

Propiedades toxicológicas y ambientales de un electrolito de cromado basado en CrIII/cloruro de colina

TOXICOLOGICAL AND ENVIRONMENTAL PROPERTIES OF A CrIII/CHOLINE CHLORIDE BASED CHROME PLATING ELECTROLYTE



DOI: <http://dx.doi.org/10.6036/7178> | Recibido: 04/06/2014 • Aceptado: 03/02/2015



Lourdes Yurramendi-Sarasola, Susana Caballero-Román,
Noelia Alvarez-Luque, Usoa Izaguirre-Etxeberria,
Paco Cano-Iranzo

TECNALIA. Paseo Mikeletegi 2, Parque Tecnológico -
20009 San Sebastián (Guipúzcoa). Tfno: +34 946 430 850

ABSTRACT

• At present, industrial application of hard chromium electroplating is based on electrolytic baths of sulphuric acid and chromium trioxide solutions in water. Toxicological and environmental properties of these chromium (VI) baths show the convenience of searching for new CrVI free formulations. Research activities have shown that chromium metallic coatings from an ionic liquid (IL) using trivalent chromium salts can be successfully produced. A highly promising CrVI free, bright, thick and hard chromium deposition process has been developed based on an ionic liquid composed of Chromium chloride ($\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) and Choline chloride ($\text{HOC}_2\text{H}_4\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{Cl}^-$).

Jointly with technological properties evaluation, a methodological study on environmental risk analysis and on implications in health & safety for the referred ionic liquid bath has been carried out. With that aim, experimental tests on the basis of toxicological properties, of effects on human health and of environmental effects were conducted. Comparisons of the obtained results with the behaviour of traditional baths used for the same purpose were also accomplished, showing for the ionic liquid formulation a lower toxicity and less environmental risk than for the CrVI formulation.

• **Keywords:** hard chrome plating, ionic liquid, chromium chloride, choline chloride, toxicity, environmental properties.

RESUMEN

En la actualidad, el cromado duro a nivel industrial utiliza baños electrolíticos de ácido sulfúrico y soluciones de trióxido de cromo en agua. Las propiedades toxicológicas y ambientales de estos baños de cromo (VI) aconsejan buscar nuevas fórmulas libres de CrVI. Actividades de investigación realizadas con anterioridad han demostrado que los recubrimientos metálicos de cromo duro a partir de un líquido iónico (LI) compuesto de sales de cromo trivalente pueden ser llevados a cabo con éxito. Así, se ha desarrollado un prometedor proceso de deposición de cromo duro en base a un líquido iónico, compuesto de cloruro de cromo ($\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) y cloruro de colina ($\text{HOC}_2\text{H}_4\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{Cl}^-$), libre de CrVI.

Conjuntamente con la evaluación de las propiedades tecnológicas, se ha llevado a cabo un estudio metodológico sobre el análisis de los riesgos ambientales así como sobre las implicaciones en la salud y en la seguridad, teniendo en consideración el líquido iónico mencionado. Con este propósito, se han realizado diferentes ensayos para evaluar las propiedades toxicológicas, los efectos en la salud humana y en el medioambiente. Así mismo, se ha elaborado una comparativa de los resultados obtenidos con la nueva formulación frente al comportamiento de los baños tradicionales utilizados para el mismo propósito, quedando demostrado que la formulación basada en el líquido iónico presenta una toxicidad inferior y un menor riesgo ambiental.

Palabras clave: recubrimiento de cromo duro, líquido iónico, cloruro de cromo, cloruro de colina, toxicidad, propiedades medioambientales.

1. INTRODUCCIÓN

El cromo es el material más utilizado en el acabado superficial de metales debido a las excelentes propiedades que imparte a los sustratos y a que los procesos utilizados son ampliamente conocidos, experimentados y eficientes desde el punto de vista económico. En los últimos años, sin embargo, el uso y la emisión de cromo hexavalente se encuentran bajo la creciente atención de los distintos organismos reguladores debido a sus efectos adversos en la salud y en el medio ambiente. El proceso de recubrimiento con cromo duro es la aplicación de cromo más utilizada en el acabado de superficies. Se usa de forma habitual en aplicaciones que requieren recubrimientos duros y resistentes ya sea en partes nuevas o en partes reacondicionadas. La capa aplicada es relativamente gruesa, por lo

general entre 0,25 y 0,76 mm, por ello resulta apropiado para la restauración dimensional. En las aplicaciones aeroespaciales, el recubrimiento de cromo es el preferido de los recubrimientos resistentes al desgaste para el sistema hidráulico, el tren de aterrizaje, los ejes giratorios, engranajes y superficies que se encuentran sometidos a deterioro por deslizamiento o rodadura. Las posibles sustituciones del proceso de cromado duro incluyen aplicaciones de níquel no electrolítico, diversos compuestos de níquel-tungsteno, aleaciones de cobalto, aplicaciones en forma de spray pulverizador de plasma y procesos de deposición al vacío. Ninguno de ellos ha ofrecido la totalidad de las excelentes cualidades del recubrimiento con cromo [1].

Los líquidos iónicos (LIs) son clasificados como sales que se encuentran líquidas a temperaturas por debajo de los 100 °C. Han sido ampliamente estudiados principalmente en aplicaciones sintéticas y electroquímicas. Los LIs tienen importantes propiedades físicas y químicas que los hacen ideales para el procesamiento de metales: amplio rango de potencial, alta solubilidad de sales metálicas, rechazan el agua y las formulaciones metal/agua, y alta conductividad en comparación con los disolventes no acuosos. Frank Endres y colaboradores recogieron los principales aspectos de la electrodeposición con diferentes tipos de líquidos iónicos [2]. Los líquidos iónicos basados en cloroaluminato son considerados como la primera generación de LIs. Su naturaleza higroscópica ha dificultado su uso, ya que deben de ser preparados y manipulados en atmósferas gaseosas inertes. La síntesis de LIs estables al agua y al aire, considerados como la segunda generación de LIs, ha suscitado un gran interés en diversos campos. Los LIs estables al agua más populares son los que contienen aniones tales como tetrafluorborato (BF_4^-), hexafluorofosfato (PF_6^-) y bis-trifluorometilsulfonil imida (TFSI-). Dos revisiones realizadas por Endres [3, 4] cubren todos los aspectos relativos a la electrodeposición con estos líquidos. Mientras que los líquidos iónicos con aniones discretos, como los mencionados, muestran un gran potencial para la electrodeposición de metales electronegativos, como por ejemplo el aluminio, cuestiones como la toxicidad y la disponibilidad limitan su uso práctico en aplicaciones a mayor escala con otros metales.

Un planteamiento alternativo para producir líquidos iónicos es partir de un haluro de amonio cuaternario simple e ir disminuyendo el punto de congelación mediante acomplejamiento de los aniones con el fin de deslocalizar la carga eléctrica. Estos líquidos iónicos eutécticos, desarrollados por el grupo de A. P. Abbott, pueden ser descritos mediante la fórmula general: $\text{R}_1\text{R}_2\text{R}_3\text{R}_4\text{N}^+\text{X}^- \cdot z\text{Y}$, donde $\text{R}_1\text{R}_2\text{R}_3\text{R}_4\text{N}^+$ es un catión amonio cuaternario, X es en general es un anión haluro, Y es el ácido Lewis o Brønsted y z es el número de moléculas Y que acomplejan a X, y se han caracterizado en tres tipos dependiendo del agente complejante Y, por lo tanto Tipo 1: $\text{Y} = \text{MClx}$, $\text{M} = \text{Zn}, \text{Sn}, \text{Fe}, \text{Al}, \text{Ge}$, [5, 6]; Tipo 2: $\text{Y} = \text{MClx} \cdot y\text{H}_2\text{O}$ [7] y Tipo 3: $\text{Y} = \text{RZ}$, $\text{Z} = \text{CONH}_2, \text{COOH}, \text{OH}$ [8]. La mayoría de los estudios anteriores se han centrado en el cloruro de colina como sal de amonio cuaternario, ya que no es tóxica, es biodegradable, y está siendo utilizada como un componente común a numerosas referencias y productos industriales. Por todo ello, se puede aplicar a procesos a gran escala. Los estudios previos realizados en este campo por A. P. Abbott y colaboradores, describen la electrodeposición de

aleaciones cinc-estaño [9] y de cromo negro [10] a partir de líquidos iónicos eutécticos.

Una red de treinta y tres empresas, instituciones académicas y asociaciones comerciales han estado trabajando en la investigación, ampliación y comercialización de procesos de galvanoplastia y pulido electrolítico basados en torno a estos nuevos líquidos iónicos en la red IONMET [11], proyecto integrado financiado por el Programa Marco FP6. Entre los estudios realizados, se desarrolló un nuevo proceso de electrolisis mediante un líquido iónico constituido por cloruro de cromo/ cloruro de colina fue estudiado por Benaben y colaboradores [12], con la finalidad de obtener un recubrimiento duro y brillante de cromo metálico aplicado en un sustrato de acero, presentando unas interesantes propiedades. La falta de información y la incertidumbre en torno al impacto ambiental de los LIs es una barrera importante para la utilización de estos compuestos en la industria. Se han realizado esfuerzos para superar este inconveniente y ofrecer una primera visión sobre el comportamiento de los LIs en medios acuosos, así mismo numerosos estudios han proporcionado una amplia información, por ejemplo, sobre ecotoxicidad, biodegradabilidad, bioacumulación y distribución de los LIs en diferentes escenarios ambientales. La revisión realizada por Y. Yun [13] indicaba que los LIs comúnmente utilizados hasta la fecha son tóxicos para el medio ambiente y su toxicidad varía ampliamente en función de los organismos y niveles tróficos. En general, el efecto de las moléculas aniónicas no es tan drástico como el efecto que producen las moléculas alquídicas largas, excepto en el caso de $[(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}]$ que presenta un claro potencial de riesgo ecotoxicológico.

Este trabajo se centra en las propiedades toxicológicas y ambientales de un líquido iónico, en un contexto del análisis de riesgos en su aplicación en el proceso de recubrimiento de cromo duro. La disolución utilizada en la aplicación de galvanoplastia se compone de cloruro de cromo hexahidratado y cloruro de colina. El cloruro de colina es una sal de amina cuaternaria: cloruro de 2-hidroxi- N, N, N-trimetilamina [14], que en agua se disocia en el correspondiente hidroxialquilamonio cuaternario cargado positivamente y en el ion cloruro cargado negativamente (Fig.1).

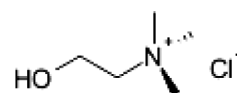


Fig.1: Fórmula estructural del cloruro de colina

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. PREPARACIÓN DEL BAÑO

El baño basado en el líquido iónico para el proceso de cromado duro fue preparado siguiendo las instrucciones del proyecto IONMET [11]. El cloruro de cromo hexahidratado (97% mínimo) y el cloruro de colina (99%) fueron utilizados sin tratamiento previo de deshidratación. Estos dos compuestos fueron mezclados en una determinada relación molar, a la mezcla se le añade agua desionizada hasta un porcentaje límite; la reacción es de tipo endotérmico. Por último, la mezcla se calienta con agitación a 40 °C hasta su total disolución, obte-

niéndose entonces una disolución de color verde. La concentración de cromo en la solución final fue de aproximadamente 85 g/L. Los resultados obtenidos en el análisis inicial del baño se muestran en la Tabla 1.

Parámetros	Baño de cloruro de cromo/cloruro de colina
pH (dilución 1/10)	2,48
Cr (g/L)	84,5
Cloruro (g/L)	230
Nitrógeno total (g N/L)	58,9
DQO (Demanda química de oxígeno) (g O ₂ /L)	195
DBO5(mg O ₂ /L)	75
COT (Carbono orgánico total) (mg C/L)	235

Tabla 1: Análisis del baño

2.2. METODOLOGÍA

Con la finalidad de estudiar la potencial toxicidad de los líquidos iónicos se han llevado a cabo diferentes tipos de ensayos, todos ellos realizados bajo los criterios de la Directiva 67/548/CEE [15] y de las Directrices de la OCDE. Las pruebas realizadas se clasifican en tres categorías siguiendo el criterio del Anexo VI de la Directiva del Consejo 67/548/CEE:

- Clasificación según las propiedades toxicológicas: ensayo de toxicidad aguda (oral y dérmica) y ensayo de irritación (dérmica y ocular).
- Clasificación según los efectos específicos sobre la salud humana: ensayos de mutagenicidad y citotoxicidad bacteriana.
- Clasificación según los efectos sobre el medio ambiente: se llevaron a cabo dos tipos diferentes de pruebas am-

bientales, pruebas de toxicidad en organismos acuáticos (test con *Vibrio fischeri* y test con *Daphnia magna*), y ensayo de biodegradabilidad.

La Tabla 2 muestra un resumen de los ensayos realizados y los métodos utilizados para el líquido iónico en su aplicación para los procesos de cromado duro.

2.2.1. ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA ORAL Y DERMICA

El objetivo de los ensayos de toxicidad aguda oral y dérmica es la evaluación de los efectos adversos (letalidad) que ocurren en el periodo de 24 horas tras la administración de una única dosis de una determinada sustancia por vía oral o dérmicamente. El resultado del ensayo, permite estimar estadísticamente la DL₅₀, concentración de muestra capaz de provocar la muerte del 50% de los animales, expresada como peso de la muestra por unidad de peso del animal (mg/kg).

Cuando existe información que sugiera que la muestra no va a provocar mortalidad en los animales, se realiza el Ensayo Límite, que consiste en comenzar por la dosis más alta (2000 mg/kg de peso animal). El Ensayo Límite es una versión simplificada del ensayo de toxicidad aguda, permitido con el fin de reducir el número de animales necesarios para obtener la DL₅₀. Si con la dosis límite no se observa mortalidad ni efectos adversos en los animales, no es necesario continuar con dosis más bajas.

Los animales, Ratas Wistar Hannover, fueron aclimatadas en el animalario durante 5 días antes de ensayo. Los animales se alojan de forma individual y se mantienen a una temperatura de 22°C± 3°C y una humedad de 30-70%. La iluminación es artificial con una secuencia de 12 horas de luz y 12 horas del día. En el ensayo de toxicidad aguda oral se utilizan tres animales a los que se les administra la muestra de forma oral. Para el ensayo de toxicidad aguda dérmica, son utilizados tres animales, a los que se les aplica la muestra dérmicamente. Dos animales sirven como control de ensayo. Se observan los efectos adversos y/o mortalidad de los animales durante 14 días tras la administración de la muestra.

Ensayo	Método
Toxicidad aguda	Toxicidad aguda oral. Anexo V de la Directiva del Consejo 67/548/CEE
	Toxicidad dérmica aguda. Anexo V de la Directiva 67/548/CEE
Irritación	Irritación cutánea aguda. Anexo V de la Directiva 67/548/CEE
	Irritación ocular aguda. Anexo V de la Directiva 67/548/CEE
Mutagenicidad	Mutagenicidad bacteriana. Directrices OCDE test nº 471 y Anexo V de la Directiva 67/548/CEE del Consejo
Citotoxicidad bacteriana	Citotoxicidad bacteriana. Directrices OCDE test nº 471 y Anexo V de la Directiva 67/548/CEE del Consejo
Toxicidad en organismos acuáticos	Bioluminiscencia por inhibición, ensayo <i>Vibrio fischeri</i>
	Toxicidad aguda en <i>Daphnia magna</i> . Directrices OCDE test nº 202 y Anexo V de la Directiva 67/548/CEE
Biodegradabilidad	Método de respirometría manométrica. Directrices OCDE Test nº 301F y método C4D del Anexo V de la Directiva 67/548/CEE

Tabla 2: Resumen de ensayos y métodos

2.2.2 ENSAYOS DE IRRITACIÓN DÉRMICA Y OCULAR

El objetivo de los ensayos de irritación dérmica y ocular es la evaluación de la toxicidad y de los efectos irritantes producidos por una sustancia en la piel y en los ojos de los animales.

En el ensayo de irritación dérmica se utiliza como modelo animal conejo albino (New Zealand, Harlan). Se utiliza un conejo al que se aplica la muestra en una zona de la piel, dejándose otra zona sin tratar como control de ensayo. Tras 4 horas de contacto, la muestra se retira y se realiza la evaluación de la piel (formación de eritemas y/o edemas), al cabo de 24, 48 y 72 horas desde la aplicación.

En el ensayo de irritación ocular se utiliza como modelo animal conejo albino (New Zealand, Harlan). Los ojos de los conejos son evaluados 24 horas antes del ensayo, rechazando aquellos que muestren irritación, defectos o lesiones oculares. Se utiliza un conejo, sobre el que se le aplica la muestra en una sola dosis en uno de los dos ojos, el ojo no tratado se utiliza como control. Los ojos se examinan tras 24, 48 y 72 horas de la aplicación de la muestra y se observan durante 14 días, con el fin de evaluar si hay reversibilidad de los defectos. Las ulceraciones en la córnea se estudian mediante fluorescencia.

2.2.3. ENSAYOS DE MUTAGENICIDAD Y CITOTOXICIDAD BACTERIANA

Los ensayos se realizan según el método de ensayo descrito en el Anexo V de la Directiva 67/548/CEE y ECDE 471 [16]. El ensayo de mutación inversa en bacterias se utiliza como ensayo inicial para valorar la actividad genotóxica y en particular la inducción de mutaciones puntuales. El objetivo del ensayo es detectar mutaciones que revertían las mutaciones presentes en la cepa bacteriana utilizada (*Escherichia coli*), restaurando la capacidad funcional de la bacteria de sintetizar un aminoácido esencial (Tryptófano en este caso). Las bacterias revertientes son detectadas por la capacidad de crecer en ausencia de este aminoácido requerido para esta cepa. Paralelamente se realiza el ensayo de supervivencia o citotoxicidad bacteriana, que se lleva a cabo para medir la influencia (toxicidad) de la muestra en el crecimiento de la bacteria.

Las bacterias son expuestas a la muestra objeto de estudio, en presencia y en ausencia de un sistema de activación metabólica exógena (necesario en los ensayos in vitro, para simular una activación in vivo en mamíferos). Se utiliza el método de incorporación en placa, por el cual las suspensiones (muestra, cultivo bacteriano fresco y activación metabólica) se mezclan con agar de recubrimiento y se vierten inmediatamente en un

medio mínimo (con triptófano para permitir unas pocas divisiones celulares). Tras 2-3 días de incubación se cuentan las colonias revertidas y se compara con el número de colonias revertientes espontáneamente en las placas de control sin muestra. Una sustancia se considera mutagénica cuando el número de colonias revertientes, que crece en las placas con la muestra es significativamente superior al número de colonias en las placas control. Un aumento estadísticamente significativo dosis-respuesta, en el número de revertientes es considerado un resultado positivo. Una sustancia es considerada citotóxica, cuando el número de colonias que crecen en las placas con muestra es significativamente menor, que las que crecen en las placas control sin muestra.

2.2.4. ENSAYO DE TOXICIDAD VIBRIO FISCHERI

El objetivo del ensayo de toxicidad en *Vibrio fischeri* es determinar la concentración de la muestra que inhiba la luminiscencia de una bacteria luminiscente (*Vibrio fischeri*) al 50% (CE50), con el fin de evaluar la ecotoxicidad de la muestra. La Figura 3 muestra una microfotografía de la bacteria teñida con fluoresceína. El ensayo Microtox®, mide la emisión de luz de la bacteria antes y después de 15 minutos de la exposición a diferentes concentraciones de la muestra [17]. Se prepara una solución bioluminiscente de bacterias; las concentraciones de la muestra se prepararan con una solución diluyente. Una alícuota de las bacterias luminiscente se pone en contacto con distintas diluciones de la muestra. Tras 5 y 15 minutos de contacto, se mide en cada dilución, la intensidad de luminiscencia. Se utiliza un control sin muestra para corregir la perdida de intensidad de luminiscencia con el tiempo[18].

2.2.5. ENSAYO DE TOXICIDAD DAPHNIA MAGNA

El objetivo del ensayo de Toxicidad en *Daphnia magna*, es determinar la concentración de la muestra que provoca la inmovilización de un 50% de las daphnias (CE50). Una daphnia se considera inmovilizada cuando no es capaz de nadar durante los 15 segundos siguientes a una ligera agitación del recipiente donde se encuentra. Las daphnias (Figura 4) son expuestas a un rango de concentraciones en una solución acuosa, durante 48 horas. La solución de ensayo y las diluciones se realizan en el momento de ponerlas en contacto con las daphnias. Las diluciones se realizan siguiendo una serie geométrica, con ratios de concentración no superiores a 2.2. Como control de ensayo la solución diluyente sin la muestra. Por cada

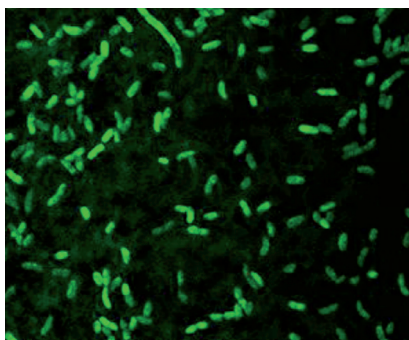


Fig. 3: *Vibrio fischeri* tintadas con fluoresceína para evaluaciones toxicológicas



Fig. 4: *Daphnia magna* utilizada para evaluaciones toxicológicas

concentración de ensayo se exponen 20 daphnias, en grupos de 5 animales. Las daphnias son evaluadas a las 24 y 48 horas tras la exposición de la muestra. La inmovilización de las daphnias en el grupo control, no debe exceder del 10% de las evaluadas. El método de ensayo se describe en el Anexo V de la Directiva 67/548/CEE y en las directrices OCDE 202 [19].

2.2.6. ENSAYO DE BIODEGRADABILIDAD

El objetivo de este ensayo es conocer si los líquidos iónicos pueden ser clasificados como biodegradables, es decir, saber si la descomposición de las sustancias químicas que intervienen en la formulación es posible en un medio fisiológico. La predicción de la biodegradabilidad es un método de cálculo basado en aspectos biológicos que intenta predecir la biodegradabilidad de materiales antropogénicos en el medio ambiente.

La biodegradabilidad del LI fue evaluada por medio del test de respirometría manométrica, de conformidad con las directrices OCDE 301F [20] y el método C4D del Anexo V de la Directiva del Consejo 67/548/CEE [15]. Un volumen medido de medio mineral inoculado, conteniendo una concentración conocida de la sustancia de ensayo (50 µl) como única fuente nominal de carbono orgánico (muestra + fangos activos), se agita en un frasco cerrado a temperatura constante (22° C) durante un periodo máximo de 28 días. El consumo de oxígeno se determina midiendo el cambio en la presión que se produce en el aparato. La cantidad de oxígeno consumido por la población microbiana (4 ml de fangos activos) durante la biodegradación de la sustancia de ensayo se expresa como porcentaje de DBO (demanda bioquímica de oxígeno). Si el porcentaje de biodegradación es mayor del 60% la sustancia se considera biodegradable. Un control (fangos activos) sin la sustancia de ensayo, es ensayado para comprobar que el test funciona correctamente.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA ORAL Y DERMICA

No se producen signos de toxicidad ni tampoco la muerte de ningún animal en el ensayo de toxicidad oral y dérmica. Todos los animales tratados experimentan un aumento de peso. Por lo tanto la DL50 es superior a 2.000mg/kg peso corporal. De acuerdo a los resultados obtenidos y según el Anexo VI de la Directiva del Consejo 67/548/CEE, Clasificación, Embalaje y Etiquetado de sustancias peligrosas, la muestra ensayada no es nociva ni toxica por vía oral ni por vía cutánea.

3.2. ENSAYOS DE IRRITACIÓN AGUDA DERMICA Y OCULAR

En el ensayo de irritación dérmica, no se produce la formación de eritema ni de edema. Sin embargo en el ensayo de irritación ocular, el contacto de la muestra con el ojo del conejo, le causa sufrimiento y consecuentemente lesiones en el ojo. La muestra fue eliminada inmediatamente del ojo y lavado con abundante suero estéril. De acuerdo a estos resultados y según el Anexo VI de la Directiva 67/548/CEE, Clasificación, Embalaje y Etiquetado de sustancias Peligrosas, se puede concluir:

- La muestra bajo estudio (Líquido iónico), no causa ningún tipo de inflamación en la piel, ni formación de eritema y/o edema, por lo que no es irritante cutáneo.
- Cuando la muestra es aplicada al ojo del animal causa lesiones inmediatas en el ojo, persistentes tras 24 horas, por lo que la muestra (LI) es irritante ocular.

3.3. ENSAYOS DE MUTAGENICIDAD Y CITOTOXICIDAD BACTERIANA

Los resultados de la mutagenidad y citotoxicidad bacteriana se muestran en las Figuras 5 y 6. Cada columna re-

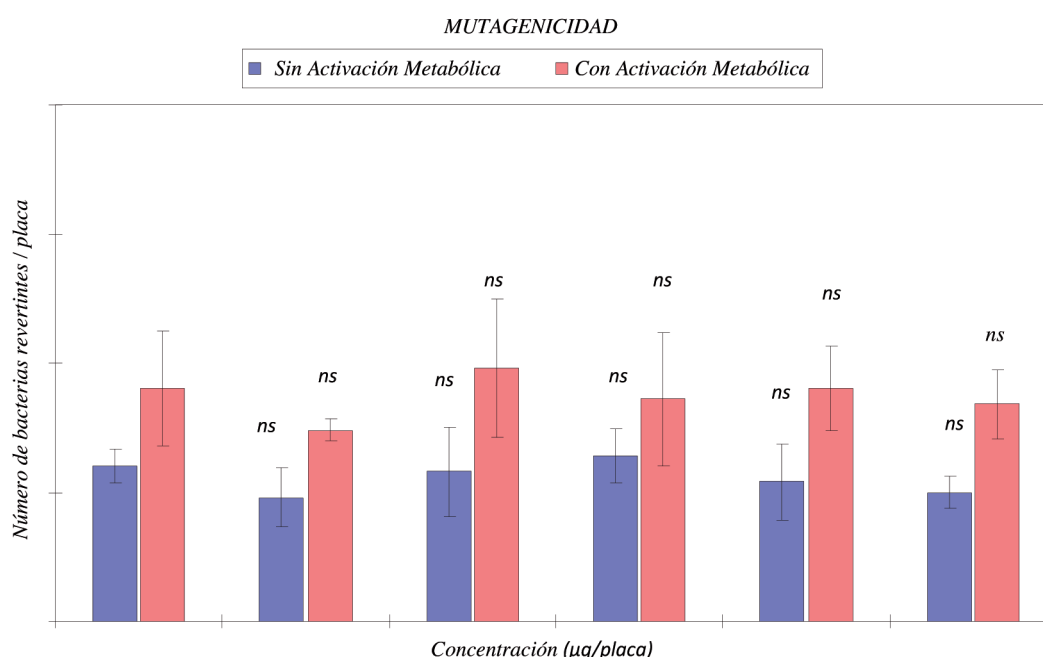


Fig. 5: Resultados del ensayo de mutagenidad bacteriana

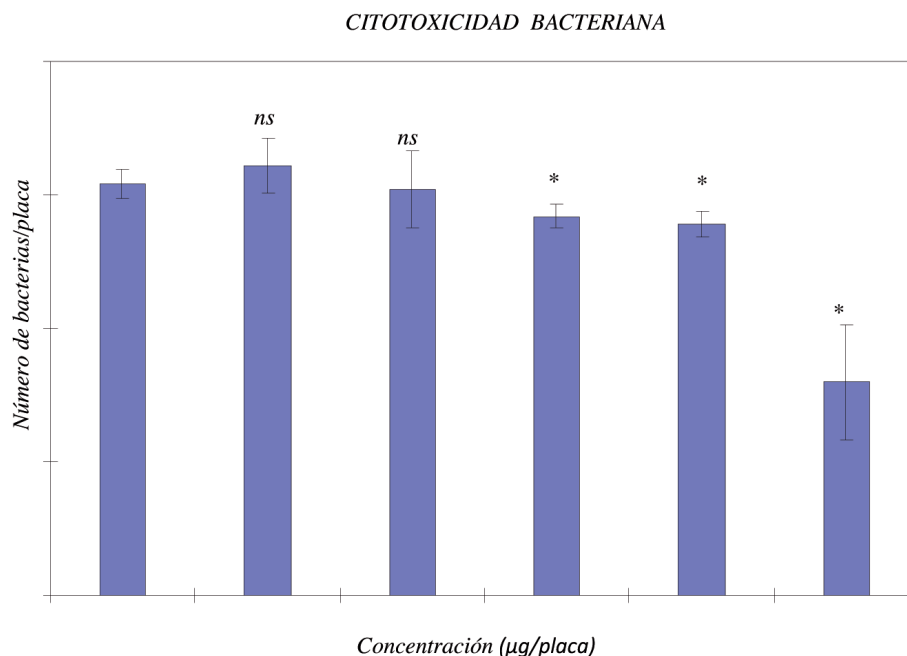


Fig.6: Resultados del ensayo de citotoxicidad bacteriana

presenta la media del crecimiento bacteriano a las distintas concentraciones de líquido iónico ensayadas. Los resultados comparativos estadísticamente con el control, se muestran en cada columna a modo de “ns”, como no significativo o “*” significativo. Consecuentemente el “ns” indica que a esa concentración de ensayo, el incremento en el número de bacterias revertientes comparadas con el control sin muestra, no son significativas, y la muestra no se considera mutagénica a esa concentración; por otro lado “*”, indica que a esa concentración un incremento en el número de bacterias revertientes con respecto al control sin muestra, son significativas, y la muestra se consideraría mutagénica a esa concentración de ensayo. De acuerdo a esto y según el Anexo VI de la Directiva 67/548/CEE, Clasificación, Embalaje y Etiquetado de sustancias Peligrosas, se puede concluir:

- Aunque la muestra (LI), bajo las condiciones de ensayo realizadas no muestra carácter mutagenico a concentraciones por debajo de 5000 µg/placa, a concentraciones por encima de 1250 µg/placa, afecta a la supervivencia bacteriana (Figura 6).
- Por lo cual sería necesario completar los ensayos de mutagenicidad (mutagenicidad celular o in vivo), para estar absolutamente seguros de los resultados obtenidos en el ensayo de mutagenicidad.

3.4. ENSAYO DE TOXICIDAD VIBRIO FISCHERI

El valor obtenido para la CE_{50} en *Vibrio fischeri*, fue de 270 mg/ml. La concentración puede ser expresada también como porcentaje o equitox: CE_{50} (equitox) = 0,027 y CE_{50} (equitox) = 3.703.

No hay límites europeos de CE_{50} en *Vibrio fischeri*, para sustancias puras. En España algunas autoridades locales establecen como valores límite, de aceptación de efluentes a un colector, aquellos comprendidos en el rango 25-50 equitox

para la CE_{50} . Según esta información, la muestra de LI ensayada podría ser considerada toxica para los organismos acuáticos.

3.5. ENSAYO DE TOXICIDAD DAPHNIA MAGNA

Los resultados obtenidos en el ensayo de *Daphnia magna* se muestran en la Tabla 3. Los valores obtenidos para CL_{50} a las 24 y 48 horas son de 150 mg/l y 90 mg/l, respectivamente.

Concentración	Inmovilización 24 h	Inmovilización 48 h
1.000 mg/l	20	20
250 mg/l	16	20
63 mg/l	2	3
31 mg/l	0	2
16 mg/l	0	1
8 mg /l	0	0
4 mg/l	0	0
2 mg /l	0	0
1 mg/l	0	0
Control	0	0

Tabla 3: Resultados de la prueba *Daphnia magna*

La clasificación toxicológica de productos químicos para organismos acuáticos (EC_{50} para *Daphnia magna*, CL_{50} para peces y IC_{50} para algas), específica para *Daphnia magna* que $EC_{50} \leq 1$ mg/ml: muy toxico; 1 a 100 mg /ml: nocivo. En este caso el resultado de la EC_{50} a 48 horas se encuentra en el rango comprendido entre 1 y 100 mg/ml.

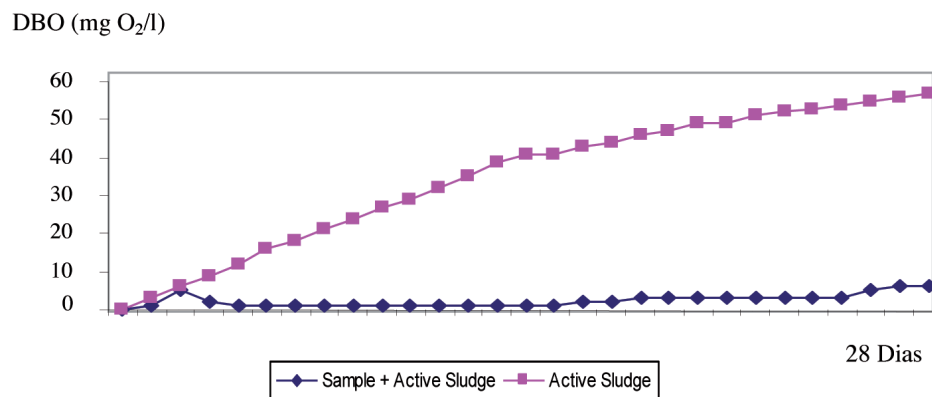


Fig.7: Resultados del ensayo de biodegradabilidad aeróbica

Por lo tanto, teniendo en cuenta el Anexo VI de la Directiva 67/548/CEE, Clasificación, Embalaje y Etiquetado de sustancias Peligrosas, y de acuerdo a la clasificación de los productos químicos para los organismos acuáticos, se puede concluir que la muestra a ensayo (LI), se clasifica como nociva para los organismos acuáticos.

3.6. ENSAYO DE BIODEGRADABILIDAD

Los resultados obtenidos en el ensayo de biodegradabilidad (Figura 7) muestran que el consumo de oxígeno de la muestra que contiene el LI (muestra + fangos activos) es menor que el consumo obtenido por los lodos activos ensayados (utilizados como control). Esto significa que el LI no muestra signos de degradación. Este comportamiento es probablemente debido a su bajo pH, el cual provoca la muerte de los microorganismos en los fangos activos. Un bajo grado de biodegradación no significa necesariamente que la sustancia no sea biodegradable en condiciones ambientales, sino la necesidad de realizar más estudios para establecer las características de biodegradabilidad del IL.

El objetivo de clasificar el nivel de peligrosidad de una sustancia para el medio ambiente es el de informar al usuario sobre los peligros las propiedades de las sustancias y preparados que se encuentran en los ecosistemas. La clasificación de las sustancias generalmente se hace sobre la base de datos experimentales de toxicidad acuática aguda. Como conclusión final, el LI bajo estudio no es fácilmente degradable y es nocivo para los organismos acuáticos, puede provocar a largo plazo efectos secundarios en el medio acuático, y debe tenerse en cuenta para evitar una posible contaminación de los medios acuáticos.

En la Tabla 4 se presenta un resumen de la totalidad de resultados obtenidos en las distintas pruebas realizadas para el líquido iónico aplicado en el proceso del cromado duro.

4. CONCLUSIONES

Los trabajos de investigación del proyecto IONMET permitieron obtener resultados exitosos en el recubrimiento de superficies con cromo metálico mediante la aplicación de un líquido iónico basado en sales de cromo trivalente. Los resultados de las pruebas experimentales llevadas a cabo en base

a las propiedades toxicológicas, a los efectos sobre la salud humana y a los efectos ambientales, se muestran en la Tabla 4 del presente informe.

Si bien no son inocuos, los compuestos de CrIII presentan un menor riesgo de toxicidad que los compuestos de CrVI. Estudios clínicos indican que los individuos expuestos durante largos períodos de tiempo a iones de cromo hexavalente pueden desarrollar necrosis tisular. Por otra parte, las investigaciones estadísticas y epidemiológicas han demostrado una correlación entre la inhalación de compuestos de cromo y el desarrollo de cáncer de pulmón. La introducción del test de Ames como método de mutagénesis bacteriana ha proporcionado una herramienta útil para detectar agentes cancerígenos causantes de mutaciones puntuales. Al ensayar compuestos de cromo hexavalente en este test, algunos investigadores han encontrado un aumento significativo de colonias revertientes para dosis que van de 10 a 200 µg [22]. Por el contrario, para el cloruro de cromo/líquido iónico cloruro de colina el efecto aparece sólo en dosis de hasta 625 a 1.250 µg, concluyendo que el CrVI es unas seis veces más mutagénico que CrIII/ChCl. Por lo tanto, el cromo en forma trivalente es considerado de bajo nivel de toxicidad.

En el test de citotoxicidad bacteriana, se obtuvieron conclusiones similares. Mientras que los datos que se presentan para los compuestos de cromo hexavalente en la literatura indican que dan lugar a una inhibición completa del crecimiento bacteriano de 400 a 800 µg/placa dosis [22], el CrIII/ChCl sólo afecta a la supervivencia bacteriana en concentraciones altas (ligera inhibición a partir de dosis de 1.250 µg/placa).

El líquido iónico estudiado no es nocivo ni tóxico de acuerdo a los ensayos de toxicidad aguda oral y dérmica. En cuanto a los ensayos de irritación aguda no es irritante dérmico pero si está clasificado como irritante ocular. El comportamiento es significativamente mejor que el del trióxido de cromo (VI), que está clasificado como tóxico de acuerdo a los ensayos de toxicidad aguda oral y dérmica, y corrosivo para los ojos, la piel y el tracto respiratorio [23].

Sin embargo, no se mostró mejora en los ensayos de biodegradabilidad. Como resultado, el líquido iónico se clasificó de acuerdo a la legislación europea como no fácilmente degradable. Por lo tanto, es necesario realizar más investigaciones acerca de la biodegradación aeróbica y anaeróbica de los LIs

analizados para saber qué tipo de microorganismos o enzimas pueden promover el proceso de degradación o biotransformación de los líquidos iónicos con CrIII/ChCl [13]. Desde el punto de vista medioambiental, el cromo (VI) revela tener una mayor toxicidad que los líquidos iónicos con cromo (III). Los compuestos de cromo (VI) son considerados muy tóxicos para los organismos acuáticos y se recomienda encarecidamente que esta sustancia no entre en el medio ambiente [23] [24]. La CE50 (48 horas) valor del ensayo de toxicidad aguda en *Daphnia magna* para el trióxido de cromo es 0,8 mg/l (48 horas) (≤ 1 mg/L) siendo clasificados como muy tóxicos [25], mientras que para CrIII/ChCl es de 90 mg/L, en el rango de 10 a 100 mg/L, siendo la sustancia clasificada como nociva para los organismos acuáticos.

Finalmente, se puede decir que los líquidos iónicos estudiados, basados en formulaciones con CrIII, muestran una menor toxicidad y un menor riesgo para el medio ambiente

que los tradicionales baños de CrVI. Es decir, ha sido posible el desarrollo de un baño electrolítico para el recubrimiento de cromo duro más respetuoso con el medio ambiente.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a la Unión Europea por la financiación de esta labor a través del proyecto IONMET (www.ionmet.org), New Ionic Liquid Solvent Technology to Transform Metal Finishing, Proyecto Integrado dentro del 6º Programa Marco de Investigación de la Unión Europea (contrato nº: IP 515743-2). Los autores agradecen al profesor Patrick Benaben (ARMINES, Saint Etienne, Francia) por facilitar la información de los procesos relacionados con el líquido iónico CrIII/cloruro de colina para el proceso de cromado duro.

Ensayo	Método	Resultados	Conclusiones
Toxicidad	Toxicidad aguda oral	DL50 >2.000 mg/kg de peso corporal	No nocivo No tóxico
	Toxicidad aguda cutánea	DL50 >2.000 mg/kg de peso corporal	No nocivo No tóxico
Irritación	Irritación aguda cutánea	Sin eritema Edema	No irritante para la piel
	Irritación aguda ocular	Lesiones en los ojos	Irritante ocular
Mutagenicidad	Mutagenicidad bacteriana	No mutagénico	No mutagénico en baja concentración. Debido a las propiedades citotóxicas, es conveniente la realización de pruebas complementarias
Citotoxicidad bacteriana	Citotoxicidad bacteriana	Citotóxico	Citotóxico. La supervivencia bacteriana se encuentra afectada a alta concentración de líquido iónico
Pruebas ecotoxicológicas	Toxicidad aguda en <i>Daphnia magna</i>	CL50= 90 mg/L (48h)	Nocivo para organismos acuáticos
	Bioluminiscencia inhibición en <i>Vibrio fischeri</i>	CE50 =270 mg/L o CE50 =3.703 equitox	Se recomienda que no entre en contacto con el medioambiente sin tratamiento previo
Biodegradabilidad	Método de respirometría manométrica	Menor consumo de oxígeno en presencia de líquidos iónicos que con el control	No fácilmente biodegradable

Tabla 4: Resumen de los resultados obtenidos

BIBLIOGRAFÍA

- [1] American Society for Metals. ASM Handbook Volume 05: Surface Engineering. 10th edition. ASM International, 1994. ISBN: 978-0-87170-384-2.
- [2] Endres Frank, Abbott A P, MacFarlane D R. "Electrodeposition from Ionic Liquids". Journal of Solid State Electrochemistry. October 2009. Vol.13, Issue10, p.1633-1634.
- [3] Endres Frank. "Ionic Liquids: Solvents for the Electrodeposition of Metals and Semiconductors". ChemPhysChem. February 2002. Vol.3, p.144-154.
- [4] Endres Frank. "Ionic Liquids: Promising Solvents for Electrochemistry". Zeitschrift für Physikalische Chemie. February 2004. Vol.218, p.255-283. (DOI: 10.1524/zpch.218.2.255.25920).
- [5] Abbott Andrew P, Capper Glen, Davies David L et al. "Ionic Liquids Based upon Metal Halide/Substituted Quaternary Ammonium Salt Mixtures". Inorganic Chemistry. May 2004. Vol.43, nº 11, p.3447-3452. (DOI: 10.1021/ic049931s).
- [6] Abbott Andrew P, Capper Glen, Davies David L et al. "Preparation of novel, moisture-stable, Lewis-acidic ionic liquids containing quaternary ammonium salts with functional side chains". Chem. Commun. September 2001. p.2010-2011. (DOI: 10.1039/B106357J).
- [7] Abbott Andrew P, Capper Glen, Davies David L et al. "Ionic Liquid Analogues Formed from Hydrated Metal Salts". Chem. Eur. June 2004. Vol.10, p.1-7. (DOI: 10.1002/chem.200400127).
- [8] Abbott Andrew P, Capper Glen, Davies David L et al. "Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures". Chem. Commun. November 2003. p.70-71. (DOI: 10.1039/B210714G).
- [9] Abbott Andrew P, Capper Glen, McKenzie Katy J et al. "Electrodeposition of zinc-tin alloys from deep eutectic solvents based on choline chloride". Journal of Electroanalytical Chemistry. January 2007. Vol.599, p.288-294. (DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2006.04.024>).
- [10] Abbott Andrew P, Capper Glen, Davies David L et al. "Electrodeposition of Chromium Black from Ionic Liquids". Transactions of the Institute of Metal Finishing. 2004. Vol.82, p.14-17.
- [11] IONMET, New Ionic Liquid Solvent Technology to Transform Metal Finishing [online]. <<http://www.ionmet.eu/21.html>> [Consulta: 06 de junio de 2014].
- [12] Abbott Andrew P, Capper Glen, Davies David L et al. "Review. Electrofinishing of metals using eutectic based ionic liquids". Transactions of the Institute of Metal Finishing. July 2008. Vol.86, nº 4, p.196-203. (DOI: <http://dx.doi.org/10.1179/174591908X327590>).
- [13] Thi Phuong Thuy Phama, Chul-Woong Choa, Yeoung-Sang Yun. "Environmental fate and toxicity of ionic liquids: A review". Water Research. January 2010. Vol.44, p.352-372. (DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2009.09.030>).
- [14] Centers for Disease Control and Prevention. International Chemical Safety Card. Choline chloride. ICSC: 0853 [online]. <<http://www.cdc.gov/niosh/ipcsneng/neng0853.html>> [Consulta: 06 de junio de 2014].
- [15] European Union. Council Directive 67/548/EEC of 27 June 1967 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances. Official Journal, 16 August 1967, 196, p.1-98.
- [16] OECD. Test nº 471: Bacterial Reverse Mutation Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD publishing.1997.
- [17] Microbics Corporation. Microtox Manual Carlsbad, California, U.S.A. Part No. 55H550-1-5.
- [18] AENOR. Calidad del agua. Determinación del efecto inhibidor de muestras de agua sobre la luminiscencia de *Vibrio fischeri* (ensayo de bacterias luminiscentes). Parte 3: Método utilizando bacterias liofilizadas. UNE-EN ISO 11348-3:2009. Madrid: AENOR 2009.
- [19] OECD. Test no 202: Daphnia sp. Acute Immobilisation Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing. 2004.
- [20] OECD. Test nº 301: Ready biodegradability. 301F: Manometric Respirometry Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD Publishing.1992.
- [21] European Union. Commission Directive 2001/59/EC of 6 August 2001 adapting to technical progress for the 28th time Council Directive 67/548/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances. Official Journal of the European Communities, 21 August 2001, L 225, p.1-333.
- [22] Petrilly Fernando L, De Flora Silvio. "Toxicity and Mutagenicity of Hexavalent Chromium on *Salmonella typhimurium*". Applied and Environmental Microbiology. April 1977. Vol. 33, nº4, p.805-809.
- [23] Centers for Disease Control and Prevention. International Chemical Safety Cards. Chromium (VI) oxide. ICSC: 1194 [online]. <<http://www.cdc.gov/niosh/ipcsneng/neng1194.html>> [Consulta: 06 de junio de 2014].
- [24] Centers for Disease Control and Prevention. International Chemical Safety Cards. Potassium dichromate. ICSC: 1371 [online]. <<http://www.cdc.gov/niosh/ipcsneng/neng1371.html>> [Consulta: 06 de junio de 2014].
- [25] Sigma-Aldrich. Material Safety Data Sheet. Chromium (VI) oxide [online]. <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/675644?lang=es®ion=ES>> [Consulta: 06 de junio de 2014].