073)	Cr(III)	1.54	1093034	0.179	1.24	1.361	1.053	2.367	1184
	Cr(VI)	2.62	4091526	0.962	4.78	1.886	2.493		119
4.2 mM/3.4 mM (0.0101)	Cr(III)	1.31	1265296	0.147	1.28	1.298	0.747	2.534	1273
	Cr(VI)	2.17	4163030	0.729	4.51	1.949	1.893		142
6.0 mM/4.0 mM (0.0140)	Cr(III)	1.16	1191209	0.130	1.33	1.679	0.547	2.486	1267
	Cr(VI)	1.77	4344720	0.536	4.10	1.829	1.360		174

FM: fase móvil, t_R : tiempo de retención (min), W_i : ancho de pico en la base (min), As: asimetría, R: resolución, k' : factor de retención, N: eficiencia, α : factor de separación entre bandas adyacentes.

Por tanto, para la elección de la mejor condición de separación para las especies Cr(III) y Cr(VI), es necesario tomar en cuenta el tiempo total de corrida, que incluye el tiempo entre corridas de 5 min para garantizar la estabilización de la fase móvil A o fase móvil inicial. Por esta razón se seleccionó la velocidad de 1.5 mL/min, con un tiempo de gradiente de 0.5 min, cuyo tiempo total de corrida fue de 10 min.

En la **figura 2** se muestra la separación de las especies Cr(III) y Cr(VI) para las condiciones seleccionadas, es decir, usando gradiente, fase móvil (A) de 2.8 mM Na₂CO₃/3.4 mM NaHCO₃, fase móvil B de 9.0 mM Na₂CO₃/3.0 mM NaHCO₃, velocidad de flujo de 1.5 mL/min, volumen de inyección de 50 µL, $t_{\text{gradiente}}$ de 0.5 min y tiempo de corrida de 5 min. Se pueden observar tres picos bien diferenciados,

el primero del ion cloruro, el segundo correspondiente al complejo [Cr(III)-EDTA]⁻ y el tercero de CrO₄²⁻, el cual aparece después del cambio de la fase móvil que se aprecia en la figura a partir de los 2.5 min con un ligero aumento en la conductividad de la línea base.

En el **cuadro V** se muestran los parámetros de calidad analítica para el método que permite la separación de ambas especies de cromo mediante cromatografía iónica con el uso de gradiente. Se observa un amplio intervalo de linealidad para Cr(VI), significativamente mayor al reportado por el método colorimétrico convencional descrito en el Análisis de aguas potables y residuales 3500-Cr B publicado por APHA-AWWA-WEF (2017), que se ha establecido en 0.1-4.0 mg/L (Doria et al. 2013)

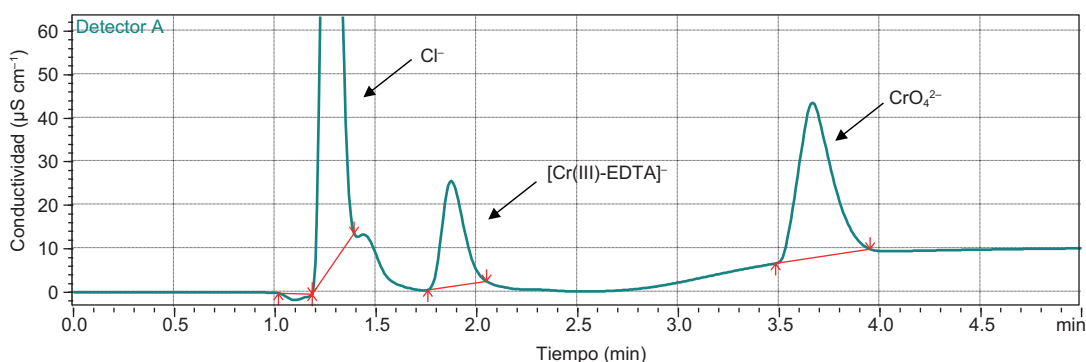


Fig. 2. Separación de las especies Cr(III) y Cr(VI) usando gradiente, fase móvil (A): 2.8 mM Na₂CO₃/3.4 mM NaHCO₃ y fase móvil B: 9.0 mM Na₂CO₃/3.0 mM NaHCO₃, para un estándar de 1 mg Cr(III)/L y 25 mg Cr(VI)/L. Condiciones cromatográficas: columna analítica AS9-SC, velocidad de flujo de 1.5 mL/min, volumen de inyección de 50 µL, $t_{\text{gradiente}}$ de 0.5 min, tiempo total de corrida de 5 min. De izquierda a derecha: pico 1: ion cloruro (Cl⁻), pico 2: exceso de EDTA, pico 3: complejo [Cr(III)-EDTA]⁻, pico 4: ion cromato.

CUADRO V. PARÁMETROS DE CALIDAD DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE LAS ESPECIES Cr(III) Y Cr(VI) EN MEDIO ACUOSO MEDIANTE CROMATOGRFÍA IÓNICA EN MODO GRADIENTE.

Parámetro	Cr(III)	Cr(VI)
Intervalo de linealidad	0.10 a 2.50 mg/L	0.25 a 50.00 mg/L
Curva de calibración	$Y = 138000 X - 10100$	$Y = 15371 X + 893$
Coefficiente de correlación	0.9991	0.9999
Límite de detección	0.002029 mg/L	0.07247 mg/L
Límite de cuantificación	0.006764 mg/L	0.2416 mg/L
Repetibilidad	0.493±0.012 mg/L (2.34)	0.252±0.010 mg/L (4.03)
Promedio ± DE (% CV)	2.510±0.857 mg/L (0.86)	10.220±0.106 mg/L (1.04)
Reproducibilidad	0.952±0.026 mg/L (2.71)	9.9798±0.340 mg/L (3.41)
Sensibilidad analítica	138000 intensidad L/mg	15371 intensidad L/mg

DE: desviación estándar; % CV: coeficiente de variación.

CUADRO VI. COMPARACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO DESARROLLADO CON EL MÉTODO COLORIMÉTRICO DESCRITO ANTERIORMENTE PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ESPECIE Cr(VI).

Muestra	Método HPLC-iónico*	Método UV-visible*
Muestra 1	3.643 ± 0.122 mg/L (3.36)	3.620 ± 0.085 mg/L (2.34)
Muestra 2	6.258 ± 0.070 mg/L (1.12)	5.674 ± 0.056 mg/L (0.98)

*Promedio ± desviación estándar (% coeficiente de variación).

HPLC-iónico: cromatografía líquida de alta resolución en modo iónico;

UV-visible: ultravioleta visible.

con un coeficiente de correlación cercano a la unidad. El LD permite la detección de concentraciones de 0.072 mg/L y cuantificación de 0.242 mg/L. Esto indica que el nivel máximo de contaminación de 0.10 mg/L de cromo en agua, establecido por la Agencia de Protección Ambiental estadounidense (US-EPA) se puede determinar con una precisión adecuada dada por un coeficiente de variación (CV) menor a 5 %, al igual que los valores límite permisibles para la descarga de aguas residuales a cuerpos de agua (2.0 mg/L) según la Gaceta Oficial venezolana (GO 1995), por lo que es adecuado para el seguimiento de aguas contaminadas en tratamiento.

Se puede observar que la detección del Cr(III) se realiza con límites de detección y cuantificación significativamente menores (LD = 0.001967 mg/L y LC = 0.00656 mg/L) a los presentados en la forma hexavalente, además de una mayor sensibilidad para la detección.

Para realizar la comparación de este método con el método colorimétrico normalizado establecido por APHA-AWWA-WEF (2017) se midieron muestras acuosas provenientes de ensayos de fitorremediación por ambos métodos y a los resultados obtenidos se aplicó un ANDEVA de una vía con prueba de Tukey a un nivel de significancia del 95 % (**Cuadro VI**). Mediante el análisis estadístico se comprobó que no existe diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los resultados obtenidos por el método propuesto de cromatografía iónica con gradiente, y los obtenidos por el método colorimétrico UV-visible para la determinación de Cr(VI).

El método desarrollado resulta ser confiable, preciso y sensible, con ventajas como la identificación y cuantificación de ambas especies de manera simultánea, con el uso de reactivos poco agresivos para el ambiente (Na_2CO_3 , NaHCO_3) en volúmenes mínimos, con una reducción significativa en cuanto al volumen de desechos peligrosos generados.

CONCLUSIONES

El método desarrollado utilizando HPLC-iónico con detección de conductividad demostró su eficiencia y precisión para la separación y cuantificación de las especies Cr(III) y Cr(VI) en medio acuoso, sin diferencia significativa con el método estandarizado por espectrometría de absorción molecular UV-visible, que es adoptado hasta ahora por la US-EPA. Las ventajas de los métodos cromatográficos radican en la determinación simultánea de ambas especies, además del uso de reactivos poco agresivos para el ambiente con generación de bajos volúmenes de desecho.

REFERENCIAS

- Allen H. (1993). The significance of trace metal speciation for water, sediment and soil quality criteria and standards. *Science of the total Environment* 134 (1), 23-45. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(05\)80004-X](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(05)80004-X)
- Amaro R., Murillo M., Escalona A., Lucena R. y Verdú R. (2005). Seguimiento del proceso de conversión y eliminación del Cr(VI) y Cr(III) en las aguas de una industria de cromado por HPLC-ICP-OES. *Ciencia* 13 (1), 78-84.
- APHA-AWWA-WEF (2017). Standard methods for the examination of water and wastewater. 23rd ed. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Washington DC, 1325 pp.
- Breslin D. y Branagan L. (2019). Electrochemical detection of Cr(VI) with carbon nanotubes decorated with gold nanoparticles. *Journal of Applied Electrochemistry* 49, 195-205. <https://doi.org/10.1007/s10800-018-1259-2>
- Cámara C., Fernández P., Martín A. y Pérez C. (2004). Toma y tratamiento de muestras. Editorial Síntesis, Madrid, España, 334 pp.
- Castellan G. (1998). Fisicoquímica. 2ª ed. Pearson Educación, México, 1084 pp.

- Cerar J. (2015). Reaction between chromium (III) and EDTA ions: An overlooked mechanism of case study reaction of chemical kinetics. *Acta Chimica Slovenica* 62 (3), 538-545. <https://doi.org/10.17344/acsi.2015.1492>
- Coetzee P., Fischer J. y van Vuuren S. (2004). Chromium speciation analysis by ion chromatography coupled with inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy. *South African Journal of Chemistry* 57, 8-14.
- Dimitrakopoulos I., Tserepa H. y Thomaidis N. (2012). Analytical methods for the determination of traces of Cr(VI) in water samples with suppressed ion chromatography. *Analytical Letters* 45 (5-6), 570-580. <http://dx.doi.org/10.1080/00032719.2011.649454>
- Fernández R. y Alonzo E. (1956). Determinación espectrofotométrica de cromo (III) con la sal disódica del ácido etilén-diamino-tetra-acético (Complexona III). *Junta de Energía Nuclear* 4, 1-9.
- GO. (1995). Gaceta Oficial Extraordinaria N° 5.021 (1995). Decreto N° 883. Normas para la clasificación y el control de la calidad de los cuerpos de agua y vertido o efluentes líquidos. Comisión nacional de normas técnicas para la conservación, defensa y mejoramiento del ambiente, Caracas, República Bolivariana de Venezuela, 18 de diciembre.
- Hernández F., Séby F., Millour S., Noël L. y Guérin T. (2017). Analytical methods. Optimisation of selective alkaline extraction for Cr(VI) determination in dairy and cereal products by HPIC-ICPMS using an experimental design. *Food Chemistry* 214 (6), 339-346. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.099>
- Hernández F., Jitarua P., Cormanta F., Noël L. y Guérin T. (2018). Analytical methods. Development and application of a method for Cr(III) determination in dairy products by HPLC-ICP-MS. *Food Chemistry* 240 (5), 183-188. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.110>
- Doria Herrera GM., Paz Ordóñez P.A. y Hormaza Anaguan A. (2013). Estandarización de la difenilcarbazida como indicador y acomplejante en la identificación de cromo hexavalente – Cr (VI). *Revista Producción + Limpia* 8 (2), 9-20.
- Milačič R. y Ščančar J. (2020). Cr speciation in foodstuffs, biological and environmental samples: Methodological approaches and analytical challenges. A critical review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 127, 1-24. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115888>
- Skoog D., Holler F. y Nieman T. (2001). Principios de análisis instrumental. 5ª ed. McGraw-Hill, España, 795 pp.
- Spanu D., Monticelli D., Binda G., Dossi C., Rampazzi L. y Recchia S. (2021). One-minute highly selective Cr(VI) determination at ultra-trace levels: An ICP-MS method based on the on-line trapping of Cr(III). *Journal of Hazardous Materials* 412, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125280>
- Susuki Y. y Serita F. (1985). Simultaneous determination of water-soluble trivalent and hexavalent chromium by anion exchange high pressure liquid chromatography. *Industrial Health* 23 (3), 207-220. <https://doi.org/10.2486/indhealth.23.207>
- Wyantuti S., Ishmayana Y. y Hartati. (2015). Voltametric determination of Cr(VI) using gold nanoparticles-modified glassy carbon electrode. *Procedia Chemistry* 16, 15-23. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2015.12.010>