



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Desarrollo de una nueva metodología analítica basada en la absorción molecular con fuente continua de alta resolución para la determinación de flúor en muestras acuosas

Development of a new analytical methodology based on molecular absorption with a high resolution continuous source for the determination of fluorine in aqueous samples

Autor/es

Carmen Labarta Pueyo

Director/es

Martín Resano Ezcaray

Facultad de Veterinaria
2021

ÍNDICE

1. RESUMEN	4
2. ABSTRACT	4
3. INTRODUCCIÓN	5
3.1. EL AGUA.....	5
3.2 EL FLÚOR	6
3.3. EL FLÚOR EN EL AGUA.....	8
3.4. DETERMINACIÓN DEL FLÚOR EN EL AGUA	9
3.4.1. Espectroscopía de absorción molecular con fuente continua de alta resolución	10
4. OBJETIVOS	12
5. METODOLOGÍA.....	12
5.1. INSTRUMENTACIÓN	12
5.2. REACTIVOS Y MUESTRAS.....	12
5.3. PROCEDIMIENTO ANALÍTICO	14
5.3.1. Selección del contraión para formar la molécula con el flúor	14
5.3.2. Optimización de las temperaturas de pirólisis y de vaporización.....	15
5.3.3. Optimización de la concentración de calcio (contraión).....	16
5.3.4. Calibrado	16
5.3.5. Validación del método	17
5.3.6. Aplicación del método a muestras reales	17
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
6.1. Selección del contraión para formar la molécula con el flúor	17
6.2. Optimización de las temperaturas de pirólisis y de vaporización.....	18
6.3. Optimización de la concentración de calcio (contraión).....	19
6.4. Calibrado	20
6.5. Validación del método	21
6.6. Aplicación del método a muestras.....	22
7. CONCLUSIONES	24

8. CONCLUSIONES	24
9. VALORACIÓN PERSONAL.....	24
10. BIBLIOGRAFÍA.....	25
11. ANEXOS	29
Anexo I. Optimización de temperatura.....	29
Anexo II. Optimización de la concentración de Ca.....	29
Anexo III. Calibrado	30

1. RESUMEN

El agua es un recurso vital para los seres humanos, imprescindible para su supervivencia, lo que hace que sea importante que todas las personas tengan acceso a un agua potable apta para el consumo humano que cumpla con los criterios sanitarios que garanticen la calidad del agua y la seguridad de los consumidores.

Entre las sustancias que aporta el agua se encuentra el flúor, elemento fundamental para el desarrollo y mantenimiento de los huesos y los dientes y para la prevención de la caries, pero que llega a ser tóxico a dosis de ingesta elevadas. Por ello, es importante garantizar la existencia de un método de análisis para la determinación de flúor en aguas que sea eficaz y proporcione resultados precisos.

Esta es la razón por la que, con este trabajo, se pretende desarrollar una nueva metodología analítica basada en la absorción molecular con fuente continua de alta resolución para la determinación de fluoruro en agua, haciendo uso de un horno de grafito (HR-CS GF MAS), para lo que se va a utilizar el instrumento HR-CS AAS ContrAA® 800G (Analytik Jena). Para alcanzar este objetivo se va a seleccionar un contraión adecuado para formar una molécula de flúor en fase gas que absorba radiación en el visible, y se van a optimizar las variables instrumentales para maximizar la sensibilidad.

Finalmente, se va a realizar una validación del método a través de varias medidas de un material de referencia certificado para comprobar que es posible desarrollar un método de estas características que proporciona resultados exactos y precisos de la concentración de flúor en las muestras de agua.

2. ABSTRACT

Water is a vital resource for humans, essential for their survival, which makes it important that all people have access to drinking suitable water for human consumption that fulfills the sanitary criteria that guarantee water quality and consumers safety.

One of the minerals that water provides is fluoride, an essential element for the development and maintenance of bones and teeth and for the prevention of tooth disease, but which

becomes toxic at high ingest doses. Therefore, it's important to have an analysis method for the determination of fluorine in water that is efficient and provides accurate results.

For this reason, with this work, it's intended to develop a new analytical methodology based on molecular absorption with a high resolution continuous source (HR-CS MAS) for the determination of fluoride in water, using a furnace of graphite (HR-CS GF MAS), for which the instrument HR-CS AAS contrAA® 800G (Analytik Jena) will be used. To achieve this goal, a counter ion will be selected to form a measurable fluorine molecule in said instrument, and the instrumental variables will be optimized to maximize sensitivity.

Finally, a validation of the method will be carried out through several measurements of a certified reference material to verify that it's possible to develop a method of these characteristics that provides accurate results of the concentration of fluorine in the water samples.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. EL AGUA

El agua es un recurso vital para los seres vivos, que constituye aproximadamente el 70% del cuerpo humano, estando presente en todos sus tejidos y órganos vitales y siendo esencial para llevar a cabo los procesos biológicos necesarios para el desarrollo, crecimiento y reproducción de las personas. En definitiva, el ser humano necesita beber agua para su propia supervivencia, ya que le mantiene hidratado, y es un elemento esencial en procesos muy importantes como la digestión, absorción y eliminación de deshechos, o en la regulación de la temperatura corporal.

Por ello, las personas deben beber agua en cantidades suficientes para mantener un buen estado de salud. Tanto es así que el 28 de julio de 2010 la Asamblea General de las Naciones Unidas reconoció el derecho humano al agua y al saneamiento a través de la Resolución 64/292.

Es importante abastecer a toda la población con agua potable teniendo en cuenta los criterios sanitarios vigentes según la legislación, y garantizando un agua de consumo humano salubre y limpia. Según el *Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano*, un agua de consumo humano será salubre y limpia cuando no contenga ningún tipo de microorganismo, parásito o sustancia, en una cantidad o concentración que pueda suponer un riesgo para la salud humana, y cumpla con los

valores paramétricos especificados en el Anexo I del mismo, siendo así un agua apta para el consumo.

Además, a través del agua, ingerimos una serie de sustancias entre las que se encuentra el flúor (F), un elemento que cobra importancia en el desarrollo y mantenimiento de los huesos y los dientes y en la prevención de la caries. Las personas están expuestas al flúor a través de la alimentación, con el consumo de alimentos como el marisco o el té, y a través del uso de dentífricos o sartenes de teflón, pero la principal vía de ingesta de flúor es el agua de consumo humano, en forma de fluoruros.

3.2 EL FLÚOR

El flúor es un elemento químico no metálico situado en la posición 9 de la tabla periódica y perteneciente al grupo de los halógenos, cuyo símbolo es F. Es el elemento más electronegativo y es muy reactivo. Se combina con metales dando lugar a fluoruros, forma iónica del flúor, a los que el ser humano está expuesto por medio del consumo de los alimentos y del agua.

El flúor se incorpora al organismo principalmente por la vía digestiva, ya que el 90% del flúor ingerido se absorbe en el estómago (Valdez et al., 2011), pasa a la sangre y se distribuye por difusión simple a órganos y tejidos, principalmente al óseo y al dental. La absorción de F a través del estómago está regulada por el pH ácido, debido a que a partir del F (presente como fluoruro) se produce ácido fluorhídrico que atraviesa las barreras fisiológicas. Por otro lado, se expulsa mediante las heces, la respiración y, principalmente, por la orina.

A pesar de tener algunas funciones esenciales a niveles bajos como la prevención de la caries, el flúor es un elemento potencialmente tóxico, aunque es no clasificable como cancerígeno para los seres humanos ya que pertenece al grupo 3 según la IARC (Agencia Internacional de Investigación del Cáncer). Tiene un rango estrecho entre las dosis que aportan beneficios y las que, por el contrario, son perjudiciales para la salud de los seres humanos que lo ingieren a través de la alimentación. Los efectos que produce este elemento están relacionados con los cambios en la mineralización de los dientes y los huesos, y los efectos adversos aumentan proporcionalmente con la cantidad de flúor ingerida, produciendo efectos mayores a mayor cantidad de fluoruro.

Así pues, la ingesta de flúor en las cantidades adecuadas durante el desarrollo de los dientes es muy beneficiosa en cuanto a la prevención de caries y a la fortaleza de los dientes, pero ingerir flúor en cantidades elevadas conlleva un “efecto rebote”, produciendo fluorosis dental, que consiste en una hipomineralización de las capas superficiales del esmalte de los dientes. Esta

enfermedad provoca manchas en los mismos y los hace más frágiles, pudiendo llegar a resquebrajarse en los casos más graves.

El flúor también juega un papel importante en el desarrollo y mantenimiento de los huesos a bajas dosis, pero, al igual que en el caso anterior, a dosis más elevadas puede producir fluorosis esquelética, enfermedad que hace que los huesos se debiliten volviéndose más frágiles y quebradizos y limitando la movilidad de las articulaciones. En los casos de mayor gravedad, puede derivar en una fluorosis esquelética paralizante, haciendo que la columna quede totalmente rígida.

Además, el flúor se acumula en el tejido cerebral antes del nacimiento, por lo que puede afectar al sistema nervioso durante la gestación produciendo cambios bioquímicos y funcionales que disminuyen el coeficiente intelectual de los niños influyendo en el aprendizaje y la memoria de éstos. Así pues, existen investigaciones que dicen que “existe una asociación entre el consumo de niveles altos de F y una disminución en la inteligencia en niños” (Valdez et al., 2011). Esto se debe a que el flúor puede atravesar la placenta desde la sangre de la madre hasta el feto en desarrollo y a que, además, una pequeña proporción del flúor que ingieren las mujeres se transfiere al bebé mediante la lactancia materna, aunque es prácticamente insignificante.

La toxicidad del F se presenta a largo plazo tras exposiciones crónicas y prolongadas a concentraciones elevadas y los efectos pueden tardar varios años en manifestarse. Además, éstos dependen del tiempo y la dosis a la que ha estado expuesta una persona y de su edad, que es el factor limitante en la capacidad de captación de fluoruros tanto en huesos como dientes, disminuyendo la misma con la edad hasta que se estabiliza. Por ello, en bebés recién nacidos casi el 90% del flúor absorbido se deposita en los huesos; en niños, tras completarse la fase de desarrollo, se fija el 50% del flúor y el resto se excreta por el riñón; y en adultos, tan sólo un 10% se fija en los huesos.

Según la Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades (2003, p. 22):

Generalmente se afirma que una dosis de 10 a 20 mg / día (equivalente a 5 a 10 ppm en el agua, para una persona que ingiera 2 L / día) durante al menos 10 años es necesaria para el desarrollo de la discapacidad fluorosis esquelética paralizante, pero la variación individual, la variación en el estado nutricional y la dificultad de determinar los niveles de fluoruros en el agua en tales situaciones hacen que sea difícil determinar la dosis crítica.

3.3. EL FLÚOR EN EL AGUA

Como se ha mencionado anteriormente, el agua es la principal vía de ingesta de flúor de los seres humanos, siendo un factor esencial en la prevención de la caries dental. El contenido de flúor en el agua depende de la zona geográfica, por lo que no toda la población está expuesta en la misma medida a este elemento, y existen concentraciones mayores de fluoruros en las aguas de recursos hídricos de zonas montañosas, las aguas subterráneas, las aguas minerales naturales o las aguas de manantial.

Para la prevención de la caries dental, el Servicio de Salud Pública (PHS) recomienda “que los suministros públicos de agua contengan fluoruro en concentraciones entre 0,7 y 1,2 mg/L” (Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades, 2003, p. 13). Además, la Academia Americana de Odontología Pediátrica (AAPD) también propone que la concentración de flúor en el agua potable de consumo sea aproximada a 0,7 ppm con la misma finalidad. En el caso de que los niños ingieran agua con concentraciones menores a éstas, sería conveniente la toma de suplementos de flúor o el uso de dentífricos con dicho elemento.

Según el Anexo I del *Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano*, el valor paramétrico para el fluoruro es de 1,5 mg/L para que un agua sea “apta para el consumo”. Además, según el *Real Decreto 314/2016*, las aguas minerales naturales que contengan más de 1 mg/L de flúor estarán autorizadas para llevar en su etiqueta la mención de agua “fluorada, o que contiene flúor”.

Por otro lado, como hemos mencionado anteriormente, las aguas minerales naturales y las aguas de manantial tienen unas concentraciones de fluoruros mayores. Según el *Real Decreto 1798/2010, de 30 de diciembre, por el que se regula la explotación y comercialización de aguas minerales naturales y aguas de manantial envasadas para consumo humano*, las aguas minerales naturales tienen un valor paramétrico de fluoruro de 5 mg/L y las aguas de manantial de 1,5 mg/L. Según este mismo Real Decreto, es obligatorio que aparezca la información en el etiquetado, al lado de la denominación de venta y con caracteres visibles, cuando un agua mineral natural tenga una concentración de flúor superior a 1,5 mg/L, puesto que deberá indicar “contiene más de 1,5 mg/L de flúor: no adecuada para el consumo regular de los lactantes y niños menores de siete años”. Además, en este caso, deberán señalar el contenido final de flúor en la composición analítica de sus componentes, al contrario que cuando el contenido de F es menor que 1,5 mg/L, que no es obligatorio indicarlo en su etiquetado según la normativa española.

Según el mismo Real Decreto, y debido a las altas concentraciones de F, una de las manipulaciones que están permitidas en las aguas minerales naturales y en las aguas de manantial es la eliminación de fluoruros mediante alúmina activada.

Por otro lado, la fluoración del agua potable de consumo humano fue introducida en el siglo pasado como una medida preventiva, efectiva, segura y barata contra la caries (Gallego et al., 2019, p. 2).

Según la RAE, la definición de fluorar es “añadir pequeñas cantidades de fluoruros al agua potable o a productos dentífricos como protección contra la caries dental”. Así pues, la fluoración del agua consiste en la adición de fluoruros al suministro de agua hasta una concentración de alrededor de 0,7 ppm, que es la concentración que proporciona protección para prevenir la caries y la fluorosis dental según la AAPD.

Ésta es una medida de gran interés desde el punto de vista sanitario que permite beneficiar a toda la población, aunque siempre ha existido polémica por los efectos adversos que el flúor en grandes concentraciones puede provocar como hemos mencionado en el punto 3.2. A pesar de ello, y puesto que la fluoración del agua está controlada y las cantidades que se añaden son bajas, el peligro que las aguas fluoradas presentan para la población es escaso. Así, las aguas fluoradas son reconocidas como un procedimiento eficaz y seguro para la prevención de la caries dentaria por la OMS y por la FDI (Federación Dental Internacional) (Benito y Nogueras, 1995).

Las sustancias utilizadas para realizar la fluoración del agua suelen ser el ácido hexafluorosilícico, el fluoruro de sodio y el hexafluorosilicato de sodio.

3.4. DETERMINACIÓN DEL FLÚOR EN EL AGUA

La importancia del flúor en algunos aspectos de la salud humana ha hecho que se hayan desarrollado diferentes métodos de análisis para la determinación del ión fluoruro en el agua, siendo los más usados el potenciómetro o el colorímetro, pero todavía hay muchos aspectos mejorables en estas técnicas para obtener resultados mucho más exactos en concentraciones bajas. Por este motivo, es importante desarrollar nuevos métodos de análisis en el ámbito de la química analítica que permitan una determinación de flúor con una exactitud mayor. Una alternativa para ello es la espectroscopía de absorción molecular con fuente continua de alta resolución haciendo uso del horno de grafito (HR-CS GF MAS), que es a la que este trabajo respecta.

3.4.1. Espectroscopía de absorción molecular con fuente continua de alta resolución

Este método electrotérmico convierte los elementos de una muestra en átomos o iones en estado gaseoso mediante vaporización. La determinación de no metales como, en este caso, el flúor, se realiza por el método de absorción molecular ya que presentan dificultad para su atomización y las líneas atómicas presentan mayor sensibilidad en el UV-lejano, no accesible. Para ello, es necesario formar una molécula que pueda determinarse con el instrumento de absorción molecular con fuente continua de alta resolución.

El instrumento HR-CS AAS ContrAA® 800G (Analytik Jena) es apto para desarrollar un nuevo método analítico mediante esta técnica, y consta de los siguientes elementos:

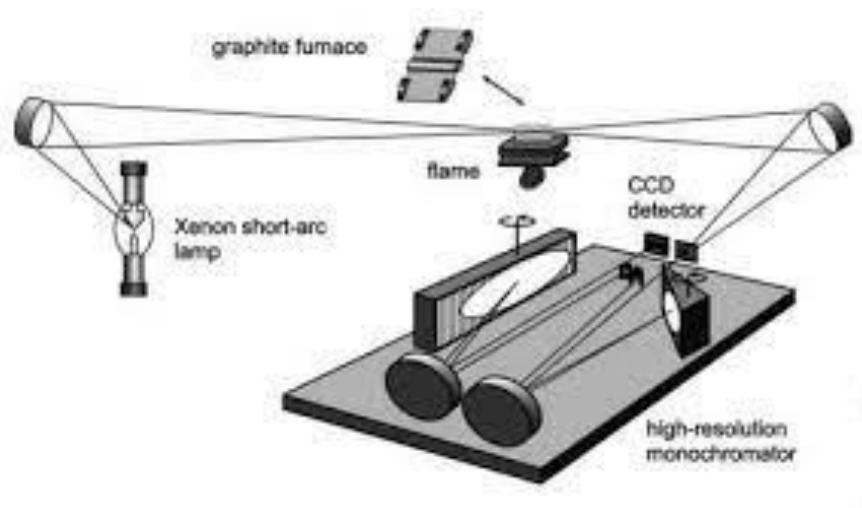


Figura 1. Esquema de un instrumento de HR-CS AAS. (Bernard Welz, 2004, p. 70). Reproducido con permiso de Springer Nature.

- Una lámpara de fuente continua de arco corto de xenón de alta presión que puede trabajar a altas temperaturas, de hasta 10000 °C, proporcionando emisiones de alta intensidad que permiten realizar medidas a cualquier longitud de onda, tanto en el visible como en el UV-lejano. La alta intensidad de emisión permite alcanzar límites de detección significativamente menores.
- Un sistema óptico basado en un monocromador de escalera doble, que contiene dos elementos dispuestos en serie que dispersan la radiación: en primer lugar un prisma y, posteriormente, una red Echelle (en escalera).
- Un detector CCD (dispositivo de acoplamiento de carga) que permite el análisis simultáneo a varias longitudes de onda. Este detector consta de 588 píxeles, de los cuales 200 están monitorizados simultáneamente para realizar las medidas en diferentes longitudes de onda,

y el resto de los píxeles corrigen las posibles interferencias espectrales y las posibles fluctuaciones que se puedan provocar provenientes de la lámpara.

- Un atomizador electrotérmico, que es un horno de grafito con plataforma (con un orificio central para la inyección de la muestra mediante el muestreador automático), formado por un tubo cilíndrico de grafito abierto por los extremos y ajustado a dos contactos eléctricos que están dentro de una cajetilla metálica refrigerada por agua.

Por el exterior del tubo pasa una corriente de gas inerte, argón, para evitar la entrada de aire, y por el interior del tubo, pasa otra corriente del mismo gas para eliminar el aire y los vapores generados a partir de la matriz de la muestra.

El proceso de medición de absorbancia por este método sigue las siguientes fases:

1. Secado: eliminación del disolvente de la muestra por evaporación a una temperatura inferior al punto de ebullición del disolvente. El equipo lleva incorporada una cámara que permite visualizar si esta etapa se produce de manera correcta. Se hace pasar la corriente de argón para purgar los compuestos volatilizados.

2. Pirólisis: que permite dejar al analito en la forma adecuada para su posterior volatilización en la etapa de vaporización por incremento de la temperatura. Se pretende remover la materia orgánica, si la hubiera, de la muestra sin perder analito. Además, se trata la matriz para eliminar posibles interferencias y, como en la etapa anterior, se pasa una corriente de argón para eliminar los compuestos volatilizados, que son los componentes de la matriz. La temperatura a la que se realiza esta etapa es necesario optimizarla previamente.

La temperatura de pirólisis suele estar en el rango de 350 a 1600 °C (Mañay, Clavijo y Diaz, 2009).

3. Adaptación del gas: para asegurar la completa purga del gas antes de que comience la etapa de vaporización.

4. Vaporización: volatilización del analito y medida de su absorbancia. La temperatura a la que se realiza esta etapa es necesaria optimizarla previamente ya que depende de la volatilidad del elemento a medir. El instrumento mide la absorbancia en tres dimensiones: absorción, longitud de onda y tiempo. Se toma la absorbancia integrada a la longitud de interés como señal analítica.

5. Limpieza: para eliminar los restos de matriz y analito que hayan podido quedar en el horno a una temperatura superior a la de vaporización.

4. OBJETIVOS

Debido a todo lo mencionado anteriormente y a la importancia de proteger la salud de los consumidores aportando los beneficios derivados del flúor y, a la vez, evitando los efectos adversos que éste provoca a grandes concentraciones, es importante que el agua de consumo humano esté controlada y cumpla con las recomendaciones y la legislación vigente.

El objetivo principal de este trabajo es el estudio de la posibilidad de desarrollar un nuevo método de análisis para la determinación de la concentración de flúor presente en muestras de agua de consumo humano utilizando un instrumento de absorción molecular con fuente continua de alta resolución como es el horno de grafito (HR-CS GF MAS).

Para conseguir este objetivo principal, deben lograrse previamente los objetivos parciales que se enumeran a continuación:

- 1) La selección de un contraión para formar una molécula con el flúor en el horno de grafito que sea estable en fase gas y proporcione buena sensibilidad.
- 2) La optimización de las temperaturas de pirólisis y de vaporización con lo que se pretende maximizar la señal obtenida y minimizar posibles interferencias.
- 3) La validación de los resultados obtenidos con un material de referencia certificado.
- 4) La aplicación del método a las muestras de agua de consumo humano.

5. METODOLOGÍA

5.1. INSTRUMENTACIÓN

Para la realización de este trabajo, mediante la técnica de espectroscopía de absorción molecular con fuente continua de alta resolución (HR-CS MAS), se utilizó el instrumento HR-CS AAS ContrAA® 800G (Analytik Jena) que incorpora un muestreador automático para llevar las disoluciones al horno de grafito, en este caso destinado para realizar análisis de líquidos.

Además, para preparar las disoluciones se utilizaron micropipetas de 20-200 µL y de 100-1000 µL (Capp), y tubos graduados de 10 y de 50 mL (VWR).

5.2. REACTIVOS Y MUESTRAS

Para obtener las **disoluciones de flúor** se partió de una disolución de referencia de flúor de 1000 mg/L utilizando como disolvente agua purificada, obtenida con un sistema Milli-Q (Millipore).

Todas las disoluciones de flúor se prepararon en tubos graduados hasta un volumen de 10 mL, inyectando con una micropipeta los volúmenes necesarios, tal y como se detalla en la *Tabla 1*.

Disolución F	Concentración de F	Preparación
1	10 mg/L	Dilución de 0,1 mL de la disolución de referencia de F (1000 mg/L) hasta 10 mL con agua Milli-Q.
2	0,05 mg/L	Dilución de 0,05 mL de la primera disolución de F (10 mg/L) hasta 10 mL con agua Milli-Q.
3	0,1 mg/L	Dilución de 0,1 mL de la primera disolución de F (10 mg/L) hasta 10 mL con agua Milli-Q.
4	0,25 mg/L	Dilución de 0,25 mL de la primera disolución de F (10 mg/L) hasta 10 mL con agua Milli-Q.
5	0,5 mg/L	Dilución de 0,5 mL de la primera disolución de F (10 mg/L) hasta 10 mL con agua Milli-Q.
6	1 mg/L	Dilución de 1 mL de la primera disolución de F (10 mg/L) hasta 10 mL con agua Milli-Q.
7	2 mg/L	Dilución de 0,02 mL de la disolución de referencia de F (1000 mg/L) hasta 10 mL con agua Milli-Q.
8	5 mg/L	Dilución de 0,05 mL de la disolución de referencia de F (1000 mg/L) hasta 10 mL con agua Milli-Q.

Tabla 1. Disoluciones de flúor.

Para obtener las **disoluciones de calcio**, en primer lugar se preparó la disolución de calcio al 3%, pesando 3,75 g de carbonato cálcico (CaCO_3) y disolviéndolos en ácido nítrico (HNO_3) concentrado hasta 50 mL en un tubo graduado, ya que el CaCO_3 es insoluble en agua.

A partir de ésta, se prepararon el resto de las disoluciones de calcio en tubos graduados utilizando como disolvente agua purificada, obtenida de un sistema Milli-Q (Millipore). Tal y como se detalla en la *Tabla 2*, se llevaron hasta un volumen de 1 mL con ayuda de una micropipeta.

Disolución Ca	Concentración de Ca	Preparación
1	3% (30 g/L)	Dilución de 3,75 g de CaCO_3 hasta 50 mL con una disolución de HNO_3 .

2	0,075 g/L	Dilución de 0,25 mL de la disolución de Ca (0,3 g/L) hasta 1 mL con agua Milli-Q.
3	0,15 g/L	Dilución de 0,5 mL de la disolución de Ca (0,3 g/L) hasta 1 mL con agua Milli-Q.
4	0,3 g/L	Dilución de 0,1 mL de la disolución de Ca (3 g/L) hasta 1 mL con agua Milli-Q.
5	0,75 g/L	Dilución de 0,25 mL de la disolución de Ca (3 g/L) hasta 1 mL con agua Milli-Q.
6	1,5 g/L	Dilución de 0,5 mL de la disolución de Ca (3 g/L) hasta 1 mL con agua Milli-Q.
7	3 g/L	Dilución de 0,1 mL de la disolución de Ca (30 g/L) hasta 1 mL con agua Milli-Q.
8	7,5 g/L	Dilución de 0,25 mL de la disolución de Ca (30 g/L) hasta 1 mL con agua Milli-Q.
9	15 g/L	Dilución de 0,5 mL de la disolución de Ca (30 g/L) hasta 1 mL con agua Milli-Q.

Tabla 2. Disoluciones de calcio.

Para conocer los volúmenes a pipetear, tanto de flúor como de calcio, se utilizó la siguiente fórmula: $C_i \times V_i = C_f \times V_f$, donde C_i es la concentración inicial; V_i es el volumen final; C_f es la concentración final; y V_f es el volumen final.

Para la validación del método se utilizó un **material de referencia certificado** de volumen total de aniones (SIGMA – ALDRICH).

Una parte de las **muestras** de agua potable de consumo humano se compraron en el supermercado y, el resto de muestras fueron tomadas del mismo grifo de la ciudad de Zaragoza durante varios días para comprobar si había fluctuaciones entre los valores de concentración de flúor, y también se tomaron muestras de agua de Huesca y Almudévar.

Las muestras compradas en el supermercado fueron de las marcas FontVella, Nestlé Aquarel, Solán de Cabras, Cabreiroá y Evian.

5.3. PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

5.3.1. Selección del contraíón para formar la molécula con el flúor

Para poder realizar la determinación de no metales, como es el caso del flúor, mediante la espectroscopía de absorción molecular con fuente continua de alta resolución, es necesario

inducir una reacción del mismo con otro elemento para formar una molécula en fase gas medible con el instrumento HR-CS AAS.

Para seleccionar el mejor contraión para la formación de la molécula de flúor se buscó información aportada por la bibliografía.

5.3.2. Optimización de las temperaturas de pirólisis y de vaporización

5.3.2.1. Para que la pirólisis, etapa que permite dejar al analito en la forma adecuada para su posterior volatilización en la etapa de vaporización por incremento de la temperatura, se lleve a cabo de manera correcta, se debe optimizar previamente su temperatura.

Para ello, en primer lugar, se dejaron fijos todos los parámetros (con una temperatura de vaporización de 2400 °C) excepto el de temperatura de pirólisis, que se fue modificando de manera ascendente partiendo de una temperatura de 600 °C hasta los 1400 °C en intervalos de 200 °C. Una vez se obtuvieron las absorbancias correspondientes a los programas con dichas temperaturas, se midió con otras temperaturas cercanas a las que proporcionaban mayor señal, en intervalos de 100 °C.

Así se obtuvieron los valores de absorbancia medidos a las diferentes temperaturas utilizadas en la optimización de la temperatura de pirólisis (*Tabla A1.1. del Anexo I*) que posteriormente se representaron gráficamente frente a la temperatura (*Figura 2*), y a partir de dicha gráfica se seleccionó la temperatura óptima de pirólisis, como se demuestra en el apartado 6.2.1 de resultados.

5.3.2.2. De la misma manera, se procedió a optimizar la temperatura de vaporización, etapa en la que se volatiliza el analito y se mide de su absorbancia. Así pues, se dejaron fijos todos los parámetros manteniendo esta vez la temperatura de pirólisis ya optimizada. La temperatura de vaporización se fue modificando de forma ascendente en intervalos de 200 °C, partiendo de una temperatura de 1800 °C hasta una de 2600 °C. Una vez se determinó qué temperaturas proporcionaban una señal mayor, se midió con unas nuevas temperaturas en intervalos de 100 °C de forma ascendente en el rango cercano a las mismas.

Así se obtuvieron los valores de absorbancia medidos a las diferentes temperaturas utilizadas en la optimización de la temperatura de vaporización (*Tabla A1.2. del Anexo I*) que posteriormente se representaron gráficamente frente a la temperatura (*Figura 2*), y a partir de dicha gráfica se seleccionó la temperatura óptima de vaporización, como se demuestra en el apartado 6.2.2 de resultados.

En la realización de las optimizaciones descritas en los apartados 5.3.2.1. y 5.3.2.2., se utilizaron la dilución 8 de la *Tabla 1* (F 5 mg/L), la dilución 7 de la *Tabla 2* (Ca 3%) y agua Mili-Q como blanco. Aproximadamente 1 mL de estas disoluciones se inyectaron con una micropipeta en los pocillos de plástico que posteriormente se introdujeron en los huecos enumerados con la posición para que después el muestreador automático pipetara 20 µL de disolución de F y 5 µL de disolución de Ca.

Como se ha mencionado en los apartados anteriores, los resultados de absorbancia obtenidos en ambas optimizaciones se representaron en una gráfica conjunta frente a la temperatura, como se muestra en la *Figura 2* del apartado 6.2. de resultados.

5.3.3. Optimización de la concentración de calcio (contraión)

Una vez optimizadas las temperaturas de pirólisis y de vaporización, se llevó a cabo la optimización de la concentración del contraión seleccionado en el apartado 6.1. de resultados, el calcio. Para que la totalidad del flúor presente en la muestra reaccione con el calcio para formar la molécula de CaF en fase gas, es necesario que haya un exceso de calcio para que no quede flúor sin reaccionar y que, por tanto, no se mida.

Para la optimización de la concentración de calcio se utilizaron las disoluciones que se muestran en la *Tabla 2* del apartado de reactivos y muestras, siendo la menor concentración empleada de 0,075 g/L y la mayor de 30 g/L, y la disolución de F de 5 mg/L.

Aproximadamente 1 mL de estas disoluciones se inyectaron con una micropipeta en los pocillos de plástico que posteriormente se introdujeron en el equipo para que el muestreador automático pipetara 20 µL de disolución de F y 5 µL de las diferentes disoluciones de Ca.

Los resultados obtenidos de las medidas de absorbancia con las diferentes concentraciones de calcio se recogen en la *Tabla A2.1. del Anexo II*, y se representaron en una gráfica de absorbancia frente a concentración de calcio como se muestra en la *Figura 3* del apartado 6.3 de resultados.

5.3.4. Calibrado

Con el objetivo de conseguir resultados exactos, se llevó a cabo un calibrado haciendo uso de las diluciones 3, 5 y 7 de la *Tabla 1* de reactivos y muestras (0,1 mg/L ; 0,5 mg/L y 2 mg/L de F), agua Milli-Q como blanco, y la disolución 7 de la *Tabla 2* (3% de Ca).

Aproximadamente 1 mL de estas disoluciones se inyectaron con una micropipeta en los pocillos de plástico que posteriormente se introdujeron en el equipo para que después el muestreador automático pipetara 20 µL de las diferentes disoluciones de F y 5 µL de la disolución de Ca.

Los resultados de absorbancia de CaF obtenidos en fase gas (*Tabla A3.1 del Anexo III*) se representaron gráficamente frente a las concentraciones conocidas de F de las disoluciones preparadas, como se muestra en la *Figura 5* del apartado 6.4. de resultados. Así, se obtuvo la recta de calibrado que permitió determinar posteriormente con exactitud las concentraciones de fluoruro de las muestras despejando la absorbancia obtenida en la ecuación de la recta.

Además, se midió 10 veces la absorbancia del blanco (agua Milli-Q) para posteriormente calcular los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOC) y poder interpretar los datos de forma correcta.

5.3.5. Validación del método

Una vez se construyó la recta de calibrado, se llevó a cabo la validación del método realizando 9 medidas de absorbancia del material de referencia certificado de volumen total de aniones (SIGMA – ALDRICH) con una concentración de F conocida.

Aproximadamente 1 mL de este material de referencia certificado se inyectó con una micropipeta en un pocillo de plástico que posteriormente se introdujo en el equipo para que el muestreador automático pipetara 20 µL de dicho material de referencia de F y 5 µL de la disolución de Ca.

5.3.6. Aplicación del método a muestras reales

Una vez validado el método espectroscópico de absorción molecular con fuente continua de alta resolución para la determinación de flúor en agua, se aplicó el método a muestras de agua potable de consumo humano que se detallan en el apartado 5.2.

Para llevar a cabo las medidas de estas muestras, se inyectaron aproximadamente 1 mL de cada una de estas muestras con una micropipeta en los pocillos de plástico que posteriormente se introdujeron en el equipo para que el muestreador automático pipetara 20 µL de cada muestra y 5 µL de disolución de Ca de 3%.

Así, se obtuvieron los resultados de las concentraciones de F como se detalla en la *Tabla 4* y la *Tabla 5* del apartado 6.6.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Selección del contraión para formar la molécula con el flúor

Según los datos aportados por la bibliografía, y la experiencia de trabajo previa del grupo, se seleccionó calcio (Ca^{2+}) como contraión para formar la molécula con el flúor (F^-). Así, se puede

obtener una molécula de CaF suficientemente estable en fase gas y que proporciona una sensibilidad *a priori* adecuada en el instrumento de absorción molecular con fuente continua de alta resolución (HR-CS AAS) con horno de grafito (HR-CS GF MAS).

6.2. Optimización de las temperaturas de pirólisis y de vaporización

6.2.1. Los datos de absorbancia obtenidos a las diferentes temperaturas utilizadas en la optimización de la temperatura de pirólisis (apartado 5.3.2.1.) se pueden observar, junto con los valores de la desviación estándar (SD), en la *Tabla A1.1. del Anexo I*.

6.2.2. Los datos de absorbancia obtenidos a las diferentes temperaturas utilizadas en la optimización de la temperatura de vaporización (apartado 5.3.2.2.) se pueden observar, junto con los valores de desviación estándar (SD), en la *Tabla A1.2. del Anexo I*.

Los resultados de absorbancia obtenidos en ambas optimizaciones se representaron en una gráfica conjunta frente a la temperatura, como se muestra en la siguiente *Figura 2*, con las barras de error de la desviación estándar:

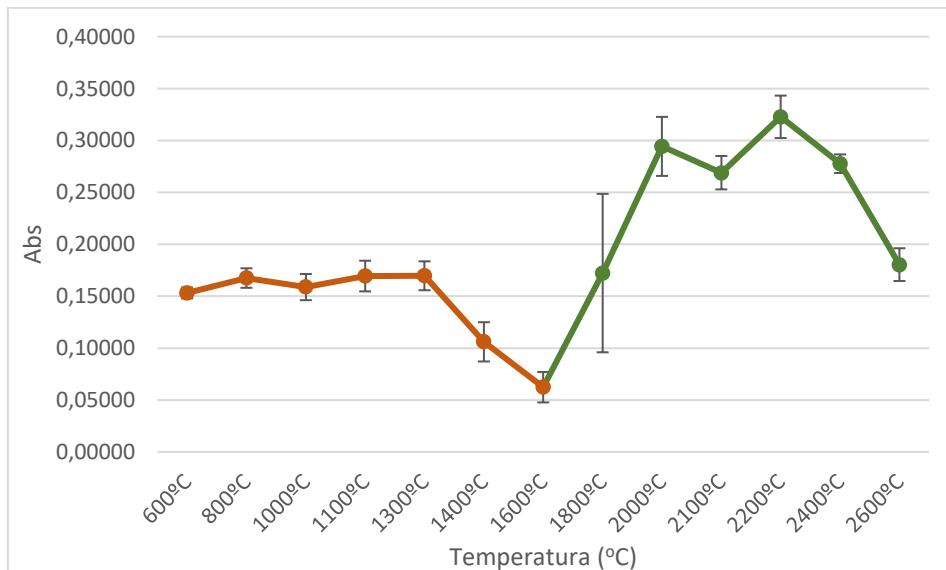


Figura 2. Curva de pirólisis y de vaporización.

Como se puede observar, la curva de pirólisis es descendente, ya que existe un punto (1300 °C) a partir del cual la absorbancia medida es cada vez menor debido a que el analito a partir de ese punto se vaporiza. Al ir perdiendo analito, las medidas de absorbancia son cada vez menores hasta llegar a un punto en el que la absorbancia es igual a 0, puesto que el analito se ha volatilizado y lo hemos perdido completamente.

Sin embargo, ocurre lo contrario en la curva de vaporización, que es ascendente ya que a mayor temperatura existe más analito en fase gas y, por tanto, se mide más analito, hasta que a temperaturas altas se rompen los enlaces entre Ca y F.

Teniendo en cuenta estas curvas (*Figura 2*), se seleccionaron las temperaturas óptimas de pirólisis y de vaporización de 1300 °C y 2000 °C respectivamente.

De esta forma, el programa de temperaturas de las distintas etapas del proceso de medida de la absorbancia de la molécula CaF por HR-CS AAS quedaron de la siguiente manera:

Paso	Temperatura (°C)	Rampa (°C/s)	Tiempo de estancia (s)
Secado	90	3	20
Secado	110	5	30
Pirólisis	1300	300	10
Adaptación al gas	1300	Stop	5
Vaporización	2000	3000	5
Limpieza	2500	500	4

Tabla 3. Programa de temperaturas de las distintas etapas del proceso.

6.3. Optimización de la concentración de calcio (contracción)

Los resultados de absorbancia de CaF obtenidos en el proceso de optimización de la concentración de calcio como contracción se pueden observar, junto con la desviación estándar (SD) y la desviación estándar relativa (RSD%), en *Tabla A2.1. del Anexo II*.

Los datos de absorbancia de dicha tabla se representaron gráficamente frente a la concentración de calcio, con las barras de errores de la desviación estándar, dando lugar a la siguiente curva:

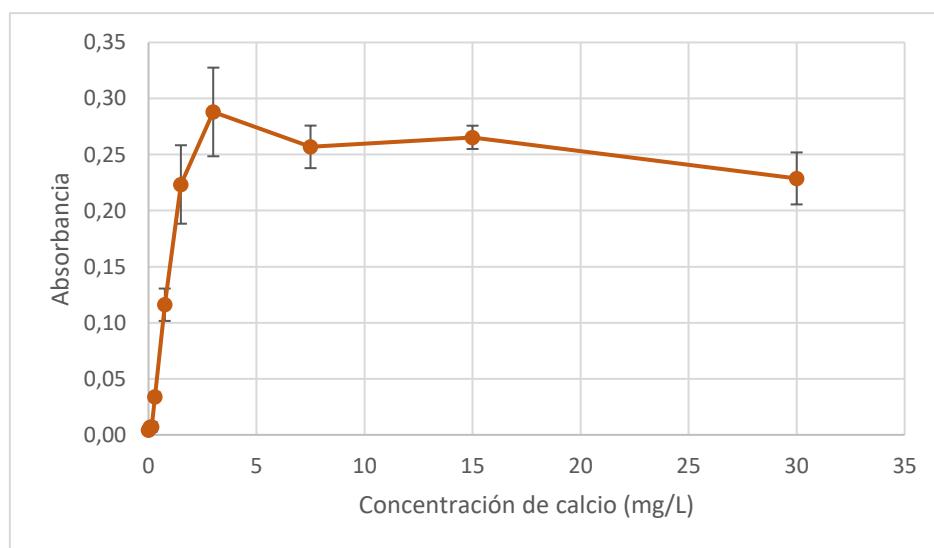


Figura 3. Curva de optimización de la concentración de Ca.

Teniendo en cuenta la curva de la *Figura 3*, se seleccionó la concentración óptima de calcio de 0,3% (Ca 3mg/L), puesto que como se puede observar es el punto en el que la curva deja de crecer llegando al valor máximo de absorbancia.

Una vez optimizadas las temperaturas de pirólisis y de vaporización y la concentración de calcio con el fin de obtener la máxima absorbancia posible a 606,4 nm, señal más intensa de la molécula, se obtuvo el siguiente espectro 3D del CaF (*Figura 4*), realizado con un pipeteo de 20 μL de la disolución de 0,5 mg/L de F y 5 μL de la disolución de 3% de Ca.

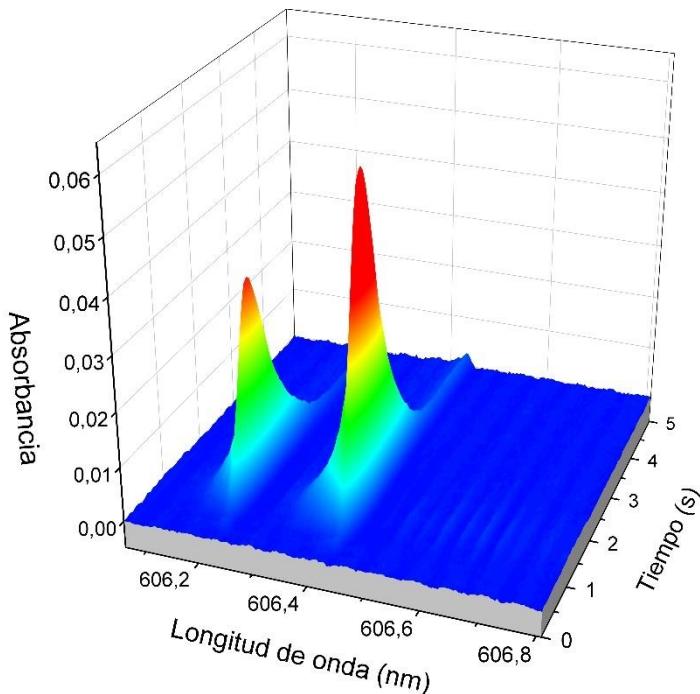


Figura 4. Espectro realizado con 0,5 mg/L de F y 3% de Ca

6.4. Calibrado

Los valores de absorbancia obtenidos en el calibrado se muestran en la *Tabla A3.1. del Anexo III*, junto a las concentraciones de F conocidas provenientes de las disoluciones de F previamente preparadas.

Los datos de dicha tabla, se representaron gráficamente obteniendo la siguiente recta de calibrado:

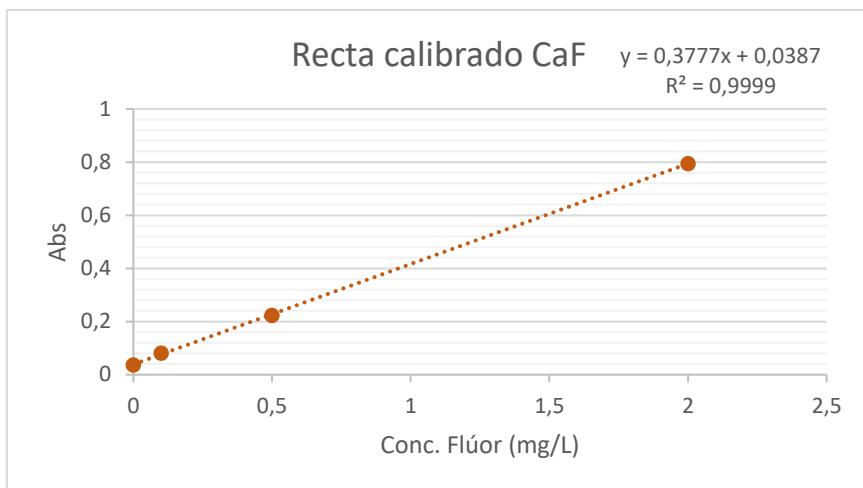


Figura 5. Recta de calibrado: Absorbancia frente a concentración de F (mg/L).

Una vez se obtuvo la recta de calibrado con la ecuación de la recta $y=0,3777x+0,0387$; donde y es la absorbancia y x es la concentración de F, se calcularon los límites de detección y de cuantificación para poder interpretar los datos de forma correcta, para lo que se midió 10 veces la absorbancia del blanco.

- **Límite de detección (LOD):** concentración mínima detectable por el método diferente al blanco. Se determina con la siguiente fórmula:

$$LOD = 3 * s_0 / S$$

donde s_0 es la desviación standard de los blancos y S la sensibilidad

$$LOD = 3 * 0,002613 / 0,3777 = 0,0207 \text{ mg/L}$$

- **Límite de cuantificación (LOC):** Concentración mínima determinable por el método diferente al blanco. Se determina con la siguiente fórmula:

$$LOC = 10 * s_0 / S$$

donde s_0 es la desviación standard de los blancos y S la sensibilidad

$$LOC = 10 * 0,002613 / 0,3777 = 0,0691 \text{ mg/L}$$

6.5. Validación del método

Tras realizar la medida de absorbancia del material de referencia certificado de volumen total de aniones (SIGMA – ALDRICH) con una concentración de flúor conocida, y tras conocer la concentración de F del mismo partiendo de la recta de calibrado (*Figura 5*), se validó este método para la determinación de F puesto que el valor obtenido de la concentración entró en el intervalo de aceptación de resultados que indicaba el fabricante, estando entre 1,39 y 3,65 mg/L.

La media de absorbancia de las medidas realizadas fue 0,7644; y la concentración de F resultante haciendo uso de la fórmula de la recta de calibrado fue de 1,9216 mg/L.

Además, se calculó el intervalo de confianza al 95%, siendo 1,8583 – 1,9844 mg/L.

Así pues, se alcanzó el objetivo principal de este trabajo, habiendo conseguido desarrollar un método para la determinación de flúor mediante la técnica de espectroscopía de absorción molecular con fuente continua de alta resolución con el uso de un horno de grafito (HR-CS GF MAS).

6.6. Aplicación del método a muestras

Tras realizar las correspondientes medidas de absorbancia de cada una de las muestras de agua potable de consumo humano, se obtuvieron los resultados de absorbancia que se muestran en la *Tabla 4* y la *Tabla 5*. En ambas tablas, se pueden observar las concentraciones de F de cada muestra obtenidas a partir de la ecuación de la recta de calibrado ($y=0,3777x+0,0387$) del apartado 6.4. (*Figura 5*) en mg/L de F.

MEDIDAS AGUA COMPRA	Abs	[F] (mg/L)	[F] (mg/L)	SD
			en etiqueta	
FONTVELLA	0,13377	0,2517	-	0,00576
NESTLÉ AQUAREL	0,28507	0,6522	-	0,01540
SOLÁN DE CABRAS	0,09079	0,1379	-	0,00397
CABREIROÁ	0,48612	1,1800	0,96	0,01353
EVIAN	0,08527	0,1232	0,06	0,00707

Tabla 4. Resultados de absorbancia y concentración de F (mg/L) de las muestras de agua de compra, y concentración de las mismas expresada en la etiqueta del envase.

MEDIDAS AGUA GRIFO	Abs	[F] (mg/L)	SD
ZARAGOZA - martes 13/04/21	0,06337	0,0650	0,01160
ZARAGOZA - viernes 16/04/21	0,08257	0,1161	0,00562
ZARAGOZA - martes 20/04/23	0,07128	0,0862	0,00294
ZARAGOZA - viernes 23/04/21	0,07735	0,1023	0,00490
ZARAGOZA - martes 27/04/25	0,07475	0,0954	0,00501
ALMUDÉVAR - miércoles 28/04/21	0,07530	0,0969	0,00403
HUESCA - lunes 26/04/21	0,07725	0,1020	0,00376

Tabla 5. Resultados de absorbancia y concentración de F (mg/L) de las muestras de agua de grifo de Zaragoza, Huesca y Almudévar.

Como se puede observar en estas tablas de resultados, todas las muestras mostraron unas concentraciones de fluoruro que están dentro de los valores aceptables para ser agua apta para el consumo según el *Real Decreto 140/2003*, puesto que todas estaban por debajo del valor paramétrico del Anexo I de este RD, que es de 1,5 mg/L de F.

Además, puesto que ninguna de las aguas superó ese valor de 1,5 mg/L, no atenderán al *Real Decreto 1798/2010* que indica que, en caso contrario, deberían reflejar en su etiqueta que el agua “contiene más de 1,5 mg/L de flúor: no adecuada para el consumo regular de los lactantes y niños menores de siete años”. Por tanto, todas estas muestras de agua, tanto las de supermercado como las del grifo, se considerarían aptas para lactantes y niños menores de 7 años en lo que respecta al flúor.

Además, en cuanto a las aguas compradas en el supermercado en cuyo etiquetado se reflejaba la concentración de fluoruro, se obtuvieron valores muy aproximados a los expresados en la etiqueta (*Tabla 4*).

El agua de la marca Cabreiroá, de la cual se obtuvo un resultado mayor a 1 mg/L, estaría autorizada para llevar en su etiqueta la mención de agua “fluorada o que contiene flúor” según el *Real Decreto 314/2016*, siendo un agua mineral natural.

Las aguas del grifo tanto de Zaragoza, de Huesca como de Almudévar, presentaron niveles bajos de F, por debajo de los recomendados para la prevención de caries por la Academia Americana de Odontología Pediátrica (AAPD), de alrededor de 0,7 ppm. Además, se puede observar que, en general, las aguas de compra del supermercado dieron como resultado concentraciones más altas de F.

También se observó que las muestras de agua de Zaragoza recogidas durante varios días no presentaban grandes fluctuaciones en los resultados, siendo muy similares todos los valores de concentración de F.

Por último, cabe destacar que todos los resultados obtenidos de las concentraciones de F (mg/L) se encuentran por encima del límite de detección (LOD) del método, y todos excepto la concentración de F del agua del grifo de Zaragoza con fecha 13/04/21, se encuentran por encima del límite de cuantificación (LOC) del método.

7. CONCLUSIONES

- La determinación de flúor en muestras acuosas mediante el método analítico de absorción molecular con fuente continua de alta resolución (HR-CS MAS), con un horno de grafito (HR-CS GF MAS), es posible.
Para ello, se debe inducir la formación de una molécula de flúor en fase gas, y el mejor contraión para ello es el calcio, formando una molécula de CaF medible con el instrumento HR-CS AAS ContrAA® 800G (Analytik Jena). La concentración óptima de calcio para esta determinación es de 0,3 %. Además, la temperatura óptima de pirólisis para el análisis de flúor es de 1300 °C y la temperatura óptima de vaporización es de 2000 °C.
- El método analítico presentado en este trabajo es eficaz para la determinación de la concentración de flúor en muestras acuosas, y proporciona resultados exactos y precisos.

8. CONCLUSIONS

- The determination of fluorine in aqueous samples using the analytical method of molecular absorption with a high-resolution continuous source (HR-CS MAS), with a graphite furnace (HR-CS GF MAS), it's possible.
For this, the formation of a fluorine molecule in gas phase must be induced, and the best counterion for this is calcium, forming a CaF molecule measurable with the HR-CS AAS instrument ContrAA® 800G (Analytik Jena). The optimal calcium concentration for this determination is 0.3%. In addition, the optimal pyrolysis temperature for fluorine analysis is 1300 °C and the optimal vaporization temperature is 2000 °C.
- The analytical method presented in this work is effective for determining the concentration of fluorine in aqueous samples and provides accurate and precise results.

9. VALORACIÓN PERSONAL

El desarrollo de este trabajo de modalidad experimental me ha permitido adquirir nuevos conocimientos sobre el flúor y los efectos que éste provoca, y la posibilidad de su análisis mediante metodologías como la espectroscopía de absorción molecular con fuente continua de alta resolución (HR-CS MAS), la cual prácticamente desconocía. En cuanto al flúor, he aprendido que, además de los efectos beneficiosos conocidos, existen también efectos negativos producidos tras ingerir altas dosis durante un tiempo prolongado. Además, gracias a la

oportunidad de desarrollar este trabajo en un laboratorio, he podido conocer el funcionamiento de un instrumento (HR-CS MAS) como es el HR-CS AAS ContrAA® 800G (Analytik Jena), y su manejo a través del software especializado para el mismo. Otra de las partes positivas de esto, ha sido refrescar algunos de los conocimientos adquiridos a lo largo del Grado de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, sobre todo los adquiridos en las asignaturas de Química Analítica, Técnicas Instrumentales del Análisis Químico y Análisis Químico de los Alimentos, y desarrollarlos aprendiendo otros nuevos. Finalmente, también he trabajado en la búsqueda y organización de la información recogida, y la interpretación de ésta y de los resultados obtenidos en el trabajo.

10. BIBLIOGRAFÍA

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2003). Toxicological profile for fluorides, hydrogen fluoride, and fluorine. Atlanta: ATSDR. Disponible en: <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp11.pdf> [Consultado 20-08-2021].

Asamblea General de las Naciones Unidas (2010). Resolución aprobada por la Asamblea General el 28 de julio de 2010. Nueva York: Asamblea General de las Naciones Unidas. Disponible en: https://www.un.org/ga/search/view_doc.asp?symbol=A/RES/64/292&Lang=S [Consultado 3-08-2021].

Benito Olivares, R. y Nogueras Bayona, J. (1995). "Flúor. Beneficios sobre la salud humana". Revista española odontoestomatológica de implantes, 3 (1), pp. 40-42. Disponible en: <http://deposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/25987/1/199406231.pdf> [Consultado 15-07-2021].

Gómez Nieto, B. (2019). Nuevas aplicaciones analíticas basadas en la Espectrometría de Absorción Atómica usando instrumentación de última generación. Tesis Doctoral con Mención Internacional. Universidad Autónoma de Madrid. Disponible en: https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/688578/gomez_nieto_beatriz.pdf?sequence=1&isAllowed=n [Consultado 7-08-2021]

Gallego Reyes, S.M., Martínez Beneyto, Y., Serna-Muñoz, C., Pérez-Silva, A., Aparecido Cury, J. y Ortiz Ruiz, A.J. (2019). "Concentración de flúor y metales pesados en aguas embotelladas: medidas barrera frente a caries dental y fluorosis". Revista Española de Salud Pública, 93: 17 de diciembre e201912110. Disponible en:

https://www.mscbs.gob.es/biblioPublic/publicaciones/recursos_propios/resp/revista_cdrom/VOL93/ORIGINALES/RS93C_201912110.pdf [Consultado 2-08-2021].

Goreti R Vale, M., Oleszczuk, N., Santos, W. (2006). "Current Status of Direct Solid Sampling for Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry - A Critical Review of the Development between 1995 and 2005". *Applied Spectroscopy Reviews*, 41 (4), pp. 377-400. DOI: 10.1080/05704920600726167

Mañay, N., Clavijo, G. y Díaz, L. (2009). "Absorción atómica con horno de grafito". En: M.I. Litter M.A. Armienta S.S. Farías (Coord.). *Metodologías analíticas para la determinación y especiación de arsénico en aguas y suelos*. Argentina: CYTED, pp. 79-92. Disponible en: <http://riquim.fq.edu.uy/archive/files/02ba23e6cc083af03bfc55ac63a98a0c> [Consultado 21-07-2021].

Maraver, F., Vitoria, I., Almerich-Silla, J.M. y Armijo, F (2015). "Fluoruro en aguas minerales naturales envasadas en España y prevención de la caries dental". *Atención Primaria*, 47 (1), pp. 15-24. DOI: 10.1016/j.aprim.2014.04.003

National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 84512, Calcium fluoride. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Calcium-fluoride> [Consultado 9-08-2021].

Organización Mundial de la Salud (2002). Fluorides. Ginebra: OMS. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42415/WHO_EHC_227.pdf;jsessionid=965B55A249D520BD163E7DF84E3A9C35?sequence=1 [Consultado 24-07-2021].

Organización Mundial de la Salud (2006). Guías para la calidad del agua potable. Ginebra: OMS. Disponible en: https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_full_lowres.pdf [Consultado 1-08-2021].

Ozbek, N. y Akman, S. (2012). "Method development for the determination of fluorine in water samples via the molecular absorption of strontium monofluoride formed in an electrothermal atomizer". *Spectrochimica Acta Part B: Espectroscopía atómica*, 69, pp. 32-27. DOI: 10.1016/j.sab.2012.03.003

Pérez Silva, A., Aparecido Cury, J., Serna Muñoz, C., Cabello Malagón, I., Martínez Beneyto, Y. y Ortiz Ruiz, A.J. (2021). "La concentración de fluoruro en las aguas consumidas en la Región de

Murcia no es suficiente para prevenir la caries dental". Enfermería Global, 20(61), pp. 122-138.
DOI: 10.6018/eglobal.432151

Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. Boletín oficial del estado, 45, de 21 de febrero de 2003.

Reglamento (CE) nº 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de diciembre de 2006, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos, se modifica la Directiva 1999/45/CE y se derogan el Reglamento (CEE) nº 793/93 del Consejo y el Reglamento (CE) nº 1488/94 de la Comisión así como la Directiva 76/769/CEE del Consejo y las Directivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE y 2000/21/CE de la Comisión. Diario Oficial de la Unión Europea, 396, de 30 de diciembre de 2006, pp. 1-852.

Real Decreto 1798/2010, de 30 de diciembre, por el que se regula la explotación y comercialización de aguas minerales naturales y aguas de manantial envasadas para consumo humano. Boletín Oficial del Estado, 16, de 19 de enero de 2011.

Real Decreto 1799/2010, de 30 de diciembre, por el que se regula el proceso de elaboración y comercialización de aguas preparadas envasadas para el consumo humano. Boletín Oficial del Estado, 17, de 20 de enero de 2011, pp. 6292-6304.

Real Decreto 314/2016, de 29 de julio, por el que se modifican el Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano, el Real Decreto 1798/2010, de 30 de diciembre, por el que se regula la explotación y comercialización de aguas minerales naturales y aguas de manantial envasadas para consumo humano, y el Real Decreto 1799/2010, de 30 de diciembre, por el que se regula el proceso de elaboración y comercialización de aguas preparadas envasadas para el consumo humano. Boletín Oficial del Estado, 183, de 30 de julio de 2016, pp. 53106-53126.

Real Decreto 902/2018, de 20 de julio, por el que se modifican el Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano, y las especificaciones de los métodos de análisis del Real Decreto 1798/2010, de 30 de diciembre, por el que se regula la explotación y comercialización de aguas minerales naturales y aguas de manantial envasadas para consumo humano, y del Real Decreto 1799/2010, de 30 de diciembre, por el que se regula el proceso de elaboración y comercialización de aguas preparadas envasadas para el consumo humano. Boletín Oficial del Estado, 185, de 1 de agosto de 2018, pp. 77350-77370.

Resano, M., Rello, L., Flórez, M. y Belarra, M. A. (2011). "On the possibilities of high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for the simultaneous or sequential monitoring of multiple atomic lines". *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 66 (5), pp. 321-328. DOI: 10.1016/j.sab.2011.03.008

Resano, M., Flórez, M. R. y García-Ruiz, E. (2014). "Progress in the determination of metalloids and non-metals by means of high-resolution continuum source atomic or molecular absorption spectrometry. A critical review". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406 (9-10), pp. 2239-2259. DOI: 10.1007/s00216-013-7522-9

Resano, M., García-Ruiz, E., Aramendía, M. y Belarra, M. A. (2019). "Quo vadis high-resolution continuum source atomic/molecular absorption spectrometry?" *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 34 (1), pp. 59-80. DOI: 10.1039/C8JA00256H.

Valdez-Jiménez, L., Soria Fregozo, C., Miranda Beltrán, M.L., Gutiérrez Coronado, O. y Pérez Vega, M.I. (2011). "Efectos del flúor sobre el sistema nervioso central". *Neurología*, 26 (5), pp. 297-300. DOI: 10.1016/j.nrl.2010.10.008

Welz, B. (2004). "High-resolution continuum source AAS: the better way to perform atomic absorption spectrometry". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381 (1), pp. 69-71. DOI: 10.1007/s00216-004-2891-8

Welz, B., Borges, D. L. G. y Heitmann, U. (2007). "High-Resolution Continuum Source AAS and its Application to Food Analysis". En: Caroli, S. (Coord.). *The Determination of Chemical Elements in Food: Applications for Atomic and Mass Spectrometry*. Hoboken: Wiley, pp. 81-114. DOI: 10.1002/9780470141007.ch4

11. ANEXOS

Anexo I. Optimización de temperatura

T ^a pirólisis (°C)	Abs	SD
600	0,15314	0,00517
800	0,16750	0,00941
1000	0,15878	0,01259
1100	0,16941	0,01478
1300	0,16968	0,01392
1400	0,10605	0,01892
1600	0,06232	0,01465

Tabla A1.1. Resultados de absorbancia de la optimización de la temperatura de pirólisis.

T ^a vaporización (°C)	Abs	SD
1800	0,17231	0,07632
2000	0,29434	0,02844
2100	0,26900	0,01608
2200	0,32284	0,02045
2400	0,27766	0,00897
2600	0,18043	0,01577

Tabla A1.2. Resultados de absorbancia de la optimización de la temperatura de vaporización.

Anexo II. Optimización de la concentración de Ca

[Ca] (mg/L)	Abs CaF	SD	RSD%
0	0,00430	0,00261	60,8
0,075	0,00683	0,00228	33,4
0,15	0,00711	0,00418	58,8
0,3	0,03401	0,0037	10,9
0,75	0,11606	0,01443	12,4
1,5	0,22333	0,03499	15,7
3	0,28801	0,03954	13,7
7,5	0,25687	0,01898	7,4
15	0,26537	0,01037	3,9
30	0,22872	0,02318	10,1

Tabla A2.1. Resultados de absorbancia de la optimización de la concentración de calcio.

Anexo III. Calibrado

RECTA DE CALIBRADO CaF con Ca 3%	
Conc. Flúor (mg/L)	Absorbancia
0	0,0365
0,1	0,08196
0,5	0,22346
2	0,79487

Tabla A3.1 Resultados de absorbancia obtenidos en el calibrado.