



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS  
Departamento de Química Analítica y Análisis Instrumental

# Nuevas aplicaciones analíticas basadas en la Espectrometría de Absorción Atómica usando instrumentación de última generación

Presentada por:  
Beatriz Gómez Nieto

Dirigida por:  
Dra. María Jesús Gismera García  
Dra. María Teresa Sevilla

TESIS DOCTORAL CON MENCIÓN INTERNACIONAL  
Madrid, 2019





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Analítica y Análisis Instrumental

# New analytical applications based on Atomic Absorption Spectrometry using last generation instrumentation

Presented by:

Beatriz Gómez Nieto

Supervised by:

Dra. María Jesús Gismera García

Dra. María Teresa Sevilla Escribano

INTERNATIONAL DOCTORAL DISSERTATION

Madrid, 2019



## AGRADECIMIENTOS / ACKNOWLEDGEMENT

Quisiera comenzar como es de rigor y justicia expresando mis más sinceros agradecimientos a mis directoras de Tesis, María Teresa Sevilla y María Jesús Gismera por todo el esfuerzo que han hecho durante estos años para que esta Tesis salga adelante. No ha sido fácil, pero gracias a vuestro esfuerzo por fin estoy escribiendo las últimas páginas de las que espero sean los primeros pasos en mi carrera investigadora.

Durante los años que he pasado en el Departamento de Química Analítica son muchas las personas que he conocido. A todos os agradezco vuestra ayuda y consejo.

También son muchos los compañeros de laboratorio que me han acompañado. A aquellos que siguen y aquellos que han tenido que marchar, a todos os doy las gracias por las conversaciones inspiradoras, los cafés matutinos y por arreglar todo aquello que rompo (grapadora, impresora y demás enseres ...).

Me gustaría agradecer a todas las sociedades científicas (RSEQ, SEQA y S-EA) el esfuerzo que hacen para que los jóvenes investigadores puedan disponer de becas para asistir a eventos científicos y seguir formándose gracias a los distintos cursos de formación que ofrecen.

Quisiera dar las gracias también al personal de Inycom, Manuel León y Juani Fernandez que en mis primeros intentos por entender las cualidades del ContrAA me ayudaron y resolvieron cada duda que me surgía.

It has been a great pleasure for me to be so friendly accepted in the research group of Dra. Kerstin Leopold at Ulm University. It was a great experience to spend three months in your labs and have the opportunity to learn about your works.

Dejando el ámbito laboral y científico a un lado, quisiera dar las gracias a los grandísimos amigos que tengo que me aguantan en los buenos en los malos momentos. Alberto, Nerea, Isa, Rocío, Virginia, Jorge, Ana... gracias por ser mi familia madrileña. Esos *tuppers* no estarían tan llenos sin ti mi querida compi de piso y esas cervezas no hubieran sabido tan bien sin vuestra compañía.

Y por supuesto, mil gracias a La Familia Original, a mi madre, a mi padre y a mi hermano por estar siempre para apoyarme y aguantarme.



## ÍNDICE / CONTENTS

<i>Acrónimos y abreviaturas / Acronymes and abbreviations</i> .....	vii
<i>Justificación, resumen y estructura del trabajo /</i>	
<i>Justification, summary and structure of the work</i> .....	ix

### **CAPÍTULO I / CHAPTER I**

#### **Introducción general / General introduction** **1**

---

<b>I.1. INTERÉS DEL ANÁLISIS DE ELEMENTOS EN LOS ÁMBITOS AMBIENTAL, ALIMENTARIO Y CLÍNICO</b> .....	<b>3</b>
<b>I.2 EVOLUCIÓN DE LA ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA</b> .....	<b>4</b>
I.2.1. AAS: de las fuentes de líneas a los equipos de alta resolución y fuente continua.....	6
<b>I.3. ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA DE ALTA RESOLUCIÓN Y FUENTE CONTINUA (HR-CS AAS)</b> .....	<b>7</b>
I.3.1. Características instrumentales de los espectrofotómetros HR-CS AAS	7
I.3.2. Ventajas y posibilidades metodológicas de la HR-CS AAS.....	11
<b>I.4. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>21</b>

### **CAPÍTULO II / CHAPTER II**

#### **Objetivos y plan de trabajo / Objectives and work plan** **31**

---

<b>II.1. OBJETIVOS</b> .....	<b>33</b>
<b>II.2 PLAN DE TRABAJO GENERAL</b> .....	<b>34</b>

### **CAPÍTULO III / CHAPTER III**

#### **Experimental / Experimental** **37**

---

<b>III.1. INSTRUMENTACIÓN</b> .....	<b>39</b>
III.1.1. Espectrofotómetro de absorción atómica de alta resolución y fuente continua (HR-CS AAS).....	39
III.1.2. Otra instrumentación y material de laboratorio.....	43
<b>III.2. REACTIVOS</b> .....	<b>44</b>
<b>III.3. PROCEDIMIENTOS GENERALES</b> .....	<b>45</b>
III.3.1. Optimización de las condiciones de análisis.....	45
III.3.1.1. Metodologías de análisis mediante HR-CS FAAS.....	45
III.3.1.2. Metodologías de análisis mediante HR-CS GFAAS.....	47
III.3.2. Procedimientos de cálculo de los parámetros analíticos.....	48

## CAPÍTULO IV / CHAPTER IV

### Análisis multielemental secuencial rápido y con bajo consumo de muestra mediante HR-CS FAAS / Fast sequential multielemental analysis with low sample consumption by HR-CS FAAS

	<b>49</b>
<b>IV.1. INTRODUCCIÓN GENERAL .....</b>	<b>51</b>
<b>IV.2. OBJETIVOS.....</b>	<b>54</b>
<b>IV.3. OPTIMIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA.....</b>	<b>54</b>
IV.3.1. Selección de las longitudes de medida.....	54
IV.3.2. Optimización de las condiciones de atomización y la altura del mechero..	55
IV.3.3. Selección de los parámetros de introducción de muestra.....	57
IV.3.4. Evaluación del número de píxeles óptimo para la cuantificación de la señal de absorbancia .....	60
IV.3.5. Posibilidades para la expansión del intervalo de respuesta lineal .....	62
<b>IV.4. APLICACIÓN DEL MÉTODO A LA DETERMINACIÓN DE ELEMENTOS     MINORITARIOS Y MAYORITARIOS EN MUESTRAS DE INTERÉS     MEDIOAMBIENTAL.....</b>	<b>69</b>
IV.4.1. Introducción.....	69
IV.4.2. Procedimientos.....	70
IV.4.2.1. Preparación de disoluciones patrón.....	70
IV.4.2.2. Muestras y preparación de muestras.....	70
IV.4.2.3. Procedimiento de medida y parámetros instrumentales.....	72
IV.4.3. Resultados y discusión.....	72
IV.4.3.1. Calibración y evolución de los parámetros analíticos.....	72
IV.4.3.2. Validación de la metodología y análisis de las muestras .....	74
<b>IV.5. APLICACIÓN DEL MÉTODO A LA DETERMINACIÓN DE Zn, Cu, Mn, Mg Y Si EN     MUESTRAS DE INTERÉS ALIMENTARIO.....</b>	<b>82</b>
IV.5.1. Introducción.....	82
IV.5.2. Procedimientos.....	84
IV.5.2.1. Preparación de disoluciones patrón.....	84
IV.5.2.2. Muestras y preparación de muestras.....	84
IV.5.2.3. Procedimiento de medida y parámetros instrumentales.....	86
IV.5.3. Resultados y discusión.....	86
IV.5.3.1. Estudio de la cantidad de modificador de lantano .....	86
IV.5.3.2. Calibración y evolución de los parámetros analíticos.....	89
IV.5.3.3. Análisis de las muestras y validación de la metodología .....	90
<b>IV.6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>99</b>
<b>IV.7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>100</b>



## CAPÍTULO V / CHAPTER V

### Determinación de silicio en emulsiones dobles agua-aceite-agua mediante HR-CS FAAS / Silicon determination in doble water-oil-water emulsions by HR-CS FAAS

	<b>107</b>
<b>V.1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>109</b>
<b>V.2. OBJETIVOS</b> .....	<b>113</b>
<b>V.3. PROCEDIMIENTOS</b> .....	<b>113</b>
V.3.1. Composición y preparación de las emulsiones agua-aceite-agua .....	<b>113</b>
V.3.2. Preparación de las disoluciones patrón .....	<b>115</b>
V.3.3. Procedimiento de medida y parámetros instrumentales .....	<b>116</b>
<b>V.4. OPTIMIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA</b> .....	<b>117</b>
V.4.1. Influencia de la composición de la emulsión doble sobre la señal de absorbancia .....	<b>117</b>
V.4.2. Calibración y evaluación de los parámetros analíticos .....	<b>125</b>
<b>V.5. APLICACIÓN DEL MÉTODO AL ANÁLISIS DE EMULSIONES <math>W_1/O/W_2</math></b> .....	<b>127</b>
<b>V.6. CONCLUSIONES</b> .....	<b>129</b>
<b>V.7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>130</b>

## CAPÍTULO VI / CHAPTER VI

### Determinación de calcio en micro-muestras biológicas mediante HR-CS GFAAS / Calcium determination in biological micro-samples by HR-CS GFAAS

	<b>135</b>
<b>VI.1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>137</b>
<b>VI.2. OBJETIVOS</b> .....	<b>140</b>
<b>VI.3. PROCEDIMIENTOS</b> .....	<b>140</b>
VI.3.1. Muestras y preparación de muestras .....	<b>140</b>
VI.3.2. Preparación de las disoluciones patrón .....	<b>142</b>
VI.3.3. Procedimiento de medida y parámetros instrumentales .....	<b>142</b>
<b>VI.4. OPTIMIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA</b> .....	<b>143</b>
VI.4.1. Elección de la longitud de onda de medida .....	<b>143</b>
VI.4.2. Optimización del programa de temperatura .....	<b>145</b>
VI.4.3. Influencia de la cantidad de muestra sobre la señal de absorbancia .....	<b>147</b>
VI.4.4. Calibración del método .....	<b>150</b>
VI.4.5. Ajuste de la sensibilidad y expansión del intervalo de respuesta lineal ..	<b>151</b>
VI.4.6. Evaluación de los parámetros analíticos .....	<b>154</b>
<b>VI.5. APLICACIÓN DEL MÉTODO AL ANÁLISIS DE MUESTRAS</b> .....	<b>155</b>
<b>VI.6. CONCLUSIONES</b> .....	<b>157</b>
<b>VI.7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>158</b>

## CAPÍTULO VII / CHAPTER VII

### Caracterización del tamaño de nanopartículas de oro mediante GFAAS / Characterization of gold nanoparticle size by GFAAS 163

---

VII.1. INTRODUCTION .....	165
VII.2. OBJECTIVE .....	170
VII.3. EXPERIMENTAL .....	171
VII.3.1. Preparation of Au (III) solutions and AuNPs suspensions .....	171
VII.3.2. GFAAS instrument and measurement procedure .....	171
VII.3.3. Parameters evaluated from the experimental absorbance signals .....	173
VI.4. RESULTS AND DISCUSSION .....	174
VII.4.1. Preliminary studies .....	174
VII.4.2. Evaluation of parameters derived from the absorbance signal for AuNPs size discrimination .....	175
VII.4.2.1. Evaluation of the atomization rate ( $k_{at}$ ) .....	175
VII.4.2.2. Evaluation of the atomization delay ( $t_{ad}$ ) .....	176
VII.4.2.3. Evaluation of the temperature at the signal maximum ( $T_{max}$ ) .....	179
VII.4.3. Evaluation of the temperature program conditions .....	183
VII.4.4. Study of the atomization mechanism of Au (III) and AuNPs .....	185
VII.5. CONCLUSIONS .....	191
VII.6. REFERENCES .....	192

## CAPÍTULO VIII / CHAPTER VIII

### Conclusiones generales / General conclusions 197

---

## Anexo / Annex

### Publicaciones / Publications 203

---

## ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS / ACRONYMES AND ABBREVIATIONS

<b>AAS</b>	Espectroscopia de absorción atómica (de sus siglas en inglés <i>Atomic Absorption Spectroscopy</i> )
<b>AgNPs</b>	Nanopartículas de plata ( <i>Silver Nanoparticles</i> )
<b>AuNPs</b>	Nanopartículas de oro ( <i>Gold Nanoparticles</i> )
<b>CCD</b>	Detector de tipo dispositivo de carga acoplada (de sus siglas en inglés <i>Charge-Coupled Device</i> )
<b>CP</b>	Píxel central (de sus siglas en inglés <i>Central Pixel</i> )
<b>CS AAS</b>	Espectroscopia de absorción atómica con fuente continua (de sus siglas en inglés <i>Continuum Source Atomic Absorption Spectroscopy</i> )
<b>C<sub>0</sub></b>	Concentración característica ( <i>Characteristic concentration</i> )
<b>DE</b>	Emulsión doble (de sus siglas en inglés <i>Double Emulsion</i> )
<b>E<sub>a</sub></b>	Energía de activación ( <i>Activation energy</i> )
<b>FAAS</b>	Espectroscopia de absorción atómica en llama (de sus siglas en inglés <i>Flame Atomic Absorption Spectroscopy</i> )
<b>GFAAS</b>	Espectroscopia de absorción atómica en cámara de grafito (de sus siglas en inglés <i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy</i> )
<b>HR-CS AAS</b>	Espectroscopia de absorción atómica de alta resolución y fuente continua (de sus siglas en inglés <i>High Resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectroscopy</i> )
<b>ICP-OES</b>	Espectroscopia de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (de sus siglas en inglés <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy</i> )
<b>ICP-MS</b>	Espectroscopia de masa con plasma de acoplamiento inductivo (de sus siglas en inglés <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy</i> )
<b>k<sub>at</sub></b>	Tasa de atomización ( <i>Atomization rate</i> )

<b>LS AAS</b>	Espectroscopia de absorción atómica con fuente de línea (de sus siglas en inglés <i>Line Source Atomic Absorption Spectroscopy</i> )
<b>LOD</b>	Límite de detección (de sus siglas en inglés <i>Limit Of Detection</i> )
<b>LOQ</b>	Límite de cuantificación (de sus siglas en inglés <i>Limit Of Quantification</i> )
<b>NPs</b>	Nanopartículas ( <i>Nanoparticles</i> )
<b>PVSA</b>	Suma de las Absorbancias Integradas (de sus siglas en inglés <i>Peak Volume Selected Absorbance</i> )
<b>m<sub>0</sub></b>	Masa característica ( <i>Characteristic mass</i> )
<b>t<sub>ad</sub></b>	Tiempo máximo de aparición de la señal ( <i>Atomization delay</i> )
<b>T<sub>AP</sub></b>	Temperatura de aparición ( <i>Appearance temperature</i> )
<b>T<sub>max</sub></b>	Temperatura máxima de aparición de la señal ( <i>Temperature at signal maximum</i> )
<b>ULLR</b>	Límite superior de linealidad (de sus siglas en inglés <i>Upper Limit of the Linear Range</i> )
<b>UV</b>	Ultravioleta ( <i>Ultraviolet</i> )
<b>UV-vis</b>	Ultravioleta-visible ( <i>Ultraviolet-visible</i> )
<b>WSA</b>	Suma de las absorbancias promedio (de sus siglas en inglés <i>Wavelength Selected Absorbance</i> )
<b>W/O/W</b>	Sistemas agua-aceite-agua ( <i>Water-Oil-Water systems</i> )

## JUSTIFICACIÓN, RESUMEN Y ESTRUCTURA DEL TRABAJO

En esta Tesis se exploran las capacidades de los espectrofotómetros de última generación para desarrollar diferentes aplicaciones analíticas. Las nuevas mejoras y características que la llegada de los espectrofotómetros de absorción atómica de fuente continua de alta resolución (HR-CS AAS) ha traído a la Espectrometría de Absorción Atómica (AAS) se han empleado para desarrollar métodos para la determinación de metales y metaloides en muestras ambientales, clínicas y alimentarias. Además, se ha evaluado el potencial de la GFAAS como herramienta analítica para llevar a cabo la caracterización del tamaño de nanopartículas metálicas.

Esta memoria se ha estructurado en ocho capítulos. En primer lugar, se presenta una introducción general (**Capítulo I**) sobre la evolución de las técnicas AAS y las principales características de los instrumentos HR-CS AAS de última generación. Los objetivos principales y el plan de trabajo de esta Tesis se resumen en el **Capítulo II**, mientras que en el **Capítulo III** se presenta una descripción general de la instrumentación, los reactivos y los procedimientos experimentales comunes empleados en esta Tesis.

Los resultados obtenidos a lo largo de esta Tesis se han organizado en cuatro capítulos (**Capítulos IV, V, VI y VII**).

En el **Capítulo IV** se evalúan las capacidades de la HR-CS FAAS para llevar a cabo el desarrollo de métodos multielementales. El objetivo del trabajo presentado en este capítulo es desarrollar nuevas metodologías analíticas para determinar de forma secuencial y rápida elementos minoritarios y mayoritarios en muestras ambientales y alimentarias. Se han logrado optimizar métodos para cuantificar elementos que están presentes en las muestras a niveles de concentración muy diferentes utilizando una única disolución de muestra y con un consumo mínimo de muestra. Los métodos permiten llevar a cabo la determinación de 12 elementos en menos de 1 minuto y utilizando menos de 1.0 mL de muestra por elemento. Los resultados mostrados en este capítulo han dado lugar a la publicación de dos artículos (**Artículos 1 y 2** adjuntados en el Anexo final).

En el **Capítulo V** se aborda el desarrollo de un método rápido y sencillo basado en la HR-CS FAAS para la determinación de silicio en emulsiones dobles agua-aceite-agua (W/O/W) que fueron específicamente formuladas para la suplementación de silicio en diferentes productos cárnicos. Este trabajo surge de una colaboración con el grupo de investigación *Carnes y Productos Cárnicos* (CARPROCAR) en la que se requería desarrollar un método analítico rápido que permitiera monitorizar la eficacia de encapsulación de silicio en las emulsiones dobles, así como llevar a cabo el control de calidad de los productos derivados. El método desarrollado permite analizar directamente estas emulsiones después de su adecuada dilución en agua ultrapura evitando tener que realizar tediosos tratamientos de muestra. Los resultados obtenidos en este capítulo han dado lugar a la publicación del **Artículo 3** (incluido en el Anexo final).

El potencial de la HR-CS GFAAS para llevar a cabo el análisis de micro-muestras se estudia en el **Capítulo VI**. En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en la optimización de una metodología analítica para la determinación directa de calcio en suspensiones de mitocondrias y muestras de sangre. La motivación para desarrollar este método surge de la demanda analítica del grupo de investigación *Señalización mitocondrial de calcio y señalización de insulina/leptina en envejecimiento*, que requería realizar una determinación precisa y exacta de este elemento utilizando una cantidad muy pequeña de muestra. La metodología desarrollada ha permitido la determinación de calcio en estas muestras en pocos minutos, empleando entre 5 y 20  $\mu\text{L}$  de muestra. Este trabajo ha dado lugar a la publicación del **Artículo 4** (adjunto en el Anexo final).

El **Capítulo VII** presenta el trabajo realizado durante mi estancia de investigación en el Grupo de *Análisis de Ultratrazas* del *Instituto de Química Analítica y Bioanalítica* de la *Universidad de Ulm*. Esta estancia me ha ofrecido la posibilidad de explorar las capacidades de la GFAAS como herramienta analítica para la caracterización del tamaño de nanopartículas de oro y profundizar en el estudio de los mecanismos de atomización de metales y nanopartículas. Para la realización de estos estudios se ha utilizado un prototipo de un instrumento GFAAS que permite registrar simultáneamente las señales de absorbancia y las temperaturas reales en el interior del tubo de grafito. Esta prestación aún no está disponible en ningún otro espectrofotómetro comercial para AAS

y es de especial relevancia para las investigaciones llevadas a cabo durante esta estancia de investigación.

Finalmente, en el **Capítulo VIII** se resumen las principales conclusiones de todo el trabajo realizado durante esta Tesis.

## JUSTIFICATION, SUMMARY AND STRUCTURE OF THE WORK

In this Thesis, the capabilities of last generation spectrophotometers to develop different analytical applications are explored. The novel improvements and features that the arrival of high-resolution continuum source atomic absorption spectrophotometers (HR-CS AAS) has brought to Atomic Absorption Spectrometry (AAS) are exploited to develop methods for the determination of metals and metalloids in environmental, clinical and food samples. Moreover, the potential of GFAAS as an analytical tool for the characterization of metallic nanoparticle sizes is also evaluated.

This memory has been structured in eight chapters. Firstly, a general introduction (**Chapter I**) dealing with the evolution of AAS techniques and the main features of last generation HR-CS AAS instruments is presented. The main objectives and the work plan of this Thesis are summarized in **Chapter II**. A general description of the instrumentation, reagents and common experimental procedures employed to carry out this work are presented in **Chapter III**.

The results obtained throughout this Thesis have been organized in four chapters (**Chapters IV, V, VI and VII**).

The capabilities of HR-CS FAAS for the development of multi-element methods are evaluated in **Chapter IV**. The aim of the work presented in this chapter was to develop new analytical methodologies to determine minor and major elements in a fast sequential mode in food and environmental samples. Adequate methods to quantify elements that are present in the samples at very different concentration levels using a unique sample solution and with minimal sample consumption are achieved. The developed methods have allowed to carry out the determination of 12 elements using less than 1.0 mL of sample and 1 minute for element. The results showed in this chapter have led to the publication of two articles (**Articles 1 and 2** attached in the final Annex).

**Chapter V** deals with the development of a fast and straightforward method based on HR-CS FAAS for the determination of silicon in double water-in-oil-in-water (w/o/w) emulsions that are specifically formulated for the supplementation of silicon in different meat products. This work arises from a collaboration with the research group *Meat and*



*Meat Products (CARPROCAR)* to develop a fast and quality analytical method for monitoring the encapsulation efficiency of silicon in double (w/o/w) emulsions and the quality control of derived products. It was possible to analyse directly these emulsions after its adequate dilution in ultrapure water avoiding the need of tedious sample treatments. The results obtained in this chapter have led to the publication of **Article 3** (included in the final Annex).

The potential of HR-CS GFAAS to carry out the analysis of micro-samples is studied in **Chapter VI**. This chapter presents the results obtained in the optimization of an analytical methodology for the direct determination of calcium in mitochondrial suspensions and blood samples. The motivation to develop this method arises from the analytical demand of the research group *Calcium signalling in mitochondria and insulin/leptin signalling during ageing*, which required carrying out an accurate and precise determination of this element using a very small amount of sample. The developed method has allowed the determination of calcium levels in these samples in few minutes, employing between 5 and 20  $\mu\text{L}$  of sample. This work has resulted in the publication of **Article 4** (attached in the final Annex)

**Chapter VII** presents the work carried out during my research stay at the *Ultratrace Analysis Group* in the *Institute of Analytical and Bioanalytical Chemistry of Ulm University*. This stay has offered me the possibility of exploring the capabilities of GFAAS as an analytical tool for the characterization of gold nanoparticle sizes and going in depth in the study of the atomization mechanisms of metals and nanoparticles. To carry out these studies, a prototype of a GFAAS instrument, which allows the simultaneous registration of the absorbance signals and the actual in-tube temperatures, has been used. This potential capability is not yet available in any other commercial AAS instrument and it is of special relevance for the investigations carried out during this research stay.

Finally, **Chapter VIII** summarizes the main conclusions of the whole work carried out during this Thesis.



# **CAPÍTULO I / CHAPTER I:**

Introducción general / General Introduction



## I.1. INTERÉS DEL ANÁLISIS DE ELEMENTOS EN LOS ÁMBITOS AMBIENTAL, ALIMENTARIO Y CLÍNICO

La determinación de elementos metálicos y no metálicos es un tema de gran importancia en multitud de campos de estudio como el sanitario, el medioambiental, y en los sectores industrial y alimentario. A diario son muchas las decisiones que se toman en base a estas cuantificaciones. Por ejemplo, el control de los niveles de metales en muestras medioambientales, como aguas, suelos, sedimentos, etc., debe llevarse a cabo para asegurar que su contenido se encuentra por debajo de los límites que marca la legislación y para poder tomar las medidas necesarias para prevenir posibles procesos de contaminación. La determinación de estas sustancias en muestras alimentarias y clínicas es necesaria para asegurar unos estándares de calidad nutricional y de seguridad de los alimentos y proporcionar información para el diagnóstico de enfermedades. El resultado de estos análisis puede por tanto tener un gran impacto económico y social.

Por otra parte, el uso de nanopartículas metálicas (NPs) está cada vez más extendido en diferentes campos científicos y tecnológicos. De hecho, el número de productos de consumo que incorporan estas partículas aumenta cada año [1, 2], por lo que la preocupación por los posibles efectos adversos que las NPs pueden tener sobre el medio ambiente y la salud ha aumentado significativamente en los últimos años [3]. En este contexto, se requiere de técnicas y métodos analíticos apropiados que permitan la caracterización tanto del tamaño como de la concentración de estas partículas en muestras de diferente naturaleza.

El creciente número de controles de rutina requeridos en los laboratorios de análisis conlleva la necesidad de desarrollar metodologías que permitan la obtención de resultados exactos de manera rápida, selectiva y precisa, con el menor coste y la mínima demanda posible de recursos materiales y de personal. Por otra parte, en las últimas décadas se están haciendo grandes esfuerzos por desarrollar metodologías analíticas más sostenibles [4, 5], en las que se disminuyan el número y la cantidad de reactivos peligrosos empleados principalmente en los pretratamientos de las muestras, reduciendo al mismo tiempo la generación de residuos.

Existen una gran variedad de métodos basados en distintas técnicas instrumentales para la determinación de elementos. La Espectroscopia de Absorción Atómica (AAS) es una de las técnicas más empleadas para la cuantificación de elementos y se ha ganado la aceptación del mundo académico e industrial debido a su robustez, buena precisión y selectividad, siendo de uso habitual en miles de laboratorios de todo el mundo dedicados al análisis de muy diferentes tipos de muestras [6-11]. Además, en los últimos años se han realizado avances en el uso de la AAS como herramienta analítica para cuantificar la concentración y el tamaño de NPs metálicas [12, 13]. En función del elemento a determinar y de su concentración en la muestra se pueden emplear diferentes modos de atomización: en llama (FAAS); electrotérmica en horno de grafito (GFAAS), y con generación de hidruros o atomización en vapor frío (CVG) [11].

### **I.2. EVOLUCIÓN DE LA ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA**

Los orígenes de la AAS se remontan al principio del siglo XIX, cuando Wollaston, mientras reproducía el experimento de Newton sobre la descomposición del espectro de la luz solar, observa una serie de líneas oscuras en un espectro que se había considerado siempre continuo. A mediados del mismo siglo, Kirchhoff y Bunsen estudiaron la naturaleza de estas líneas y establecieron los fundamentos básicos de los procesos de absorción y emisión, lo que marcó el principio del análisis espectral. Todas estas investigaciones se llevaron a cabo empleando una fuente continua de radiación, es decir una “luz blanca”, para medir el proceso de absorción, pues éstas eran las únicas disponibles en la época. En el último tercio del siglo XIX ya existían instrumentos de AAS que empleaban lámparas eléctricas como fuentes continuas de radiación. Con estos equipos se podía llevar a cabo la identificación de los elementos presentes en una muestra a partir de sus espectros de absorción atómica.

Cuando en la primera mitad del siglo XX, los químicos y espectroscopistas de la época comenzaron a emplear los espectros atómicos no solo con fines cualitativos, sino para la cuantificación de elementos, la Espectroscopia de Emisión Atómica parecía más adecuada que la AAS, ya que en ese momento resultaba más sencillo cuantificar la radiación, por pequeña que esta fuera, sobre un fondo continuo transparente (base de

las técnicas de emisión), que cuantificar la pequeña pérdida de intensidad producida por los procesos de absorción atómica respecto a la intensidad de radiación total emitida por una fuente continua.

La aplicación analítica de la AAS como técnica de cuantificación tuvo que esperar hasta mediados del siglo XX para convertirse en una realidad. A principios de la década de los 50, Alan Walsh llegó a la conclusión de que las pobres prestaciones de la AAS cuando se empleaban fuentes continuas de radiación se debían a la necesidad de emplear monocromadores con suficiente poder de resolución para separar las estrechas líneas de emisión de estas fuentes. Puesto que no disponía de un mejor monocromador, propuso el empleo de fuentes de líneas, como las lámparas de cátodo hueco cuyo cátodo está construido del elemento del que se precise medir la absorción [14]. De esta forma, incluso utilizando monocromadores de baja resolución es posible separar de forma satisfactoria las líneas características del elemento del resto de las emitidas por la fuente, siendo el mejor monocromador la propia fuente de líneas.

Los primeros equipos de AAS empleaban como fuente de atomización llamas de diferente composición (acetileno-aire, óxido nitroso-acetileno...). A lo largo de las décadas siguientes, varios investigadores entre los que cabe destacar a L'Vov y Massmann trabajaron en el diseño de sistemas de atomización alternativos. A raíz de estas investigaciones, a principios de la década de los 70 se comercializa el primer equipo para AAS con atomización electrotérmica. Estos primeros atomizadores electrotérmicos empleaban hornos de grafito de calentamiento longitudinal en los que se depositaba la muestra, y cuya velocidad de calentamiento era relativamente lenta ( $500-800\text{ }^{\circ}\text{C s}^{-1}$ ). Bajo estas condiciones, el calentamiento del tubo de grafito no se produce de manera uniforme, existiendo un gradiente de temperaturas a lo largo del tubo. De este modo, a pesar de las buenas sensibilidades que ofrecía la nueva técnica, la mayoría de los trabajos que se publican durante esos primeros años lamentan la alta variabilidad producida en la sensibilidad, así como la aparición de un gran número de interferencias [11, 15].

Durante años se siguió investigando en el desarrollo de nuevos sistemas de atomización electrotérmica, capaces de controlar de manera precisa las temperaturas aplicadas durante el proceso de análisis y reducir las variaciones de temperatura a lo largo del tubo de grafito. El desarrollo de hornos de grafito de calentamiento transversal a finales de la década de los 80, y la generalización de los principios STPF (de sus siglas en inglés “*Stabilize Temperature Platform Furnace*”) introducidos por Slavin *et al.* en 1981 [16], establecen las condiciones óptimas para la atomización isotérmica del analito, permitiendo reducir las interferencias y mejorando la precisión de la técnica.

Paralelamente a estas investigaciones, muchos investigadores trabajaron en el diseño de nuevos sistemas de atomización y de introducción de muestras específicos para el análisis de muestras sólidas, desarrollándose un gran número de tubos, plataformas y “cups” de diferentes formas y tamaños [17].

### **I.2.1. AAS: de las fuentes de líneas a los equipos de alta resolución y fuente continua**

La mayoría de los instrumentos para AAS disponibles en el mercado, todavía a día de hoy están basados en el uso de fuentes de líneas. Esto limita la AAS a ser una técnica monoelemental al requerir una fuente de radiación distinta para cada elemento que se precise determinar. Este hecho siempre ha sido considerado uno de los principales inconvenientes de la AAS en comparación con la Espectroscopia de Plasma de Acoplamiento Inductivo con detectores de Emisión Óptica o de Masas (ICP-OES o ICP-MS), capaces de realizar determinaciones multielementales.

A pesar de que la AAS con fuente de líneas (LS AAS) ha sido la técnica dominante durante las últimas cinco décadas, hubo investigadores que nunca abandonaron la idea de desarrollar un equipo para AAS que emplease una fuente continua de radiación. Durante años, se trabajó en encontrar una fuente estable y capaz de emitir radiación de alta intensidad en un amplio intervalo espectral, así como en el desarrollo de sistemas monocromadores de alta resolución capaces de proporcionar la suficiente resolución para llevar a cabo la separación de la radiación emitida por este tipo de fuentes, y de sistemas de detección apropiados [18]. El desarrollo de la AAS con fuente continua (CS



AAS) experimentó un gran impulso gracias a las investigaciones llevadas a cabo por Keliher y Wohlers que utilizaron por primera vez una red de difracción Echelle logrando una resolución muy superior a la que alcanzaban los sistemas convencionales en ese momento [19] y a los avances logrados por el grupo de Harnly que propusieron el uso de fuentes pulsadas y detectores de fotodiodos en “array” [20-22].

En 1996 el grupo de Becker-Ross logró construir el primer espectrofotómetro para AAS de alta resolución y fuente continua (HR-CS AAS). Dicho sistema estaba compuesto por una lámpara de xenón de arco corto capaz de proporcionar radiación de alta intensidad en la región UV-vis, un sistema óptico capaz de dispersar la radiación electromagnética en dos etapas (mediante el uso primero de un prisma y posteriormente una rejilla Echelle) y un dispositivo de carga acoplada (CCD) como detector [23-25]. Fruto de estas investigaciones en 2004 se comercializó el primer espectrofotómetro de HR-CS AAS.

## **I.3. ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA DE ALTA RESOLUCIÓN Y FUENTE CONTINUA (HR-CS AAS)**

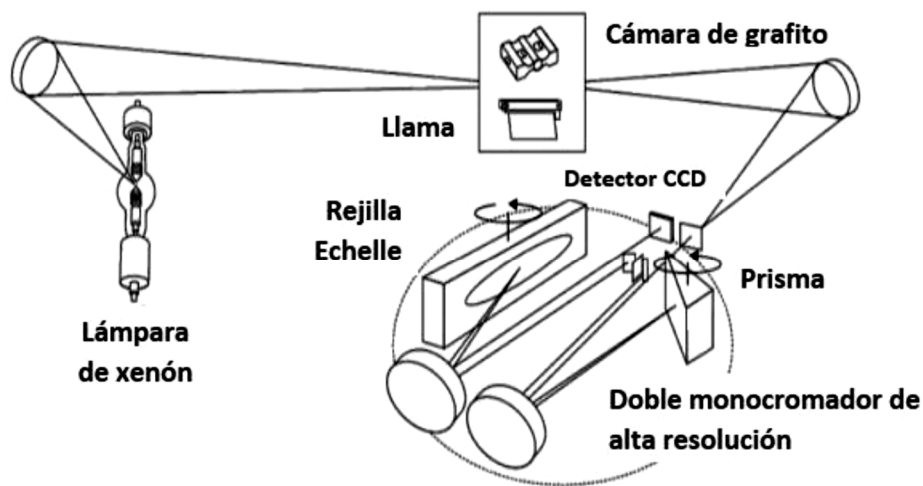
### **I.3.1. Características instrumentales de los espectrofotómetros HR-CS AAS**

La instrumentación para HR-CS AAS está formada por los mismos componentes básicos que los instrumentos LS AAS: fuente de radiación, sistema de atomización, selector de longitudes de onda y sistema de detección. Un esquema de la configuración instrumental HR-CS AAS se muestra en la **Figura I.1**. Las características principales de cada uno de estos componentes se describen en esta sección [26-29].

#### *- Fuente de radiación:*

Las fuentes continuas existentes cuando el grupo de Becker-Ross comenzó a desarrollar esta instrumentación, como las lámparas de deuterio o las lámparas de xenón, no proporcionaban la energía suficiente en la región del UV lejano por debajo de los 250 nm, zona en la que absorben muchos de los elementos de interés para las determinaciones analíticas por AAS. Para resolver este problema, se diseñó una lámpara

de xenón de arco corto que trabaja a alta presión en el denominado modo “hot spot”. En contraste con la difusa forma de arco que generan las lámparas de xenón comunes, gracias a la geometría especial del electrodo y a las altas presiones de estas lámparas, se genera un pequeño punto caliente o plasma de unos 0.2 mm cerca de la superficie del cátodo que alcanza una temperatura de unos 10000 K, lo que da lugar a una intensidad de emisión significativamente mayor a la obtenida con las lámparas de xenón convencionales (al menos 10 veces mayor). Estas lámparas permiten emplear longitudes de onda entre 185 y 900 nm, con una intensidad de emisión unas 100 veces superior a la que proporciona una lámpara de cátodo hueco. De esta manera, todas las líneas analíticas principales y secundarias están disponibles en cualquier momento sin restricción.



**Figura I.1.** Esquema de los principales componentes de un espectrofotómetro de HR-CS AAS. Fuente: Manual de usuario *ContrAA 700*. Reproducida y adaptada con permiso de *Inycom* y *Analytik Jena*.

- *Sistema de atomización:*

Los espectrofotómetros de HR-CS AAS están equipados con el mismo tipo de atomizadores que podemos encontrar en un instrumento para LS AAS: un atomizador de llama (F), un atomizador electrotérmico con horno de grafito (GF), y un atomizador por generación de hidruros o atomización en vapor frío (CVG).

- *Selector de longitudes de onda:*

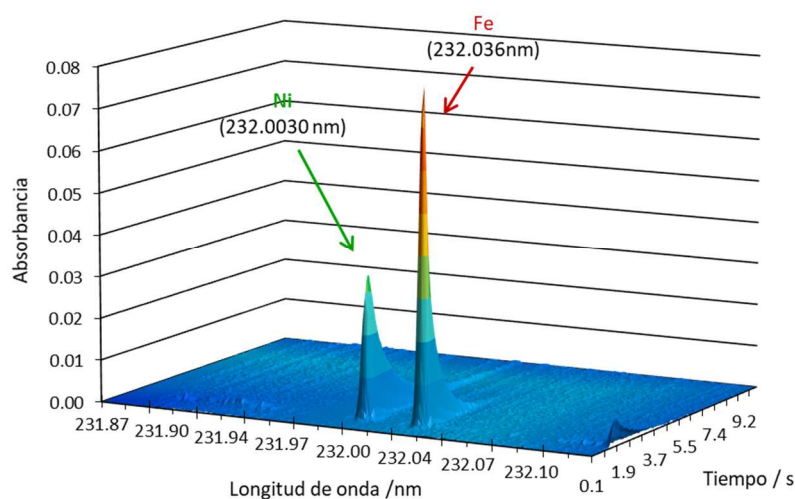
El uso de una fuente continua en AAS requiere del diseño de una instrumentación con un sistema óptico significativamente diferente al de los espectrofotómetros de LS AAS. Cuando se emplea una lámpara continua el poder de resolución que debe tener el sistema óptico debe ser aproximadamente de  $\lambda/\Delta\lambda \approx 150000$  (dos órdenes de magnitud superior al necesario en LS AAS) a fin de proporcionar un ancho de banda espectral que sea la mitad de la anchura de las líneas de absorción atómica. De este modo, se evita la aparición de interferencias espectrales debidas a la superposición de líneas cercanas de otros elementos y se puede asegurar una sensibilidad y una selectividad comparable a la obtenida en LS AAS. Con el fin de obtener la resolución necesaria para la CS AAS, se diseñó un monocromador de alta resolución compacto basado en un sistema doble de dispersión formado por un prisma pre-monocromador y una red de difracción Echelle (**Figura I.1**). En primer lugar, la radiación previamente focalizada hacia la rendija de entrada se dirige mediante espejos parabólicos hacia el prisma pre-monocromador donde se preselecciona y realiza un primer fraccionamiento del espectro. Mediante la rotación del prisma, únicamente la pequeña fracción del espectro que contiene la línea analítica de interés, se dirige hacia el segundo monocromador, una red de difracción tipo Echelle donde se termina de separar la radiación antes de llegar al detector. De este modo, los equipos comerciales pueden distinguir intervalos de longitudes de onda con resoluciones de  $\lambda/\Delta\lambda \approx 145000$ , lo que proporciona un ancho de banda espectral por píxel o elementos de imagen del detector, de entre 0.0013 nm y 0.006 nm en función de la longitud de onda de análisis. Con el fin de garantizar la posición de la longitud de onda durante el análisis, el monocromador se autocalibra con ayuda de una lámpara interna de neón, obteniéndose una precisión de  $\pm 0.0002$  nm.

### - *Sistema de detección:*

Gran parte del potencial metodológico de la HR-CS AAS recae en el sistema de detección. Los requisitos que deben ofrecer estos detectores, con el fin de explotar plenamente el potencial de esta técnica son poseer un alto rendimiento cuántico desde el UV lejano al IR cercano, permitir una lectura rápida y con bajo ruido, tener una alta capacidad de saturación, así como alta resolución espacial, todo ello con un coste moderado. La mejora de los detectores de matriz de estado sólido como los CCD ha permitido el desarrollo de la técnica. Un detector CCD convencional de unos 500 píxeles o elementos de imagen, permite llevar a cabo una lectura rápida de más de 1000 espectros por segundo, una capacidad de saturación de entre  $10^5$  y  $10^6$  electrones por píxel con un ruido muy bajo.

El detector CCD que se emplea en los equipos comerciales de HR-CS AAS consiste en una matriz lineal de 588 píxeles o elementos de imagen, de los cuales 200 se utilizan para fines de análisis, mientras el resto se emplean para llevar a cabo correcciones internas. Dado que todos estos píxeles se “iluminan y leen” de manera independiente y simultánea, realmente es como si el sistema dispusiese de 200 detectores, lo que permite monitorizar no solo la línea de interés sino también visualizar una pequeña parte de su entorno espectral. Esto significa que, a diferencia de los espectros obtenidos con los equipos de LS AAS, ahora podemos obtener una visualización tridimensional de la absorbancia, el tiempo y la longitud de onda.

La ventana espectral registrada por los 200 píxeles empleados por el detector con fines analíticos, puede variar entre 0.2 nm y 1.0 nm aproximadamente, en función de la longitud de onda de trabajo. A modo de ejemplo, en la **Figura 1.2** se muestra el espectro tridimensional (absorbancia frente a la longitud de onda y el tiempo) obtenido para la región espectral centrada en la línea principal de Ni a 232.003 nm en cuya vecindad aparece una línea secundaria de Fe a 232.036 nm. Como puede observarse es posible monitorizar de manera simultánea una ventana espectral de entorno a unos 0.2 nm y gracias a la elevada resolución que se consigue mediante esta instrumentación (aproximadamente 1.3 pm por píxel en la zona espectral de medida), las líneas de cada uno de estos elementos aparecen perfectamente separadas.



**Figura I.2.** Señal tridimensional de la absorbancia frente a la longitud de onda y el tiempo registrada para un patrón multielemental de 0.8 ng de Ni y 24 ng de Fe en la región espectral centrada en 232.003 nm. Volumen de inyección: 20  $\mu$ L.

La posibilidad de visualizar no solo la línea analítica de interés sino también una pequeña parte de su entorno espectral, nos aporta información extra que puede ser de gran utilidad a la hora de llevar a cabo el desarrollo de nuevas metodologías analíticas. Por ejemplo, considerando el espectro mostrado en la **Figura I.2**, se ha desarrollado un método para la determinación simultánea de Ni y Fe [30].

### I.3.2. Ventajas y posibilidades metodológicas de la HR-CS AAS

Las ventajas instrumentales que la HR-CS AAS ofrece sobre la clásica LS AAS son indiscutibles si comparamos y examinamos las características de los componentes instrumentales de ambos sistemas. Las principales potencialidades y posibilidades metodológicas de la técnica HR-CS AAS derivan de la mayor intensidad de la fuente de radiación, el alto poder de resolución y la capacidad de visualizar y registrar una pequeña región de longitudes de onda alrededor de la línea de análisis. Hasta la fecha, las principales ventajas de la HR-CS AAS han sido evaluadas y aplicadas en diversos trabajos y revisiones bibliográficas [26-29, 31-34].

### - *Empleo de una única fuente de radiación:*

La fuente de radiación continua utilizada por los espectrofotómetros de HR-CS AAS permite el uso de cualquier longitud de onda entre 185 nm y 900 nm. Este hecho supone una ventaja práctica muy importante para los laboratorios de análisis respecto a la LS AAS, puesto que elimina la necesidad de adquirir y acumular lámparas específicas para cada elemento, algunas de las cuales sólo se usan en contadas ocasiones. Además, permite explorar elementos para los cuales no existen lámparas de cátodo hueco (como por ejemplo algunos elementos no metálicos). Por otro lado, debido a la alta intensidad que proporciona esta lámpara continua de xenón entre 185-900 nm, todas las líneas de absorción (principales y secundarias) que se encuentran en dicho intervalo espectral pueden utilizarse para el análisis. De este modo, es posible emplear líneas secundarias de menor sensibilidad, que normalmente no eran accesibles con las lámparas de cátodo hueco debido a la débil intensidad de emisión de estas fuentes y la pobre relación señal-ruido que proporcionan.

### - *Mejora de la estabilidad de la señal y los límites de detección:*

Como se ha comentado en el *Apartado 1.3.1*, el detector de matriz CCD permite la monitorización simultánea de 200 píxeles o sectores de longitudes de onda. Del total de los píxeles registrados, generalmente sólo se emplean entre 3 y 5 para realizar la determinación analítica. Los restantes quedan libres para ser empleados en la corrección de cualquier evento espectral no deseado que afecte por igual a todos los píxeles o región del espectro, como posibles fluctuaciones en la intensidad de la lámpara, cambios temporales en la transmisión de la fase gaseosa y/o pequeños cambios en la transmisión del atomizador o en la sensibilidad del detector.

Mediante la selección automática de un conjunto de píxeles de referencia cuya absorbancia sea nula, puede establecerse una línea base estable. Este hecho, en combinación con la mayor intensidad de radiación que proporciona la lámpara de xenón en comparación con las de cátodo hueco, hace que sea posible obtener señales con bajos niveles de ruido, mejorando los límites de detección y cuantificación entre tres y cinco veces con respecto a las fuentes de cátodo hueco dependiendo del elemento.

Con esta instrumentación es posible además llevar a cabo una corrección más eficiente del fondo dado que la absorción atómica específica y la absorción de fondo se miden simultáneamente. De este modo, incluso fondos altos y rápidamente cambiantes pueden corregirse con mayor facilidad. Esta capacidad es especialmente relevante cuando se analizan muestras sólidas de manera directa donde los efectos de matriz son más pronunciados [35,36].

- *Control de la sensibilidad y ampliación del intervalo de respuesta lineal:*

Uno de los inconvenientes más conocidos de la LS AAS, es el pequeño intervalo de respuesta lineal que presentan, donde rara vez se superan los dos órdenes de magnitud. Este problema no es muy crítico en el caso del análisis de muestras líquidas, ya que las muestras se pueden diluir con facilidad, pero es de gran importancia si el análisis se realiza directamente sobre muestras sólidas.

Con los espectrofotómetros de HR-CS AAS, como cada píxel del detector CCD actúa de manera independiente, es posible añadir tantos píxeles o sectores de longitudes de onda como se desee para la cuantificación de las señales de absorbancia. Habitualmente con fines cuantitativos se emplean los 3 o 5 píxeles centrales del perfil de la línea de análisis. Sin embargo, utilizando un número menor de píxeles o seleccionando los píxeles laterales de la línea en lugar de los centrales para la cuantificación de la señal, podemos disminuir la sensibilidad y ampliar el intervalo de respuesta lineal. Este proceso tiene la ventaja de poder llevarse a cabo sin necesidad de cambiar las condiciones de trabajo o de realizar ninguna medida adicional. De este modo, se pueden obtener varias curvas de trabajo con sensibilidades muy diferentes permitiendo expandir el intervalo lineal hasta 5 órdenes de magnitud [37].

- *Mejora en la capacidad de identificación y corrección de interferencias espectrales:*

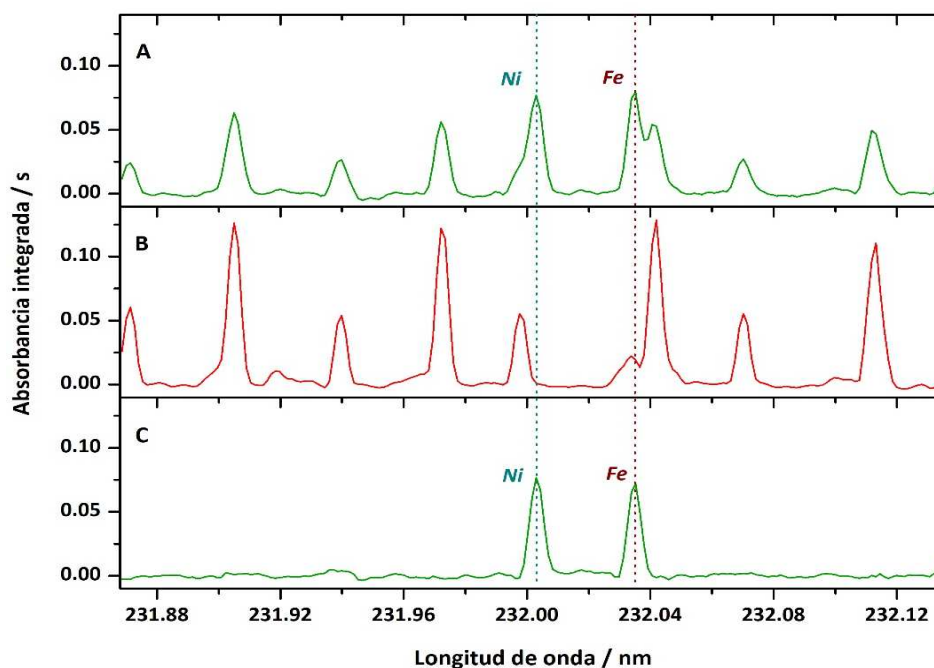
Además de la posibilidad de corregir de manera automática los eventos espectrales continuos que ocurren durante la medida, la monitorización simultánea de un pequeño intervalo espectral alrededor de la línea de análisis, nos brinda la capacidad de detectar e identificar con mayor facilidad el origen de cualquier interferencia espectral que se produzca en el análisis, provocada por el solapamiento de líneas

elementales muy cercanas o espectros moleculares de estructura hiperfina. No suele ser habitual que dos líneas elementales interfieran entre sí, aunque puede darse el caso. Por ejemplo, en la determinación de aluminio en fluidos para hemodiálisis con concentraciones de hierro extremadamente elevadas, la línea del hierro a 309.278 nm interfiere en la medida de la absorbancia del aluminio en una de sus líneas más sensibles (309.271 nm) [38].

Las interferencias causadas por el solapamiento de la línea del analito con espectros moleculares suelen ser más habituales. Este tipo de interferencias se producen debido a la absorción de radiación por parte de moléculas diatómicas, lo que provoca la excitación de sus modos rotacionales y vibracionales, causando la aparición de espectros moleculares. Estas moléculas diatómicas se forman bien a partir de elementos presentes en la matriz de la muestra (como SiO, CS, PO o NO), o a partir de los componentes principales de la llama empleada en el proceso de atomización (como OH, NO o CN), y que son estables a las elevadas temperaturas de atomización. La detección y eliminación de estas interferencias es por tanto muy importante sobre todo en el análisis de muestras sólidas, donde al no realizarse un ataque químico de la muestra, todos los componentes de la matriz están presentes durante el análisis.

Estas interferencias espectrales, difíciles de corregir con los sistemas de corrección convencionales, pueden ahora ser eliminadas matemáticamente mediante la aplicación de algoritmos de corrección de mínimos cuadrados (LSBC). El uso de algoritmos LSBC para la corrección de interferencias espectrales es una práctica que comúnmente se emplea en las técnicas de Espectroscopia de Emisión Óptica (OES), y que ahora también se puede aplicar en HR-CS AAS. Para ello se requiere identificar la especie o especies interferentes y registrar sus espectros en la zona de trabajo, creando así un espectro de referencia a partir del cual se substraen de manera proporcional las señales del interferente del espectro de la muestra. A modo de ejemplo, en la **Figura I.3** se muestra la eficacia de este procedimiento para la corrección de interferencias espectrales moleculares. Este ejemplo corresponde a una de las aplicaciones desarrolladas en nuestro grupo de investigación donde se llevó a cabo la determinación directa de Fe y Ni en muestras sólidas de agujas de pino y líquenes empleando HR-CS GFAAS [30].





**Figura 1.3.** Espectros de absorbancia integrados en el tiempo frente a la longitud de onda para el entorno espectral centrado en la línea de Ni a 232.003 nm. **(A)** Espectro para el material SRM 1575a, **(B)** espectro de referencia de SiO<sub>2</sub>, y **(C)** misma señal que la del espectro (A) tras la substracción del espectro de referencia (B) usando la corrección LSBC.

Como se puede ver en la **Figura 1.3A**, tras la atomización de una alícuota de muestra del material de referencia SRM 1575a (agujas de pino para la determinación de elementos traza), además de las correspondientes señales de Ni y Fe, pueden apreciarse una serie de señales de fondo estructurado que solapan con estas líneas de análisis, impidiendo la correcta cuantificación de estos elementos. Estas señales de fondo se corresponden muy bien con las obtenidas cuando se vaporiza una alícuota de SiO<sub>2</sub>, confirmando que la interferencia era debida a la formación y posterior absorción de las moléculas de SiO en el tubo de grafito (**Figura 1.3B**). Como puede apreciarse en la **Figura 1.3B** dada la alta resolución de estos equipos las bandas del espectro de absorción de SiO presentan una anchura similar a la de una línea atómica, y comúnmente son denominadas “líneas” moleculares. Tras la aplicación del algoritmo de corrección LSBC (**Figura 1.3C**) se consiguió obtener un espectro completamente limpio, libre de interferencias, en el que sólo se apreciaban las líneas atómicas de Ni y Fe, pudiéndose llevar a cabo la correcta cuantificación de ambos analitos.

En la bibliografía pueden encontrarse otros ejemplos que muestran la eficacia de estas correcciones [39-42].

### - *Posibilidad de determinar elementos no metálicos:*

La determinación de elementos no metálicos como F, Cl, N o S, siempre ha supuesto un desafío para la AAS, ya que la mayoría de las líneas atómicas principales para estos elementos se localizan en la región del espectro del UV lejano por debajo de los 190 nm, región espectral que no es accesible utilizando la instrumentación para AAS disponible actualmente.

Como alternativa, ya en las décadas de los 70 y 80, se propuso para la cuantificación de este tipo de elementos el uso de métodos indirectos [43], o métodos basados en la formación de moléculas diatómicas estables en la llama o en los hornos de grafito [44-46]. Estas moléculas suelen presentar bandas de absorción debidas a transiciones electrónicas rotacionales y vibracionales en la zona espectral del UV-vis, pudiendo emplearse la absorción de estas transiciones como señal analítica. Sin embargo, los equipos de LS AAS muestran limitaciones para la cuantificación de este tipo de espectros debido principalmente a la baja resolución de sus monocromadores, que provoca que estas transiciones moleculares suelen aparecer como bandas anchas de absorción.

Los equipos de HR-CS AAS siguen sin proporcionar la suficiente energía en la zona del espectro del UV lejano como para hacer viable la utilización de las líneas atómicas de los elementos no metálicos. Sin embargo, gracias a la mayor resolución y a la capacidad para registrar simultáneamente una pequeña región espectral, es posible diferenciar cada una de las transiciones de las moléculas diatómicas empleadas para determinar estos elementos. De este modo, en lugar de una banda ancha como ocurre en LS AAS, con esta técnica los espectros moleculares suelen registrarse como una serie de bandas estrechas o “líneas” moleculares [47-49]. La posibilidad de emplear los espectros moleculares para la determinación de elementos no metálicos ha sido ampliamente estudiada y aplicada en la última década [50-56].

- *Mayor capacidad de análisis multielemental:*

Una de las principales desventajas de la LS AAS y al menos en parte fuerza impulsora del desarrollo de la HR-CS AAS es el escaso potencial de la AAS convencional para llevar a cabo la determinación multielemental simultánea.

La llegada de los equipos de HR-CS AAS pareció abrir la puerta hacia la AAS multielemental. Sin embargo, dicha capacidad está actualmente muy limitada por las características de sus detectores CCD. Como ya se ha comentado, estos equipos alcanzan resoluciones de entre 1 y 6 pm por píxel o elementos de imagen del detector, siendo el ancho de banda que se puede monitorizar de manera simultánea de menos de 1 nm del espectro (0.2-0.5 nm en la región UV), lo que es demasiado estrecho como para que la determinación multielemental de manera simultánea sea realmente factible en la mayoría de los casos. Alcanzar el mismo nivel de resolución, a la par de controlar la totalidad del espectro UV-vis, requeriría un detector con cientos de miles de píxeles, con un sistema de lectura rápida, y el diseño de un nuevo policromador. Dicho dispositivo no es comercialmente viable actualmente, ya que desarrollar y construir tal sistema de detección encarecería en exceso la técnica. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que es técnicamente posible monitorizar simultáneamente una porción más amplia del espectro manteniendo la resolución requerida en el análisis empleando un novedoso sistema basado en una lámpara de xenón impulsada por láser y un espectrógrafo modular simultáneo tipo Echelle, denominado MOESES [57]. Estas investigaciones pueden suponer un paso esencial para que en un futuro el análisis mediante AAS llegue a ser realmente simultáneo.

A pesar de que actualmente la HR-CS AAS no pueda considerarse una técnica de determinación multielemental simultánea, existen situaciones en las que pueden aparecer más de una línea de absorción en el intervalo espectral que cubre el detector. Algunos elementos como Cr, Fe, Ni y Pt, son muy ricos en líneas atómicas, de manera que es probable encontrar alguna de sus líneas de absorción dentro una misma ventana espectral [26]. Cuando las líneas atómicas registradas en la ventana pertenecen a un mismo elemento (multipletes), estas líneas pueden emplearse para mejorar los parámetros analíticos de la metodología. La capacidad de registrar separadamente cada

línea de un multiplete nos brinda la posibilidad de mejorar los límites de detección si se combinan las señales de varias de estas líneas con sensibilidades similares, o de ampliar el intervalo lineal de trabajo si las líneas registradas presentan distintas sensibilidades [36]. Es interesante señalar que esta situación es muy diferente a la que normalmente se suele encontrar al usar equipos de LS AAS, donde cuando se presenta esta situación, en realidad se registra la señal combinada de todas las líneas del multiplete lo que a menudo conduce a un empobrecimiento de la linealidad.

En ocasiones, es posible determinar de manera simultánea más de un analito si las líneas de elementos diferentes aparecen en la misma zona de medida. Sin embargo, para llevar a cabo una determinación verdaderamente simultánea no solamente es imprescindible que dos o más elementos presentes líneas próximas, también debe tenerse en cuenta que los analitos de interés deben presentar un comportamiento térmico similar en las condiciones de análisis y que la relación de sensibilidades de las líneas atómicas de estos elementos debe concordar con la relación de concentraciones de estos analitos en las muestras. A pesar de estas limitaciones, en la bibliografía pueden encontrarse varios trabajos que demuestran la capacidad de la técnica para llevar a cabo la determinación simultánea de más de un elemento [58-63]. De hecho, dicha capacidad puede apreciarse en el ejemplo anteriormente expuesto en las **Figuras I.2 y I.3**, donde puede verse como esta técnica se aplicó con éxito para llevar a cabo la determinación simultánea de Ni y Fe en muestras biológicas como hojas de pinos y líquenes [30].

Por otro lado, cuando el proceso de atomización se lleva a cabo empleando un atomizador electrotérmico y el comportamiento térmico de los analitos es diferente, es posible llevar a cabo la determinación secuencial de estos analitos en la misma alícuota de muestra, a pesar de que las líneas de absorción de estos elementos no estén en la misma ventana espectral. Para ello, es necesario tener en cuenta que, a la temperatura de atomización del elemento más volátil el analito con menor volatilidad debe ser térmicamente estable para evitar su pérdida antes de llevar a cabo su determinación. En estos casos, es posible atomizar y medir en primer lugar el elemento más volátil y a continuación, cambiar la longitud de onda de medida y aumentar la temperatura para llevar a cabo la atomización del elemento menos volátil. De este modo, la determinación

de cada uno de los elementos puede llevarse a cabo con el programa de temperatura óptimo y la línea con la sensibilidad más apropiada, sin la necesidad de emplear condiciones de compromiso [64-67].

Una opción muy interesante para expandir el número de elementos que se pueden determinar en una misma alícuota de muestra es combinar el análisis simultáneo y secuencial. De este modo, si por ejemplo un conjunto de elementos volátiles presenta líneas próximas en la misma ventana espectral, éstos pueden determinarse simultáneamente en una primera etapa de medida, y a continuación y tras llevar a cabo un cambio de longitud de onda y aumentar la temperatura de atomización se podría realizar la determinación simultánea de un segundo grupo de elementos con líneas de análisis lo suficientemente próximas y diferente comportamiento térmico. Esta estrategia ha sido empleada por ejemplo por Welz *et al.* [68] para llevar a cabo la determinación de Cd, Cr, Fe y Al en muestras de suelo, realizándose en primer lugar la determinación de Cd y posteriormente de manera simultánea la determinación de Cr, Al y Fe. En un reciente trabajo de Teixeira *et al.* [69] se ha determinado secuencialmente Pb, con Cu y Fe en bioetanol.

La capacidad para realizar una determinación multielemental es muy diferente si se trabaja con atomización en llama. En este caso, se puede realizar una determinación multielemental secuencial de manera rápida, dado que cualquier longitud de onda entre 185 y 900 nm es ahora accesible gracias al uso de una única fuente de radiación y a que el transporte de la muestra al atomizador, el proceso de atomización y la medida de absorbancia suele llevarse a cabo en pocos segundos. El cambio de longitudes de onda requiere menos de un segundo y la composición de la llama para cada analito puede establecerse automáticamente en 3-4 segundos, lo que permite llevar a cabo los análisis empleando las condiciones óptimas de medida. En la bibliografía se pueden encontrar diversos trabajos donde se aplica el análisis secuencial rápido mediante HR-CS FAAS para la determinación de metales y no metales en muestras de distinta naturaleza [70-74].

### - *Uso de la calibración por patrón interno:*

Otra posibilidad muy interesante que nos brinda la HR-CS AAS es el uso de patrones internos como método de calibración, estrategia ampliamente empleada en otras técnicas atómicas como la ICP-OES y ICP-MS para compensar posibles variaciones durante el procedimiento de medida. En el pasado, la incapacidad de la AAS para medir más de un elemento de forma simultánea o secuencial rápida limitaba el uso de la calibración empleando un patrón interno.

El uso de la calibración por patrón interno se ha empleado principalmente en HR-CS FAAS como alternativa a los métodos de adición estándar para compensar variaciones en la eficacia de transporte y atomización cuando se quieren analizar muchas muestras que presentan una composición y unos parámetros físicos como viscosidad y/o tensión superficial muy variables entre sí. Empleando esta estrategia de calibración es posible minimizar estas interferencias, sin la necesidad de llevar a cabo una calibración para cada tipo de muestra minimizándose el tiempo para llevar a cabo el análisis [75-78]. En nuestro grupo de investigación hemos desarrollado recientemente un método para el análisis en bebidas con diferente grado alcohólico y contenido de azúcares, utilizando calibración por patrón interno [78]. Además, también podemos encontrar en la bibliografía varios trabajos donde se emplea la calibración por patrón interno para mejorar la precisión del análisis y compensar efectos de matriz empleando HR-CS GFAAS [63, 79, 80].

Algunas de las ventajas y capacidades instrumentales discutidas en este capítulo han sido utilizadas en esta tesis para desarrollar diferentes metodologías analíticas que permitan llevar a cabo el análisis rápido de muestras de interés en los ámbitos ambiental, alimentario y clínico.

## I.4. BIBLIOGRAFÍA

- [1] R. A. McIntyre, *Common nano-materials and their use in real world applications*, Sci. Prog. 95 (2012) 1-22.
- [2] M. E. Vance, T. Kuiken, E. P. Vejerano, S. P. McGinnis, M. F. Hochella, D. Rejeski, M. S. Hull, *Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory*, Beilstein J. Nanotechnol. 6 (2015) 1769-1780.
- [3] S. J. Klaine, P. J. J. Alvarez, G. E. Batley, T. F. Fernandes, R. D. Handy, D. Y. Lyon, S. Mahendra, M. J. Mclaughlin, J. R. Lead, *Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects*, Environ. Toxicol. Chem. 27 (2008) 1825-1851.
- [4] S. Armenta, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Green Analytical Chemistry*, Trends Anal. Chem. 27 (2008) 497-511.
- [5] A. Galuszka, Z. Migaszewki, J. Namiesnik, *The 12 principles of green analytical chemistry and the significance mnemonic of green analytical practices*, Trends Anal. Chem. 50 (2013) 78-84.
- [6] E. M. Kroukamp, T. Wondimu, P. B. C. Forbes, *Metal and metalloid speciation in plants: overview, instrumentation, approaches and commonly assessed elements*, Trends Anal. Chem. 77 (2016) 87-99.
- [7] V. Balaram, *Recent advances in the determination of elemental impurities in Pharmaceuticals - status, challenges and moving frontiers*, Trends Anal. Chem. 80 (2016) 83-95.
- [8] D. L. Tsalev, *Atomic absorption spectrometry (flame, electrothermal, vapour generation) in environmental, biological and food analysis*, en *Environmental Heavy Metal Pollution and Effects on Child Mental Development: Risk Assessment and Prevention Strategies*, L. I. Simeonov et al. (eds.) Springer (2011) 171-202.
- [9] J. R. Bacon, O. T. Butler, W. R. L. Cairns, J. M. Cook, R. Mertz-Kraus, J. F. Tyson, *Atomic spectrometry update – a review of advances in environmental analysis*, J. Anal. At. Spectrom. 34 (2019) 9-58.

- [10] A. Taylor, N. Barlow, M. P. Day, S. Hill, N. Martine, M. Patriarca, *Atomic Spectrometry Update: review of advances in the analysis of clinical and biological materials, foods and beverages*, J. Anal. At. Spectrom. DOI: 10.1039/C9JA90004G.
- [11] B. Welz, M. Sperling, *Atomic Absorption Spectrometry*, third ed. Wiley-VCH, Weinheim, 1999.
- [12] F. Gagné, P. Turcotte, C. Gagnon, *Screening test of silver nanoparticles in biological samples by graphite furnace-atomic absorption spectrometry*, Anal. Bioanal. Chem. 404 (2012) 2067-2072.
- [13] T. Panyabut, N. Sirirat, A. Siripinyanond, *Use of electrothermal atomic absorption spectrometry for size profiling of gold and silver nanoparticles*, Anal. Chim. Acta 1000 (2018) 75-84
- [14] A. Walsh, *The application of atomic absorption spectra to chemical analysis*, Spectrochim. Acta B 7 (1955) 108-117.
- [15] D. J. Butcher, J. Sneddon, *A practical guide to Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*, John Wiley & Son, Nueva York, 1998.
- [16] W. Slavin, D. C. Manning, G. R. Carnrick, *The stabilized temperature platform furnace*, At. Spectrosc. 2 (1981) 137-145.
- [17] U. Kurfürst, *Solid sample analysis: Direct and slurry sampling using GF-AAS and ETV-ICP*, Springer, Berlin, 1998
- [18] H. Becker-Ross, S. Florek, U. Heitmann, M.D. Huang, M. Okruss, B. Radziuk, *Continuum source atomic absorption spectrometry and detector technology: A historical perspective*, Spectrochim. Acta B 61 (2006) 1015-1030.
- [19] P. N. Keliher, C. C. Wohlers, *High Resolution Atomic Absorption Spectrometry Using an Echelle Monochromator*, Anal. Chem. 46 (1974) 682-687.
- [20] T. C. O' Haver, J. D. Messman, *Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry*, Prog. Analyt. Spectrosc. 9 (1986) 483-503.



- [21] J. M. Harnly, *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry using a Linear Photodiode Array and a Continuum Source*, *J. Anal. At. Spectrom.* 8 (1993) 317-324.
- [22] G. P. Moulton, T.C. O' Haver, J. M. Harnly, *Signal to Noise Ratios for Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry Using a Linear Photodiode Array to Monitor Sub-nanometer Wavelength Intervals*, *J. Anal. At. Spectrom.* 5 (1990) 145-150.
- [23] U. Heitmann, M. Schiitza, H. Becker-Ross, S. Florek, *Measurements on the Zeeman-splitting of analytical lines by means of a continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometer with a linear charge coupled device array*, *Spectrochim. Acta B* 51 (1996) 1095-1105.
- [24] J.M. Harnly, *The future of atomic absorption spectrometry: a continuum source with a charge coupled array detector*, *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 137-146.
- [25] H. Becker-Ross, S. Florek, U. Heitmann, R. Weisse, *Influence of the Spectral Bandwidth of the Spectrometer on the Sensitivity using Continuum Source AAS*, *Fresenius J. Anal. Chem.* 355 (1996) 300-303.
- [26] B. Welz, M. G. R. Vale, S. Florek, M. Okruss, M. D. Huang, H. Becker-Ross, *High-resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry – Theory and Applications*, en *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, R.A. Meyers (Ed.) John Wiley & Sons Ltd (2010).
- [27] B. Welz, H. Becker-Ross, S. Florek, U. Heitmann, *High-Resolution Continuum Source AAS, The Better Way to Do Atomic Absorption Spectrometry*, Wiley-VCH, Weinheim (2005).
- [28] B. Welz, S. Morés, E. Carasek, M. G. R. Vale, M. Okruss, H. Becker-Ross, *High-Resolution Continuum Source Atomic and Molecular Absorption Spectrometry—A Review*, *Appl. Spectrosc. Rev.* 45 (2010) 327-354.
- [29] B. Welz, H. Becker-Ross, S. Florek, U. Heitmann, M. G. R. Vale, *High-Resolution Continuum-source Atomic Absorption Spectrometry: What Can We Expect?*, *J. Braz. Chem.* 14 (2003) 220-229.

- [30] B. Gómez-Nieto, M. J. Gissera, M. T. Sevilla, J. R. Procopio, *Simultaneous and direct determination of iron and nickel in biological solid samples by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry*, *Talanta* 116 (2013) 860-865.
- [31] M. Resano, E. García-Ruiz, *High-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry: Is it as good as it sounds? A critical review*, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 323-330.
- [32] M. Resano, L. Rello, M. Flórez, M. A. Belarra, *On the possibilities of high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for the simultaneous or sequential monitoring of multiple atomic lines*, *Spectrochim. Acta B* 66 (2011) 321-328.
- [33] S. L. C. Ferreira, M. A. Bezerra, A. S. Santos, W. N. L. dos Santos, C. G. Novaes, O. M. C. de Oliveira, M. L. Oliveira, R. L. Garcia, *Atomic absorption spectrometry - A multi element technique*, *Trends Anal. Chem* 100 (2018) 1-6.
- [34] M. Resano, E. Garcia-Ruiz, M. Aramendia, M. A. Belarra, *Quo Vadis high-resolution continuum source atomic/molecular absorption spectrometry*, *J. Anal. At. Spectrom.* 34 (2019) 59-80.
- [35] D. L. G. Borges, A. F. da Silva, B. Welz, A. J. Curtius, U. Heitmann, *Determination of lead in biological samples by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry with direct solid sampling*, *J. Anal. At. Spectrom.* 21 (2006) 763-769.
- [36] M. Resano, J. Briceño, M. A. Belarra, *Direct determination of Hg in polymers by solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry: A comparison of the performance of line source and continuum source instrumentation*, *Spectrochim. Acta B* 64 (2009) 520-529.
- [37] U. Heitmann, B. Welz, D. L. G. Borges, F. G. Lepri, *Feasibility of peak volume, side pixel and multiple peak registration in high resolution continuum source atomic absorption spectrometry*, *Spectrochim. Acta B* 62 (2007) 1222-1230.

- [38] D. Bohrer, U. Heitmann, M. Huang, H. Becker-Ross, S. Florek, B. Welz, D. Bertagnolli, *Determination of aluminum in highly concentrated iron samples: Study of interferences using high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry*, Spectrochim. Acta B 62 (2007) 1012-1018.
- [39] H. Becker-Ross, S. Florek, U. Heitmann, *Observation, identification and correction of structured molecular background by means of continuum source AAS - determination of selenium and arsenic in human urine*, J. Anal. At. Spectrom. 15 (2000) 137-141.
- [40] M. G. R. Vale, M. M. Silva, B. Welz, R. Nowka, *Control of spectral and non-spectral interferences in the determination of thallium in river and marine sediments using solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry*, J. Anal. Atom. Spectrom. 17 (2002) 38-45.
- [41] R. G. O. Araujo, B. Welz, F. Vignola, H. Becker-Ross, *Correction of structured molecular background by means of high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry. Determination of antimony in sediment reference materials using direct solid sampling*, Talanta 80 (2009) 846-852.
- [42] I. M. Dittert, D. L. G. Borges, B. Welz, A. J. Curtius, H. Becker-Ross, *Determination of silver in geological samples using high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry and direct solid sampling*, Microchim. Acta 167 (2009) 21-26.
- [43] G. F. Kirkbright, H. N. Johnson, *Application of indirect methods in analysis by atomic-absorption spectrometry*, Talanta 20 (1973) 433-451.
- [44] K. Dittrich, *Analytical applications of spectra of diatomic-molecules*, CRC Crit. Rev. Anal. Chem. 16 (1986) 223-279.
- [45] K. Tsunoda, H. Haraguchi, K. Fuwa, *Studies on the occurrence of atoms and molecules of aluminum, gallium, indium, and their monohalides in electrothermal carbon furnace*, Spectrochim. Acta B 35 (1980) 715-729.

- [46] K. Dittrich, B. Vorberg, J. Funk, V. Beyer, Determination of some non-metals by using diatomic molecular absorbance in a hot graphite furnace *Spectrochim. Acta B* 39 (1984) 349-363.
- [47] M. Resano, M. R. Flórez, E. García-Ruiz, *Progress in the determination of metalloids and non-metals by means of high-resolution continuum source atomic or molecular absorption spectrometry. A critical review*, *Anal Bioanal Chem* 406 (2014) 2239-2259.
- [48] N. Ozbek, A. Baysal, *Determination of sulfur by high resolution continuum source atomic absorption spectrometry: Evaluation of ten years*, *Trends Anal. Chem.* 88 (2017) 62-76.
- [49] D. J. Butcher, *Molecular absorption spectrometry in flames and furnaces: A review*, *Anal. Chim. Acta* 804 (2013) 1-15.
- [50] M. Resano, J. Briceño, M. A. Belarra, *Direct determination of phosphorus in biological samples using a solid sampling-high resolution-continuum source electrothermal spectrometer: comparison of atomic and molecular absorption spectrometry*, *J. Anal. At. Spectrom.* 24 (2009) 1343-1354.
- [51] G. C. Brandao, D. C. Lima, S. L. C. Ferreira, *The chemical generation of NO for the determination of nitrite by high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry*, *Talanta* 98 (2012) 231-235.
- [52] M. L. Oliveira, G. C. Brandao, J. B. de Andrade, S. L. C. Ferreira, *Determination of free and total sulphur (IV) compounds in coconut water using high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry in gas phase*, *Talanta* 179 (2018) 810-815.
- [53] F. Cacho, L. Machynak, M. Nemecek, E. Beinrohr, *Determination of bromide in aqueous solutions via the TIBr molecule using high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry*, *Spectrochim. Acta B* 144 (2018) 63-67.

- [54] M. Borges T. Zanatta, F. V. Nakadi, M. A. M. S. da Veiga, *CaI and Srl molecules for iodine determination by high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry: Greener molecules for practical application*, Talanta 179 (2018) 563-568.
- [55] A. R. Borges, L. L. François, B. Welz, E. Carasek, M. G. R. Vale, *Determination of fluorine in plant materials via calcium mono-fluoride using high-resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry with direct solid sample introduction*, J. Anal. At. Spectrom. 29 (2014) 1564-1569.
- [56] M. A. Bechlin, E. C. Ferreira, J. A. G. Neto, *Determination of chlorine in cement via CaCl molecule by high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry with direct solid sample analysis*, Microchem. J. 132 (2017) 130-135.
- [57] S. Geisler, M. Okruss, H. Becker-Ross, M. D. Huang, N. Esser, S. Florek, *Spectrometer system using a modular echelle spectrograph and a laser-driven continuum source for simultaneous multi-element determination by graphite furnace absorption spectrometry*, Spectrochim. Acta B 107 (2015) 11-16.
- [58] M. Resano, E. Bolea-Fernández, E. Mozas, M. R. Flórez, P. Grinberg, R. E. Sturgeon, *Simultaneous determination of Co, Fe, Ni and Pb in carbon nanotubes by means of solid sampling high resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry*, J. Anal. At. Spectrom. 28 (2013) 657-665.
- [59] N. Ozbek, M. Ozcan, *Simultaneous determination of Co, Al and Fe by HR CS-GFAAS*, Talanta 148 (2016) 17-21.
- [60] A. Cárdenas Valdivia, E. Vereda Alonso, M.M. López Guerrero, J. Gonzalez-Rodriguez, J.M. Cano Pavón, A. García de Torres, *Simultaneous determination of V, Ni and Fe in fuel fly ash using solid sampling high resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry*, Talanta 179 (2018) 1-8.

- [61] W. Boschetti, A. R. Borges, A. T. Duarte, M. B. Dessuy, M. G. R. Vale, J. B. de Andrade, B. Welz, *Simultaneous determination of Mo and Ni in wine and soil amendments by HR-CS GF AAS*, Anal. Methods 6 (2014) 4247-4256.
- [62] L. O. dos Santos, G. C. Brandao, A. M. P. dos Santos, S. L. C. Ferreira, V. A. Lemos, *Direct and Simultaneous Determination of Copper and Iron in Flours by Solid Sample Analysis and High-Resolution Continuum Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*, Food Anal. Methods 10 (2017) 469-476.
- [63] D. V. de Babos, M. A. Bechlin, A. I. Barros, E. C. Ferreira, J. A. G. Neto, S. R. de Oliveira, *Cobalt internal standard for Ni to assist the simultaneous determination of Mo and Ni in plant materials by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry employing direct solid sample analysis*, Talanta 152 (2016) 457-462.
- [64] A. T. Duarte, M. B. Dessuy, M. G. R. Vale, B. Welz, J. B. de Andrade, *Sequential determination of Cd and Cr in biomass samples and their ashes using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct solid sample analysis*, Talanta 115 (2013) 55-60.
- [65] J. S. Almeida, G. C. Brandao, G. L. dos Santos, L. S. G. Teixeira, *Fast sequential determination of manganese and chromium in vegetable oil and biodiesel samples by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry*, Anal. Methods 8 (2016) 3249-3254.
- [66] A. R. Borges, D. N. Bazanella, A. T. Duarte, A. V. Zmozinski, M. G. R. Vale, B. Welz, *Development of a method for the sequential determination of cadmium and chromium from the same sample aliquot of yerba mate using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry*, Microchem. J. 130 (2017) 116-121.
- [67] C. M. Aleluia, F. A. de Santana, G. C. Brandao, S. L.C. Ferreira, *Sequential determination of cadmium and lead in organic pharmaceutical formulations using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry*, Microchem. J. 130 (2017) 157-161.

- [68] W. Boschetti, M. Orlando, M. Dullius, M. B. Dessuy, M. G. R. Vale, B. Welz, J. B. de Andrade *Sequential and simultaneous determination of four elements in soil samples using high-resolution continuum source graphite furnace atomic and molecular absorption spectrometry*, J. Anal. At. Spectrom. 31 (2016) 1269-1277.
- [69] J. S. Almeida, O. C. C. O. Souza, L. S. G. Teixeira, *Determination of Pb, Cu and Fe in ethanol fuel samples by high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry by exploring a combination of sequential and simultaneous strategies*, Microchem. J. 137 (2018) 22-26.
- [70] M. B. Dessuy, R. M. de Jesus, G. C. Brandao, S. L.C. Ferreira, M. G. R. Vale, B. Welz, *Fast sequential determination of antimony and lead in pewter alloys using high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry*, Food Additives & Contaminants 30 (2013) 202-207.
- [71] C. C. Leite, A. de Jesus, M. L. Potes, M. A. Vieira, D. Samios, M. M. Silva, *Direct Determination of Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Na, Ni, Pb, and Zn in Ethanol Fuel by High-Resolution Continuum Source Flame Atomic Absorption Spectrometry*, Energy Fuels 29 (2015) 7358-7363.
- [72] C. C. Leite, A. de Jesus, L. Kolling, M. F. Ferrão, D. Samios, M. M. Silva, *Extraction method based on emulsion breaking for the determination of Cu, Fe and Pb in Brazilian automotive gasoline samples by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry*, Spectrochim. Acta B 142 (2018) 62-67.
- [73] S.R. Oliveira, J. A. G. Neto, J. A. Nóbrega, B. T. Jones, *Determination of macro- and micronutrients in plant leaves by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry combining instrumental and sample preparation strategies*, Spectrochim. Acta B 65 (2010) 316-320.
- [74] P. Pohl, A. Dzimitrowicz, P. Jamroz, K. Greda, *Development and optimization of simplified method of fast sequential HR-CS-FAAS analysis of apple juices on the content of Ca, Fe, K, Mg, Mn and Na with the aid of response surface methodology*, Talanta 189 (2018) 182-189.

- [75] J. L. Raposo, S. R. Oliveira, J. A. Nobrega, J. A. G. Neto, *Internal standardization and least-squares background correction in high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry to eliminate interferences on determination of Pb in phosphoric acid*, Spectrochim. Acta B 63 (2008) 992-995.
- [76] J.L. Raposo, A.P. Oliveira, B.T. Jones, J.A.G. Neto, *Internal standardization combined with dilute-and shoot preparation of distilled alcoholic beverages for Cu determination by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry*, Talanta 92 (2012) 53-57.
- [77] J. L. Raposo, S. R. Oliveira, J. A. G. Neto, J. A. Nobrega, B. T. Jones, *Determination of silicon in lubricant oil by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry using least-square background correction and internal standardization*, Anal. Lett. 44 (2011) 2150-2161.
- [78] L. Fernández-López, B. Gómez-Nieto, M. J. Gismera, M. T. Sevilla, J. R. Procopio, *Direct determination of copper and zinc in alcoholic and non-alcoholic drinks using high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry and internal standardization*, Spectrochim. Acta B 147 (2018) 21-27.
- [79] M. A. Bechlin, F. M. Fortunato, E. C. Ferreira, J. A. G. Neto, J. A. Nobrega, G. L. Donati, B. T. Jones, *Bismuth as a general internal standard for lead in atomic absorption spectrometry*, Anal. Chim. Acta 831 (2014) 24-30.
- [80] Z. Ajtony, N. Laczai, G. Dravec, N. Szoboszlai, A. Marosi, B. Marlok, C. Strel, L. Bencs, *Fast and direct screening of copper in micro-volumes of distilled alcoholic beverages by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry*, Food Chem. 213 (2016) 799-805.



## **CAPÍTULO II / CHAPTER II:**

Objetivos y plan de trabajo / Objectives and work plan



## II.1. OBJETIVOS

El **objetivo general** de esta tesis es desarrollar nuevas metodologías analíticas basadas en la AAS empleando espectrofotómetros de última generación para la determinación de metales y metaloides en muestras de interés ambiental, alimentario y clínico, así como evaluar las capacidades de esta técnica para la caracterización del tamaño de nanopartículas metálicas.

Para alcanzar el objetivo propuesto se han abordado los siguientes **objetivos parciales**:

### *Explorando las potencialidades de la HR-CS AAS con atomizador de llama:*

1. Desarrollo de metodologías para la determinación secuencial rápida y con bajo consumo de muestra de elementos de interés en muestras medioambientales y alimentarias.
2. Desarrollo de una metodología para la determinación directa de silicio en emulsiones agua-aceite-agua diseñadas para la formulación de alimentos funcionales.

### *Con atomizador electrotérmico:*

3. Desarrollo de una metodología para la determinación directa de calcio en micro-muestras de interés clínico y biomédico.

### *Aprovechando las prestaciones de un prototipo de GFAAS:*

4. Estudio en profundidad de los procesos de atomización de especies de oro para establecer los parámetros y condiciones de medida más adecuados que permitan discriminar entre oro iónico y nanopartículas de oro.

En todos los métodos desarrollados se ha considerado como objetivo adicional la reducción del tiempo y el consumo de muestra necesarios para llevar a cabo el análisis, así como minimizar, siempre que sea posible, el empleo de tediosos tratamientos de muestras (digestiones o extracciones).

## II.2. PLAN DE TRABAJO GENERAL

Para alcanzar los objetivos propuestos se establece el siguiente plan general de trabajo:

### METODOLOGÍAS BASADAS EN HR-CS AAS:

- *Selección de las longitudes de onda de medida:*

En función de la concentración de analito y la cantidad de muestra disponible para el análisis, se seleccionan una o varias líneas de análisis (líneas principales o secundarias).
- *Optimización de las condiciones de atomización:*

En los métodos desarrollados empleando el atomizador de llama se evalúa y optimiza, tipo y composición de la llama, altura del mechero y cantidad de modificador más conveniente para la determinación de cada uno de los elementos. Cuando se emplea el atomizador electrotérmico se optimizan las distintas etapas del programa de temperatura (secado, pirólisis, atomización y limpieza) y se evalúa la necesidad de emplear modificadores químicos.
- *Optimización de la cantidad de muestra para el análisis:*

Cuando se emplea el atomizador de llama se evalúa el modo de introducción de muestra (continuo y/o discontinuo) más adecuado para llevar a cabo las medidas en función de las prestaciones analíticas deseadas. En los métodos que emplean el atomizador electrotérmico se optimiza la cantidad de muestra que debe introducirse en el espectrofotómetro para llevar a cabo un análisis libre de interferencias y con una adecuada precisión.
- *Evaluación de los parámetros analíticos del método:*

Se evalúa el número y posición de los píxeles empleados para la cuantificación de las señales de absorbancia y se calculan los parámetros analíticos (sensibilidad, LOD, LOQ, límite superior de linealidad y precisión).

- *Validación de métodos y análisis de muestras reales:*

Las metodologías se emplean para el análisis de muestras reales de origen ambiental, alimentario o clínico. Se evalúa y selecciona el procedimiento de calibración más conveniente para los distintos analitos y muestras a analizar. Los métodos desarrollados se validan empleando materiales de referencia y/o mediante la fortificación de las muestras y el cálculo de los porcentajes de recuperación.

### **METODOLOGÍAS BASADAS EN GFAAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS:**

Para evaluar la capacidad de la GFAAS para discriminar entre iones y nanopartículas metálicas de distinto tamaño se efectúan los siguientes estudios:

- *Evaluación de los parámetros de la señal de absorbancia para la discriminación del tamaño de partícula:*

Se estudian distintos parámetros derivados de las señales de absorbancia. Para cada uno de estos parámetros se evalúa:

- La precisión entre distintos días de medida y tubos de grafito.
- La correlación de los parámetros con el tamaño de nanopartícula.

- *Evaluación de las condiciones de medida:*

Para seleccionar las condiciones que proporcionen la mayor diferenciación entre las especies iónicas y las nanopartículas, se estudian programas de temperatura con distintas rampas de calentamiento en la etapa de atomización.

- *Estudio del mecanismo de atomización:*

Se evalúan las formas de las señales de absorbancia y se calculan las energías de activación con el fin de estudiar el mecanismo de atomización.



## **CAPÍTULO III / CHAPTER III:** Experimental / Experimental





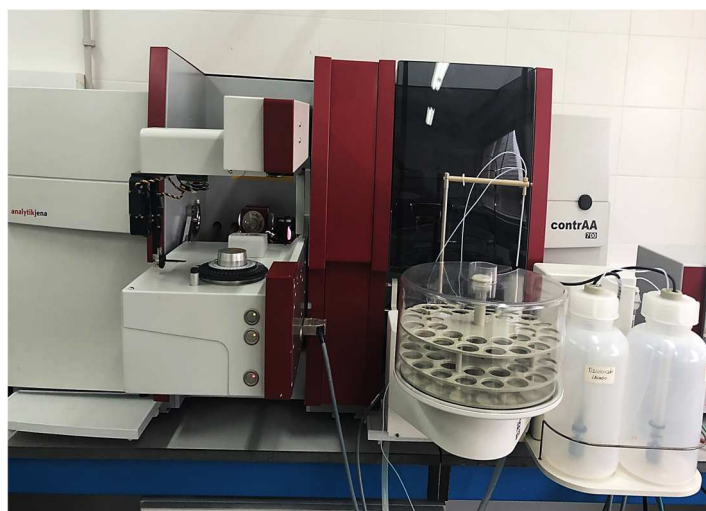
En este capítulo se incluye únicamente la instrumentación, reactivos y procedimientos generales empleados para llevar a cabo las metodologías desarrolladas en los *Capítulos IV, V y VI* de esta memoria de tesis. En el *Capítulo VII*, correspondiente a los trabajos desarrollados durante mi estancia doctoral en la *Universidad de Ulm*, se detallará la instrumentación, reactivos y procedimientos correspondientes.

### III.1. INSTRUMENTACIÓN

#### III.1.1. Espectrofotómetro de absorción atómica de alta resolución y fuente continua (HR-CS AAS)

Las metodologías optimizadas en los *Capítulos IV, V y VI* de esta tesis se han desarrollado empleando un espectrofotómetro de HR-CS AAS modelo *ContrAA 700* de Analytik Jena AG (Jena, Alemania). Este equipo emplea una lámpara de xenón de arco corto con una potencia de 300 W (GLE, Berlín, Alemania) como fuente de radiación continua, y está equipado con un doble monocromador (DEMON) y un detector CCD de 588 píxeles, de los cuales 200 píxeles se utilizan para el análisis, empleándose el resto para la realización de correcciones internas.

Como se muestra en la **Figura III.1**, el espectrofotómetro está equipado con un atomizador de llama y un atomizador electrotérmico, dispuestos en tándem en dos compartimentos separados.

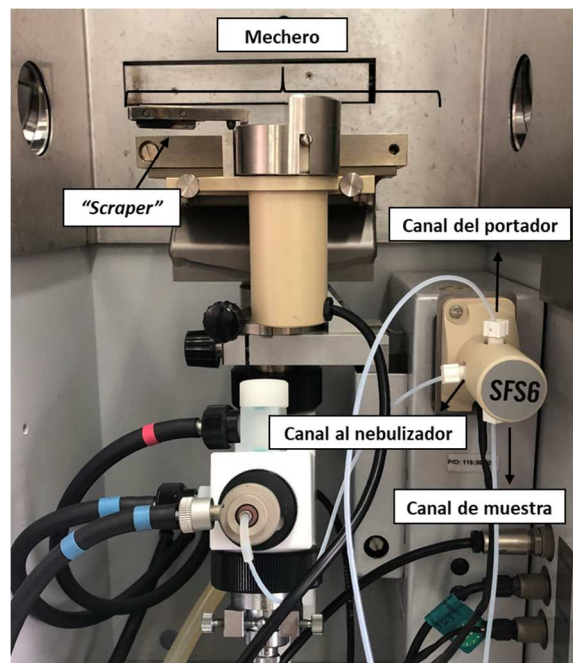


**Figura III.1.** Espectrofotómetro de HR-CS AAS *ContrAA 700* equipado con atomizadores electrotérmico y de llama.

#### - Sistema de atomización de llama:

El sistema de atomización de llama está compuesto por un mechero de titanio con una ranura de 50 mm. Este mechero incorpora un "Scraper" o raspador que limpia de manera automática la ranura del mechero, eliminando los posibles depósitos de carbón cuando se emplea la llama de óxido nitroso-acetileno. Para la introducción de las muestras se utiliza el muestreador automático AS 52S (Analytik Jena AG, Jena, Alemania). Dicho automuestreador dispone de una bandeja de muestra con 30 posiciones, un recipiente de lavado y un recipiente de mezcla para la preparación automática de los patrones o para la dilución de las muestras de manera automática si es necesario.

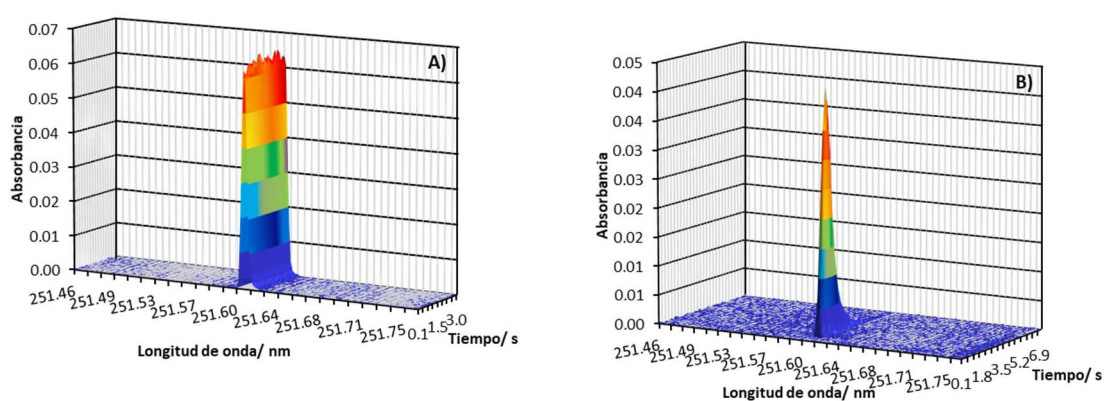
La aspiración de las disoluciones se realiza a través del módulo de introducción de muestra SFS6 (Segmented Flow Star) de Analytik Jena AG (Jena, Alemania). Este módulo de inyección está compuesto por una válvula magnética con dos canales de entrada conmutables y un canal de salida hacia el nebulizador (**Figura III.2**).



**Figura III.2.** Sistema de atomización de llama y módulo de inyección SFS6 de *Analytik Jena AG*.

Por uno de los canales de entrada se aspira disolución portadora o de lavado y por el otro, disolución de blanco, patrón o muestra. A través del software del espectrofotómetro se establecen y controlan las condiciones de funcionamiento del módulo. De modo general, se aspira y se lleva al nebulizador disolución portadora de manera continua, cambiando al otro canal de entrada para la aspiración de patrón o muestra durante un periodo de tiempo establecido.

El módulo SFS6 permite llevar a cabo la introducción de muestra al atomizador de modo continuo o discontinuo mientras se realiza la medida de la absorbancia en función de las condiciones de funcionamiento programadas. Además, al aspirar continuamente disolución portadora, evita la aspiración de aire cuando se cambia de disolución de trabajo. En el modo de introducción continuo la muestra se aspira durante todo el tiempo de medida obteniéndose una señal continua de absorbancia (**Figura III.3A**). Si la muestra se introduce en discontinuo, el tiempo de aspiración de muestra es menor que el de medida obteniéndose una señal de absorbancia transitoria, en forma de pico, como la que se muestra en la **Figura III.3B**. La introducción de muestra en modo discontinuo permite entre otras ventajas reducir la cantidad de muestra necesaria para el análisis, aunque también requiere una mayor optimización de los tiempos de introducción de muestra y medida para conseguir resultados reproducibles.

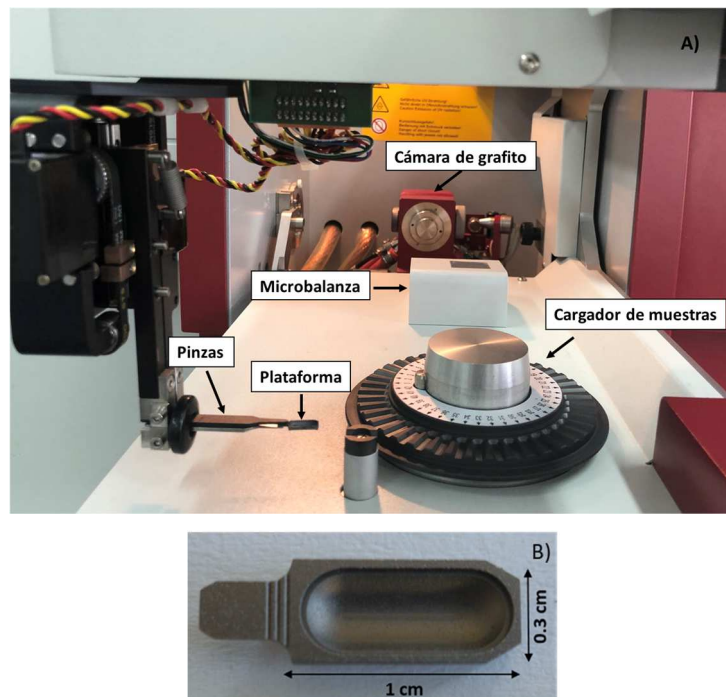


**Figura III.3.** Señal tridimensional de la absorbancia frente a la longitud de onda y el tiempo para un patrón de Si de  $80 \text{ mg L}^{-1}$  empleando los modos de introducción de muestra continuo (A), o discontinuo (B).

La cuantificación de las señales de absorbancia cuando se emplea el modo continuo de introducción de muestra se lleva a cabo empleando la suma de las absorbancias promedio individuales (WSA) de los píxeles o sectores de longitudes de onda seleccionados. Para cuantificar las señales transitorias de absorbancia obtenidas con el modo de introducción de muestra en discontinuo se emplea la suma de las absorbancias integradas individuales (PVSA) de los píxeles previamente elegidos.

- *Sistema de atomización electrotérmica:*

El sistema de atomización electrotérmica está equipado con un horno de grafito de calentamiento transversal. Este equipo dispone de dos automuestreadores (Analytik Jena AG, Jena, Alemania), uno para la introducción de muestras líquidas (MPE-60) y otro específicamente diseñado para la introducción de muestras sólidas (SSA-600). El muestrador de sólidos dispone de un cargador manual de muestras de 42 posiciones donde se colocan las plataformas de grafito para muestras sólidas, una microbalanza con una precisión de  $\pm 0.001$  mg, y un par de pinzas pre-ajustadas que transportan las plataformas de muestra de manera totalmente automática (**Figura III.4A**).



**Figura III.4.** Automuestreador para la introducción de muestras sólidas SSA 600 de *Analytik Jena AG* (A); Plataforma para muestras sólidas (B).

Todas las operaciones de traslado de las plataformas entre las distintas posiciones del equipo están totalmente controladas a través del software, y las únicas operaciones que se llevan a cabo manualmente son la deposición de las muestras y patrones sobre las plataformas.

Todos los experimentos se llevaron a cabo empleando tubos para el análisis de sólidos (Analytik Jena Parte N ° 407-A81.303) sin orificio en la parte superior y cuya apertura lateral es más amplia, y plataformas para muestras sólidas (Analytik Jena Parte N ° 407- A152.023) (**Figura III.4B**), ambos de grafito con recubrimiento pirolítico.

### III.1.2. Otra instrumentación y material de laboratorio

- *Horno microondas*: Sistema de preparación de muestras modelo Multiware de la firma Anton Paar- Perkin Elmer (Graz, Austria) empleado para la puesta en disolución de distintas muestras. El dispositivo consta de un rotor de seis posiciones donde se colocan los digestores de perfluoroalcoxilfluorocarbono (PFA), MF100. Tiene una potencia máxima de 1000 W y permite la programación automática de las condiciones de digestión (tiempo y potencia). Dispone de un sistema de control continuo del proceso, registrando la presión y temperatura en el interior de los digestores. La presión y temperatura máximas son 30 bares y 300 °C respectivamente.
- *Balanza analítica*: Mettler Toledo modelo AX205DR (Greifensee, Suiza) con una sensibilidad de  $\pm 0.01$  mg.
- *Agitador Vórtex*: Velp Scientifica (Usmate, Italia) con una velocidad regulable de 0 y 3000 rpm
- *Equipo de purificación de agua*: Ultra Clear™ TWF UV EDi de Siemens (Barsbüttel, Alemania) para la obtención de agua ultrapura. La resistividad de esta agua es siempre de 18.2 M $\Omega$ .
- *Micro-pipetas*: Thermo Fisher Scientific modelo Finnpiquette F2 de distintos volúmenes (Waltham, Estados Unidos).

- *Material diverso de laboratorio:* Matraces aforados de 5.0, 10.0 y 25.0 mL, vasos de precipitados, tubos y botes de polipropileno con distintas capacidades, etc. Todo el material empleado se trata con HNO<sub>3</sub> al 10% (v/v) durante 24 horas. Posteriormente, se aclara con agua ultrapura antes de su utilización.

### III.2. REACTIVOS

Todos los reactivos empleados son al menos de calidad analítica y se usan sin necesidad de llevar a cabo ninguna purificación adicional.

#### *Disoluciones patrón de elementos:*

- Disoluciones comerciales de 1000 mg L<sup>-1</sup> en HNO<sub>3</sub> 0.5 M de Cu (II), Zn (II), Cd (II), Ni (II), Pb (II), Mn (II), Fe (II), Ca (II), Mg (II), Na (I) y K (I) (Sharlau, Barcelona, España).
- Disolución comercial de 1000 mg L<sup>-1</sup> de Si (IV) en NaOH al 2% (p/p) (Fluka, St Gallen, Suiza).

#### *Modificadores químicos:*

- Disolución comercial de 100 g L<sup>-1</sup> de cloruro de cesio (CsCl) y 100 g L<sup>-1</sup> de cloruro de lantano (LaCl) (Fluka, St Gallen, Suiza).
- Óxido de lantano (La<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) del 99.5% (Fluka, St Gallen, Suiza). Como modificador químico se emplea una disolución de lantano de 100 g L<sup>-1</sup>. Para su preparación se pesa y disuelve la cantidad adecuada de La<sub>2</sub>O<sub>3</sub> en HCl 1 M para obtener una disolución final cuya concentración sea de 100 g L<sup>-1</sup>.

#### *Otros reactivos:*

- Ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) al 65% de calidad para análisis de trazas (Fluka, St Gallen, Suiza). La concentración certificada de los elementos analizados es: ≤0.0001 mg L<sup>-1</sup> para Cd, Mn y Ni; ≤0.0002 mg L<sup>-1</sup> para Cu, Mg, K y Zn; ≤0.0003 mg L<sup>-1</sup> para Na; ≤0.0005 mg L<sup>-1</sup> para Ca, Fe y Pb. El contenido de Si no se certifica.

- Ácido clorhídrico (HCl) al 37% de calidad para análisis de trazas (Fluka, St Gallen, Suiza). La concentración certificada de los elementos analizados es:  $\leq 0.0001 \text{ mg L}^{-1}$  para Cu, Cd, Mn, Se, Ni, Pb y K; y  $\leq 0.0005 \text{ mg L}^{-1}$  para Ca, Fe, Mg, Na y Zn. El contenido de Si no se certifica.

#### *Gases empleados para AAS:*

- Aire comprimido obtenido empleando el compresor JUN-AIR Modelo 6 (IDEX Corporation, Nørresundby, Dinamarca).
- Acetileno ( $\text{C}_2\text{H}_2$ ) con una pureza del 99.6% (Carbueros Metálicos, Madrid, España).
- Óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) con una pureza del 99.998 % (Carbueros Metálicos, Madrid, España).
- Argón con una pureza del 99.9992% (Carbueros Metálicos, Madrid, España).

### **III.3. PROCEDIMIENTOS GENERALES**

En este apartado se detallan los procedimientos generales para la optimización de las condiciones de medida mediante HR-CS AAS. El resto de procedimientos instrumentales y de preparación de muestra llevados a cabo en los *Capítulos IV, V y VI* se detallan en el capítulo correspondiente.

#### **III.3.1. Optimización de las condiciones de análisis**

##### **III.3.1.1. Metodologías de análisis mediante HR-CS FAAS**

###### *Optimización de las condiciones de atomización:*

El flujo de  $\text{C}_2\text{H}_2$  y la altura del mechero se optimiza automáticamente por el software del equipo teniendo en cuenta como criterio la obtención de la máxima relación señal-ruido. Como condiciones iniciales para esta optimización, se fijan las longitudes de onda para cada elemento, y composición de la llama y altura de mechero recomendadas por el fabricante. El flujo de gas combustible y la altura del mechero se modifican simultánea y automáticamente hasta encontrar las condiciones de medida en las que la señal analítica de cada elemento es máxima.

#### *Selección de los parámetros de introducción de muestra:*

Cuando el análisis se lleva a cabo empleando el automuestreador AS 52S y el módulo de inyección de muestra SFS6, se deben optimizar varios parámetros, que se definen a continuación:

- **Velocidad de aspiración:** Se fijó una velocidad de aspiración de muestra de 10.0 mL min<sup>-1</sup> para todas las metodologías desarrolladas.
- **Tiempo de carga:** Es el tiempo requerido para rellenar con muestra el recorrido entre el automuestreador y el módulo de inyección de muestra. Dicho tiempo viene determinado principalmente por la longitud del tubo que conecta ambas partes del sistema. Se empleó un tiempo de carga de 12.0 s para todas las metodologías desarrolladas.
- **Tiempo de retardo:** Es el tiempo que se necesita para transportar la muestra desde el módulo de introducción de muestra hasta la unidad de atomización. Dicho tiempo viene determinado principalmente por la longitud del tubo que conecta ambas partes del sistema. Se empleó un tiempo de retardo de 7.0 s en todas las metodologías desarrolladas.
- **Tiempo de inyección de muestra:** Tiempo durante el cual la válvula del módulo de inyección abre el canal de la muestra para transportarla a la unidad de atomización. Este parámetro se establece para cada uno de los métodos desarrollados en función del modo de introducción de muestra (continuo o discontinuo) y las prestaciones analíticas (sensibilidad, consumo de muestra, etc.) deseadas.
- **Tiempo de medida:** Es el tiempo durante el que se registra la señal de absorbancia. Este parámetro se establece para cada uno de los métodos desarrollados en función del modo de introducción de muestra (continuo o discontinuo) y las prestaciones analíticas deseadas.



- **Tiempo de lavado:** Tiempo que se necesita para limpiar los tubos que conectan el automuestreador, la válvula de inyección, la cámara de nebulización, y el resto del sistema de atomización entre la medida de una muestra y la siguiente. Se empleó en tiempo de lavado de entre 10 y 20 s.

### III.3.1.2. Metodología de análisis mediante HR-CS GFAAS

#### *Optimización de las condiciones de atomización:*

Los programas de temperaturas empleados en las metodologías GFAAS constan de las siguientes etapas:

- **Secado:** Con el fin de evaporar el disolvente de patrones y muestras se establecen una o varias etapas sucesivas de secado con temperaturas comprendidas entre 80 y 110 °C. El número de etapas, sus temperaturas y tiempos de aplicación se seleccionan con el fin de que el secado sea completo y homogéneo.
- **Pirólisis:** Se establecen una o varias etapas de pirólisis para eliminar la mayor parte de los componentes presentes en la matriz de muestra que pueden interferir en la determinación del analito. Las temperaturas de pirólisis empleadas varían típicamente entre 350 y 1800 °C. La temperatura de dicha etapa se establece en función del tipo de muestra y la estabilidad térmica del elemento con el fin de eliminar la mayor cantidad de matriz sin que se produzca pérdida de analito.
- **Atomización:** Etapa del programa de temperatura en la que se producen los átomos gaseosos para que tenga lugar el proceso de absorción. La temperatura de atomización se establece en función de la volatilidad del elemento con el fin de obtener los valores de absorbancia máximos. En dicha etapa se lleva a cabo el proceso de medida de la señal analítica por lo que el tiempo de atomización y el de medida se establecen con vistas a que la señal transitoria de absorbancia se registre por completo.
- **Limpieza:** Tras la medida, se establece una etapa de limpieza con una temperatura ligeramente superior a la empleada en la etapa de atomización, de modo que se elimine cualquier resto que pueda quedar en el tubo de grafito.

Durante las etapas de secado, pirólisis y limpieza se emplea una corriente de argón máxima ( $2 \text{ mL min}^{-1}$ ) como gas de purga para eliminar del tubo de grafito los componentes de la matriz volatilizados, y para proteger el tubo del aire ambiental. Dicho flujo se interrumpe durante la etapa de atomización para lograr una densidad máxima de átomos en el tubo de grafito durante la medida analítica.

### III3.2. Procedimientos de cálculo de los parámetros analíticos

#### *Límites de detección y cuantificación:*

Los límites de detección (LOD) y límites de cuantificación (LOQ), se calculan como 3 y 10 veces respectivamente, el valor de la desviación estándar del blanco de calibración (10 repeticiones), dividido entre la pendiente de la curva de calibrado correspondiente.

#### *Límite superior de linealidad:*

El límite superior de linealidad (ULLR) se calcula gráficamente como la concentración a la cual la desviación de la pendiente de la curva de calibrado es menor del 5% ( $\pm 5\%$  alrededor de la ventana de linealidad ideal).

## **CAPÍTULO IV /CHAPTER IV:**

Análisis multielemental secuencial rápido y con bajo consumo de muestra mediante HR-CS FAAS

Fast sequential multielemental analysis with low sample consumption by HR-CS FAAS



## IV.1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El desarrollo e implementación de métodos de análisis multielemental tiene un gran interés para los laboratorios de rutina dedicados al análisis a gran escala de muestras de diversa naturaleza. Estas metodologías suponen un ahorro tanto en tiempo como en el coste final del análisis, factores determinantes para estos laboratorios. Por otra parte, el desarrollo de metodologías de análisis FAAS con introducción discontinua de muestra es una buena alternativa al modo convencional donde la muestra se aspira de manera continua, ya que aporta como principal ventaja la considerable reducción del volumen de muestra requerido para el análisis. Además, dada la pequeña cantidad de muestra que se introduce en el sistema de atomización y al transporte continuo de disolución portadora, la introducción discontinua de muestra permite analizar con mayor facilidad muestras complejas o con un alto contenido salino [1, 2]. Estas prestaciones pueden suponer beneficios adicionales en los laboratorios de análisis. En este capítulo se ilustra la aplicación de la HR-CS FAAS en el desarrollo de metodologías de carácter multielemental aplicadas en el análisis de muestras ambientales y alimentarias.

Como se ha comentado en el *Capítulo I*, la HR-CS FAAS presenta una mayor capacidad para llevar a cabo la determinación multielemental de manera secuencial rápida que la LS FAAS, ya que no hay necesidad de cambiar lámparas y la longitud de onda y composición de la llama para cada analito se establece de manera automática en pocos segundos.

A lo largo de la última década, se ha demostrado la eficacia de la HR-CS FAAS para desarrollar metodologías de análisis multielemental aplicables a un gran número de analitos y muestras de distinta naturaleza. En la **Tabla IV.1** se recogen algunas de las aplicaciones más relevantes empleando esta técnica para el análisis de muestras medioambientales y alimentarias [3-17].

**Tabla IV.1.** Publicaciones sobre la determinación multielemental en muestras medioambientales y alimentarias utilizando HR-CS FAAS.

ELEMENTOS	MUESTRAS	CARACTERÍSTICAS DESTACADAS DE LA APLICACIÓN	REFERENCIA
Cu, Fe, Mn, Zn	Suelo	Uso de línea secundaria y registro de píxeles laterales para la ampliación del intervalo de linealidad de Fe	[3]
Ag, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn	Suelo	Uso de las líneas principales de análisis Prestaciones analíticas comparables a las obtenidas por el método estándar empleando ICP-OES	[4]
Ca, Mg, K, Cu, Fe, Mn, Zn	Hojas de plantas	Uso de línea secundaria y registro de píxeles laterales para la ampliación del intervalo de linealidad de Mg Corrección de interferencias espectrales de NO mediante LSBC para la determinación de Zn	[5]
B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, P, S	Hojas de plantas	Uso de línea secundaria y registro de píxeles laterales para la ampliación del intervalo de linealidad de Mg Uso de bandas moleculares para la determinación de S	[6]
K, P	Fertilizantes líquidos	Uso de línea secundaria y registro de píxeles laterales para la ampliación del intervalo de linealidad de K Evaluación de líneas atómicas y moleculares de P	[7]
Cd, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn	Agua de mar y aguas residuales	Uso de las líneas principales de análisis Análisis de muestras con alto contenido salino	[8]
P, B, S	Hojas de plantas	Uso de la línea atómica principal y secundaria de B, y de distintas bandas moleculares de PO y CS Evaluación del número de píxeles más apropiados para la cuantificación.	[9]
P, K, Na, Ca, Mg, Mn, Zn	Hortalizas de hoja	Uso de las líneas principales de análisis Diferenciación de muestras en función del contenido mineral empleando análisis discriminante lineal	[10]
Ca, Mg	Yogur, leche de vaca y leche en polvo	Uso de líneas secundarias de análisis Introducción directa de muestra en forma de suspensiones	[11]
Ca, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Na, Zn	Hojas de té e infusiones	Uso de las líneas principales de análisis Uso de adición estándar como método de calibración	[12]
Ca, Fe, Mg, Mn	Café instantáneo	Uso de las líneas principales de análisis Análisis directo sin necesidad de digestión de muestra	[13]
Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Zn	Leche y chocolate en polvo, café soluble	Uso de líneas principales para micronutrientes y secundarias para macroelementos	[14]
Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na	Zumo de manzana	Aplicación del Método de Superficie de Respuesta (RSM) para la optimización de las condiciones de análisis	[15]
Cu, Zn, Pb	Bebidas alcohólicas y azucaradas	Calibración por patrón interno Evaluación del modo continuo y discontinuo de introducción de muestra	[16]
Be, Ca, Sr, Co, Cu, K, Ni, Li, Mn, Na, Rb	Vino tinto	Uso de líneas secundarias de análisis para elementos mayoritarios. Empleo del modo de introducción de muestra en discontinuo para reducir el consumo de muestra	[17]

Como podemos ver en la tabla, en varias de estas aplicaciones no sólo se hace uso de la posibilidad de determinar distintos elementos de manera secuencial rápida, sino también se explora el uso de varias líneas de análisis con distintas sensibilidades para un mismo analito y el empleo de los píxeles laterales del perfil de la línea atómica para reducir la sensibilidad y ampliar el intervalo lineal de trabajo [3, 5-7, 11, 17]. Por otro lado, se han publicado varios trabajos donde se realiza la determinación secuencial de elementos no metálicos [6,7,9,10] o donde se emplea la calibración por patrón interno [16], aplicaciones que son difíciles de llevar a cabo empleando la LS AAS convencional.

Aunque, como ya se ha explicado en el *Capítulo III* (Experimental), en HR-CS FAAS la introducción de muestra se puede llevar a cabo en modo continuo o discontinuo, en la mayoría de los trabajos publicados se emplea el modo continuo, siendo escasos los trabajos donde se optimicen metodologías de análisis multielemental utilizando el modo de introducción de muestra en discontinuo. Boschetti *et al.* [17] emplearon la introducción discontinua para reducir el volumen de muestra requerido para llevar a cabo el análisis de distintos vinos tintos brasileños no comerciales producidos específicamente para este estudio y de los que por tanto se disponía una escasa cantidad de muestra. En el trabajo desarrollado por Fernández-López *et al.* [16] en nuestro grupo de investigación, se evaluó el uso del modo continuo y discontinuo de introducción de muestra para llevar a cabo la determinación directa de Cu, Zn y Pb en bebidas con distintos contenidos de azúcar y alcohol empleando Ag como patrón interno. Ambos modos de introducción de muestra proporcionaron buenos resultados, pero el empleo del modo discontinuo además de reducir el consumo de muestra permitió evitar la obstrucción frecuente del sistema de nebulización y el mechero debido al alto contenido de azúcar de algunas de las muestras analizadas.

## IV.2. OBJETIVOS

El **objetivo** de este capítulo es llevar a cabo el desarrollo de nuevas metodologías analíticas para la determinación multielemental rápida y con bajo consumo de muestra. Para ello, se optimizaron las condiciones de medida de un total de 12 elementos de interés en el ámbito medioambiental y/o alimentario como: Cd, Pb, Ni, Cu, Zn, Fe, Mn, Ca, Mg, Na, K y Si, empleando el modo de introducción de muestra en discontinuo.

Las metodologías desarrolladas se aplicaron al análisis de distintos tipos de muestras como aguas naturales, suelos, plantas, bebidas comerciales, infusiones de hierbas y suplementos alimenticios.

## IV.3. OPTIMIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA

### IV.3.1. Selección de las longitudes de onda de medida

Las líneas más adecuadas de cada uno de los analitos se seleccionaron teniendo en cuenta la concentración esperada de dicho elemento en las muestras, así como el número de líneas disponibles y sus sensibilidades relativas. En la **Tabla IV.2** se resumen las longitudes de onda seleccionadas para cada uno de los elementos, así como sus correspondientes sensibilidades relativas.

Dado que el contenido de Cd, Pb, Ni, Cu y Zn en muestras ambientales y/o alimentarias suele ser bajo, encontrándose como elementos traza o minoritarios, con el fin de obtener la mayor señal analítica posible se eligieron las líneas principales de estos elementos. Teniendo en cuenta que el contenido de Fe y Mn en este tipo de muestras puede ser muy variable, con el fin de abarcar un mayor intervalo de concentraciones se seleccionaron y evaluaron líneas de diferentes sensibilidades de ambos elementos.



**Tabla IV.2.** Longitudes de onda de trabajo y sensibilidad relativas para cada una de las líneas de trabajo seleccionadas para la determinación de Cd, Pb, Ni, Zn, Cu, Mn, Fe, K, Na, Mg, Ca y Si.

Elemento	Longitud de onda (nm)	Sensibilidad relativa (%)
Cd	228.802	100
Pb	217.001	100
Ni	232.003	100
Zn	213.857	100
Cu	324.754	100
Mn	279.482	100
	279.827	67
Fe	248.327	100
	248.814	67
	302.064	26
K	769.897	56
	404.414	0.50
Na	589.592	50
	330.237	0.48
Mg	202.582	4.3
Ca	422.673	100
	239.856	1.1
Si	251.611	100

Por otra parte, dado que el Ca, Na, K y Mg suele estar presente en altas cantidades en las muestras ambientales y alimentarias, con el fin evitar la dilución excesiva de las muestras se eligieron líneas secundarias con diferentes sensibilidades relativas para estos elementos. Sin embargo, como las líneas secundarias de Ca presentan unas sensibilidades muy bajas, también se seleccionó la línea principal para la determinación de este elemento. Finalmente, dado que el Si es un elemento que generalmente presenta unos LOD y LOQ elevados en FAAS, para obtener la mayor señal de absorbancia posible se seleccionó la línea principal de este elemento para desarrollar la metodología.

#### **IV.3.2. Optimización de las condiciones de atomización y la altura del mechero**

Con el fin de obtener la máxima relación señal-ruido, se optimizó la composición de la llama y la altura del mechero para cada uno de los elementos estudiados. Para establecer las condiciones óptimas de medida, se prepararon patrones individuales de

cada elemento con una concentración de 1.0 mg L<sup>-1</sup> para Cd, Pb, Ni, Cu, Zn, Mn y Fe, y de 5.0 mg L<sup>-1</sup> para Ca, Na, K, Mg y Si. Los patrones se prepararon mediante la adecuada dilución del correspondiente patrón comercial de 1000 mg L<sup>-1</sup> en HCL al 1%(v/v). Para evitar interferencias químicas y/o de ionización se añadió un volumen adecuado de disolución tampón comercial de Cs-La para que la concentración final de este reactivo fuera del 1% (v/v).

Para la determinación de Cd, Pb, Ni, Cu, Zn, Mn, Fe, Ca, Na, K y Mg se empleó una llama de C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-aire con un flujo de aire constante de 470 L h<sup>-1</sup>. Dado que el Si es un elemento muy refractario que requiere de una temperatura relativamente alta para llevar a cabo su atomización, la determinación de este elemento se llevó a cabo empleando una llama de C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-N<sub>2</sub>O con un flujo constante de N<sub>2</sub>O de 376 L h<sup>-1</sup>. La optimización del flujo de C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> y de la altura del mechero se llevó a cabo tal como se describe en el *Capítulo III* (Apartado III.3.1.1, página 45). Los parámetros óptimos finales seleccionados para cada analito se reflejan en la **Tabla IV.3**.

**Tabla IV.3.** Composición de la llama y altura del mechero óptimas para la determinación de Cd, Pb, Ni, Zn, Cu, Mn, Fe, K, Na, Mg, Ca y Si.

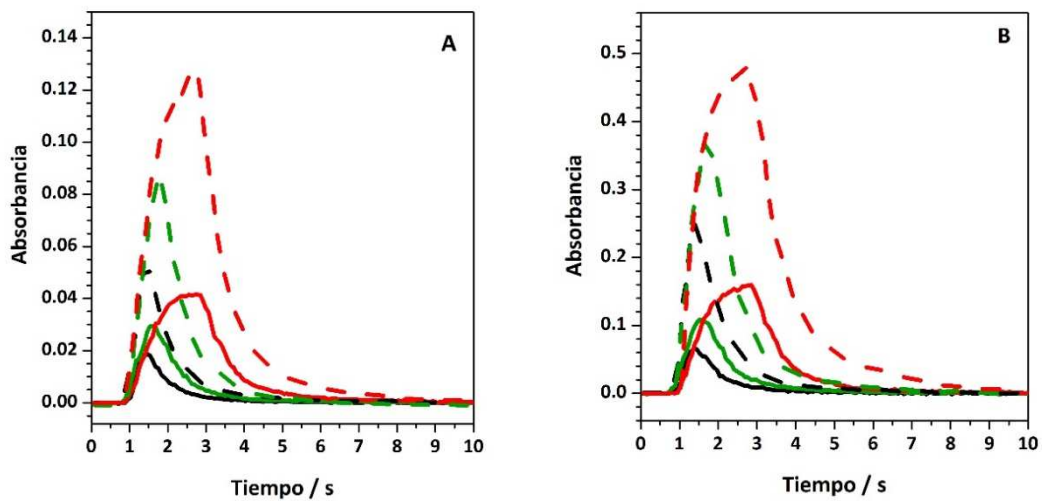
Elemento	Tipo de llama	Flujo de C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> (L h <sup>-1</sup> )	Altura del mechero (mm)
Cd	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> -aire	45 <sup>a</sup>	6
Ni	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> -aire	45 <sup>a</sup>	8
Cu	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> -aire	50 <sup>a</sup>	7
Zn	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> -aire	50 <sup>a</sup>	6
Ca	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> -aire	50 <sup>a</sup>	5
Pb	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> -aire	55 <sup>a</sup>	7
Mn	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> -aire	55 <sup>a</sup>	6
Mg	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> -aire	60 <sup>a</sup>	7
Fe	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> -aire	65 <sup>a</sup>	6
K	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> -aire	70 <sup>a</sup>	6
Na	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> -aire	90 <sup>a</sup>	6
Si	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> -N <sub>2</sub> O	270 <sup>b</sup>	7

<sup>a</sup> 470 L h<sup>-1</sup> flujo de aire; <sup>b</sup> 376 L h<sup>-1</sup> flujo de N<sub>2</sub>O

En general, los elementos alcalinos y alcalinotérreos presentaron valores de absorbancia máximos cuando se emplearon llamas con un flujo alto de  $C_2H_2$ . Para Cd, Ni, Cu, Zn, Mn y Pb los mayores valores de absorbancia se obtuvieron con llamas con un flujo de  $C_2H_2$  entre 45 y 55  $L h^{-1}$ , no observándose variaciones significativas de la absorbancia al variar la composición de la llama entre dichos flujos.

### **IV.3.3. Selección de los parámetros de introducción de muestra**

Empleando el módulo SFS6, la muestra puede ser introducida al atomizador de modo continuo o discontinuo como ya se ha indicado anteriormente (Apartado III.1.1, página 39). Con el fin de lograr una reducción significativa del consumo de muestra el desarrollo de esta metodología se llevó a cabo empleando el modo discontinuo de introducción de muestra. Los parámetros generales de introducción de muestra empleados (tiempo de carga, tiempo de retardo y tiempo de lavado entre muestras) se han descrito en el *Capítulo III* (Apartado III.3.1.1, página 45). El tiempo de inyección de muestra y el tiempo de medida empleados para desarrollar esta metodología se optimizaron con el fin de obtener señales transitorias de absorbancia lo más similares posibles a picos gaussianos y teniendo en cuenta la sensibilidad y LOD, así como el tiempo y el volumen total de muestra requerido para llevar a cabo el análisis. Para ello, se registraron las señales de absorbancia para patrones con distintos niveles de concentración de cada uno de los elementos estudiados empleando tiempos de inyección de 0.5, 1.0 y 2.0 s. A modo de ejemplo, en la **Figura IV.1** se muestran las señales obtenidas para un patrón de Cu de 0.5 y 2.0  $mg L^{-1}$  (**A**), y para un patrón de Mg de 5.0 y 20.0  $mg L^{-1}$  (**B**) a los diferentes tiempos de inyección estudiados.



**Figura IV.1.** Señales transitorias de absorbancia para: (A) un patrón de Cu de  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  (línea continua) y  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  (línea discontinua) y (B) un patrón de Mg de  $5.0 \text{ mg L}^{-1}$  (línea continua) y  $20.0 \text{ mg L}^{-1}$  (línea discontinua), cuando se emplea un tiempo de inyección de 0.5 s (negro), 1.0 s (verde) y 2.0 s (rojo). Tiempo de medida constante de 10 s.

Como se puede observar en la **Figura IV.1**, a medida que se incrementa el tiempo de inyección, la altura y la anchura de las señales de absorbancia registradas para ambos analitos aumentaron significativamente. De hecho, cuando se emplea un tiempo de inyección de 0.5 s, un tiempo de medida de entre 4.0 y 5.0 s es suficiente para registrar completamente las señales transitorias de los patrones de Cu de  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  y de Mg de  $20.0 \text{ mg L}^{-1}$ , mientras que al emplear un tiempo de 2.0 s, se necesitan entre 8.0 y 9.0 s para registrar completamente las señales de dichos patrones. Por otro lado, al aumentar el tiempo de inyección de 0.5 a 2.0 s, la forma gaussiana de la señal de absorbancia comienza a perderse. Un comportamiento similar al expuesto para Cu y Mg se observó para el resto de los analitos estudiados.

Para evaluar las sensibilidades y LODs se construyeron las curvas de calibrado para cada uno de los elementos y tiempos de inyección estudiados. A modo de ejemplo, en la **Tabla IV.3** se muestran estos parámetros para Cd, Ni, Pb, Cu y Zn.

**Tabla IV.3.** Sensibilidad y LOD para Cd, Ni, Pb, Cu y Zn utilizando tiempos de inyección de muestra de 0.5, 1.0 y 2.0 s. 3 píxeles (CP±1) para la cuantificación de las señales.

TIEMPO	0.5 s		1.0 s		2.0 s	
ELEMENTO	Sensibilidad <sup>a</sup>	LOD <sup>b</sup>	Sensibilidad <sup>a</sup>	LOD <sup>b</sup>	Sensibilidad <sup>a</sup>	LOD <sup>b</sup>
Cd	0.1451	0.018	0.2843	0.011	0.5303	0.008
Ni	0.0394	0.031	0.0780	0.020	0.1632	0.012
Pb	0.0214	0.098	0.0427	0.060	0.0776	0.047
Cu	0.0823	0.013	0.1664	0.007	0.3697	0.004
Zn	0.2163	0.024	0.3912	0.014	0.8590	0.009

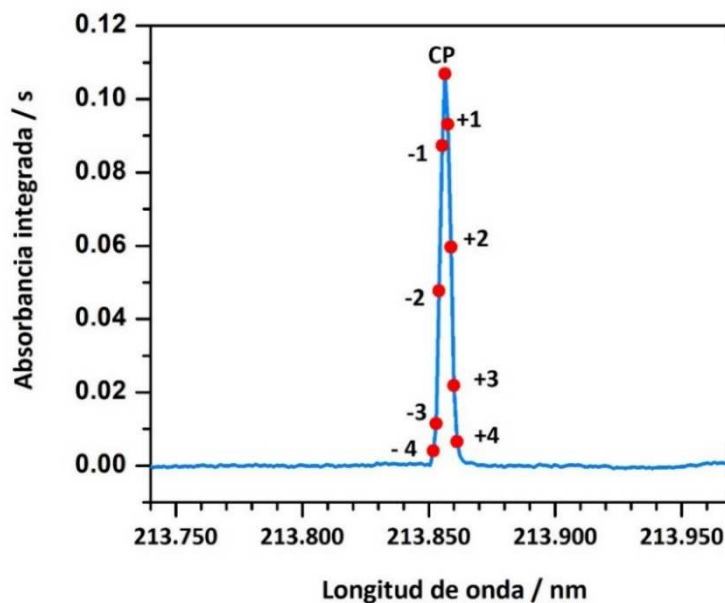
Unidades: <sup>a</sup> s L mg<sup>-1</sup>; <sup>b</sup> mg L<sup>-1</sup>

Como puede observarse en la **Tabla IV.3**, estos parámetros mejoran al aumentar el tiempo de inyección, obteniéndose las mejores sensibilidades y LODs cuando se emplea un tiempo de inyección de 2.0 s. Sin embargo, aunque dichos parámetros mejoran, es importante considerar que al aumentar el tiempo de inyección también se incrementa considerablemente el volumen de muestra consumido. Por ejemplo, el volumen de muestra necesario para llevar a cabo la determinación de cada analito por triplicado cuando se emplea un tiempo de inyección de 2.0 s es aproximadamente 1-2 veces mayor que el volumen requerido para un tiempo de inyección de 0.5 s. Considerando el elevado número de elementos y líneas de análisis seleccionadas para cada analito, el incremento de este volumen resultaría muy significativo al llevar a cabo el análisis multielemental de todos ellos en una misma muestra.

Teniendo todos estos factores en cuenta y con el fin de obtener unas propiedades analíticas adecuadas y un consumo de muestra y tiempo de análisis apropiados, se eligieron 1.0 s y 7.0 s como tiempos de inyección y de medida, respectivamente. Empleando estas condiciones de introducción de muestra, la determinación de cada analito por triplicado puede llevarse a cabo empleando un volumen de muestra de entre 0.6 y 0.9 mL en aproximadamente 1-2 minutos, sin que las sensibilidades y LODs empeoren de manera significativa. La reducción del volumen de muestra supone una gran ventaja en una técnica que en el modo de introducción en continuo generalmente requiere un volumen de muestra de 13 a 14 veces mayor por cada analito a determinar.

#### IV.3.4. Evaluación del número de píxeles óptimo para la cuantificación de las señales de absorbancia

Como ya se ha comentado en el *Capítulo I* (Apartado I.3.2, página 11), la capacidad de la HR-CS AAS para registrar simultáneamente un pequeño intervalo espectral de 200 píxeles alrededor de la línea analítica, agrega una dimensión extra (longitud de onda) a la señal de AAS tradicional (absorbancia *versus* tiempo). A modo de ejemplo, en la **Figura IV.2** se muestra el espectro de absorbancia integrada frente a la longitud de onda para un patrón de  $10.0 \text{ mg L}^{-1}$  de Zn cuando se emplea la línea principal de este elemento a  $213.857 \text{ nm}$ . El píxel central 101, indicado en la figura como CP, corresponde al máximo de absorbancia de la longitud de onda de la línea, mientras que los píxeles laterales (97, 98, 99, 100; 102, 103, 104, 105) se han designado con un número que indica la distancia de estos píxeles respecto a CP. Esta terminología se empleará a lo largo de toda esta memoria para la designación de dichos píxeles.



**Figura IV.2.** Espectro de absorbancia integrada en el tiempo frente a la longitud de onda para un patrón de Zn de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  en el entorno espectral de la línea principal de Zn a  $213.857 \text{ nm}$ .

Como puede observarse en la **Figura IV.2**, para un patrón de Zn de  $10.0 \text{ mg L}^{-1}$  el número de píxeles que definen el perfil de absorción atómica se extiende aproximadamente sobre unos 9-10 píxeles. Al elegir un cierto número de píxeles en HR-CS AAS, se puede seleccionar un intervalo de longitudes de onda definido sobre el que

registrar la señal de absorbancia. De este modo, es posible mejorar la sensibilidad aumentando el número de sectores de longitudes de onda o píxeles utilizados para la evaluación de las señales analíticas. Sin embargo, otros parámetros analíticos como el LOD y LOQ pueden verse afectados al variar el número de píxeles empleados para la cuantificación de las señales.

La finalidad del estudio llevado a cabo en este apartado es evaluar el número de píxeles óptimo para efectuar las medidas de absorbancia, de tal forma que se consiga una sensibilidad adecuada y los mejores LODs y LOQs posibles para cada uno de los elementos estudiados. Para llevar a cabo este estudio, se construyeron las curvas de calibrado para cada uno de los analitos y se evaluaron dichos parámetros empleando 1 (CP), 3 (CP±1), 5 (CP±2), 7 (CP±3) y 9 (CP±4) píxeles para la cuantificación de las señales. A modo de ejemplo, en la **Tabla IV.4** se recogen las sensibilidades y LODs obtenidos en función de los píxeles sumados para la determinación de Cd, Ni, Pb, Cu y Zn, elementos para los que el LOD es especialmente relevante dada su baja concentración en algunas muestras.

**Tabla IV.4.** Sensibilidad y LOD para Cd, Ni, Pb, Cu y Zn utilizando 1 (CP), 3 (CP±1), 5 (CP±2), 7 (CP±3) y 9 (CP±4) píxeles para la cuantificación de las señales de absorbancia.

	Cd		Ni		Pb		Cu		Zn	
	Sensibilidad <sup>a</sup>	LOD <sup>b</sup>	Sensibilidad <sup>a</sup>	LOD <sup>b</sup>	Sensibilidad <sup>a</sup>	LOD <sup>b</sup>	Sensibilidad <sup>a</sup>	LOD <sup>b</sup>	Sensibilidad <sup>a</sup>	LOD <sup>b</sup>
<b>CP</b>	0.1071	0.011	0.0289	0.026	0.0161	0.11	0.0598	0.010	0.1449	0.023
<b>CP±1</b>	0.2843	0.011	0.0780	0.020	0.0427	0.06	0.1664	0.007	0.3912	0.014
<b>CP±2</b>	0.3750	0.014	0.0996	0.028	0.0568	0.09	0.2211	0.010	0.5083	0.023
<b>CP±3</b>	0.3982	0.018	0.1052	0.041	0.0608	0.12	0.2602	0.014	0.5498	0.037
<b>CP±4</b>	0.4036	0.022	0.1060	0.047	0.0615	0.18	0.2674	0.020	0.5600	0.045

Unidades: <sup>a</sup> s L mg<sup>-1</sup>; <sup>b</sup> mg L<sup>-1</sup>

Como podemos observar en la **Tabla IV.4**, los aumentos más significativos en las pendientes de estos 5 elementos se obtuvieron al incrementar el número de píxeles empleados para la cuantificación de las señales de 1 (CP) a 3 (CP±1) y/o 5 (CP±2), y los mejores LODs se obtuvieron cuando se emplearon 3 píxeles (CP±1) para la cuantificación de las señales de absorbancia. El uso de un número mayor de píxeles produce una ligera

mejora de la sensibilidad, pero debido al aumento de la contribución del ruido a la señal analítica, se elevan los valores de los LODs.

En general, el resto de los elementos estudiados mostraron un comportamiento similar. En base a estos resultados la cuantificación de las señales de absorbancia se llevó a cabo empleando 3 píxeles ( $CP \pm 1$ ) para la determinación de Cd, Cu, Zn, Mn, Pb, Ni, Fe, K, Mg, Si y para la determinación de Ca cuando se empleó la línea principal a 422.673 nm. Para la determinación de Na y la determinación de Ca a 239.856 nm se emplearon 5 píxeles ( $CP \pm 2$ ).

### IV.3.5. Posibilidades para la expansión del intervalo de respuesta lineal

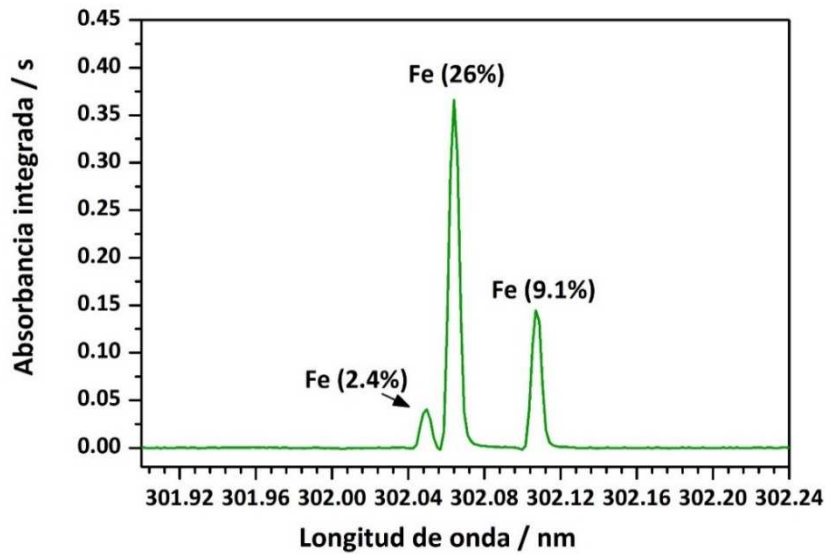
Se evaluaron distintas estrategias metodológicas para ampliar el intervalo de respuesta lineal para la determinación de Ca, Mg, Si, K, Na, Mn, Fe y Zn, considerados elementos mayoritarios o de contenido variable en las muestras medioambientales y/o alimentarias que se desean analizar en este capítulo. En la práctica, existen tres enfoques distintos que permiten reducir la sensibilidad, y por tanto ampliar el intervalo de respuesta lineal: el uso de líneas secundarias, la monitorización simultánea de varias líneas de un mismo elemento (multipletes) y/o el uso de los píxeles laterales o de las alas del perfil de la línea de análisis para la cuantificación de las señales. Con el fin de establecer los intervalos de respuesta lineal para estos elementos, se construyeron las curvas de calibrado y se calcularon los LOQs y límites superiores de linealidad (ULLR) de acuerdo con los procedimientos descritos en el *Capítulo III* (Apartado III.2.3, página 48).

Teniendo en cuenta que las medidas mediante HR-CS FAAS son rápidas y que el empleo del modo discontinuo de introducción de muestra en el desarrollo de esta metodología ha permitido reducir significativamente el volumen de muestra requerido para el análisis (a menos de 1 mL por elemento), el uso de varias líneas de análisis de un mismo elemento con diferentes sensibilidades es una manera sencilla y rápida de reducir la sensibilidad y ampliar el intervalo de trabajo de respuesta lineal.



Como se ha indicado en el *Apartado IV.3.1*, para la determinación de Mn, Na, K, Ca y Fe se seleccionaron dos o tres líneas atómicas con sensibilidades significativamente diferentes. Gracias al uso de varias líneas de trabajo se establecieron intervalos de respuesta lineal de hasta tres órdenes de magnitud para Mn, K, Na y Ca (de 0.027 mg L<sup>-1</sup> a 8.4 mg L<sup>-1</sup> para Mn; de 0.11 mg L<sup>-1</sup> a 160 mg L<sup>-1</sup> para K; de 0.047 mg L<sup>-1</sup> a 85 mg L<sup>-1</sup> para Na; y de 0.33 mg L<sup>-1</sup> a 95 mg L<sup>-1</sup> para Ca). Los resultados obtenidos para las distintas líneas empleadas para cada analito se resumen al final de este apartado en la **Tabla IV.5** (página 68).

Para la determinación de Fe se seleccionaron la línea principal a 248.327 nm con una sensibilidad relativa del 100% y 2 líneas secundarias a 248.814 nm y 302.064 nm con sensibilidades relativas del 67% y 26%. El mejor LOD (0.030 mg L<sup>-1</sup>) se obtuvo empleando 3 píxeles (CP±1) para la cuantificación de las señales de la línea principal de Fe. En este caso, el ULLR fue de 1.6 mg L<sup>-1</sup>. Este límite se elevó hasta los 7.2 mg L<sup>-1</sup> y 15 mg L<sup>-1</sup> cuando se emplearon las líneas secundarias a 248.814 nm y 302.064 nm, respectivamente. Además, el Fe presenta un multiplete en la zona espectral localizada alrededor de la longitud de onda de 302.064 nm. Como se ha comentado en el *Capítulo I* (*Apartado I.3.2*, página 17), la aparición de multipletes no es inusual y su monitorización es una forma sencilla de ampliar el intervalo de linealidad cuando las líneas de análisis registradas presentan sensibilidades relativas diferentes, ya que las distintas líneas se monitorizan de manera simultánea sin necesidad de llevar a cabo medidas adicionales, con la consecuente reducción de tiempo y consumo de muestra. Como se puede ver en la **Figura IV.3**, las tres líneas de Fe de este triplete presentan unas sensibilidades muy diferentes por lo que el intervalo de linealidad de cada una de estas líneas debería ser diferente. De hecho, para la línea del triplete a 302.064 nm (sensibilidad relativa 26%) se obtuvo un ULLR de 15 mg L<sup>-1</sup>, aumentándose hasta los 110 mg L<sup>-1</sup> cuando se empleó la línea del triplete a 302.107 nm (sensibilidad relativa 9.1%).

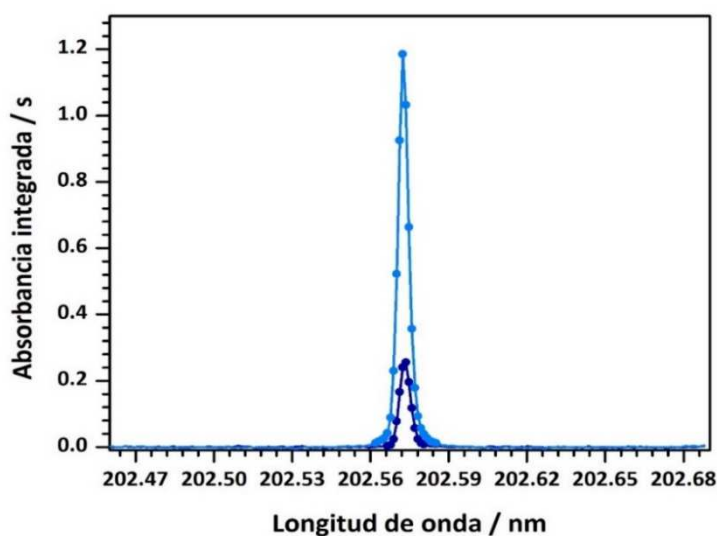


**Figura IV.3.** Espectro de absorción integrada en el tiempo frente a la longitud de onda para un patrón de Fe de 50 mg L<sup>-1</sup> en el entorno espectral del triplete de Fe localizado a una longitud de onda de 302.064 nm. La sensibilidad relativa de cada línea se muestra entre paréntesis.

La línea secundaria de Fe a 302.049 nm (sensibilidad relativa 2.4%), no se pudo emplear para ampliar el intervalo de respuesta lineal ya que se observó que para concentraciones de Fe superiores a 100 mg L<sup>-1</sup> los píxeles laterales de la línea de Fe a 302.064 nm, solapaban parcialmente con los de la línea secundaria de Fe a 302.049 nm, afectando ligeramente a su respuesta analítica. Sin embargo, esta línea secundaria de Fe puede emplearse para llevar a cabo una estimación del contenido de este elemento en muestras con concentraciones superiores a los 110 mg L<sup>-1</sup> evitando de este modo tener que llevar a cabo una dilución adicional de la muestra.

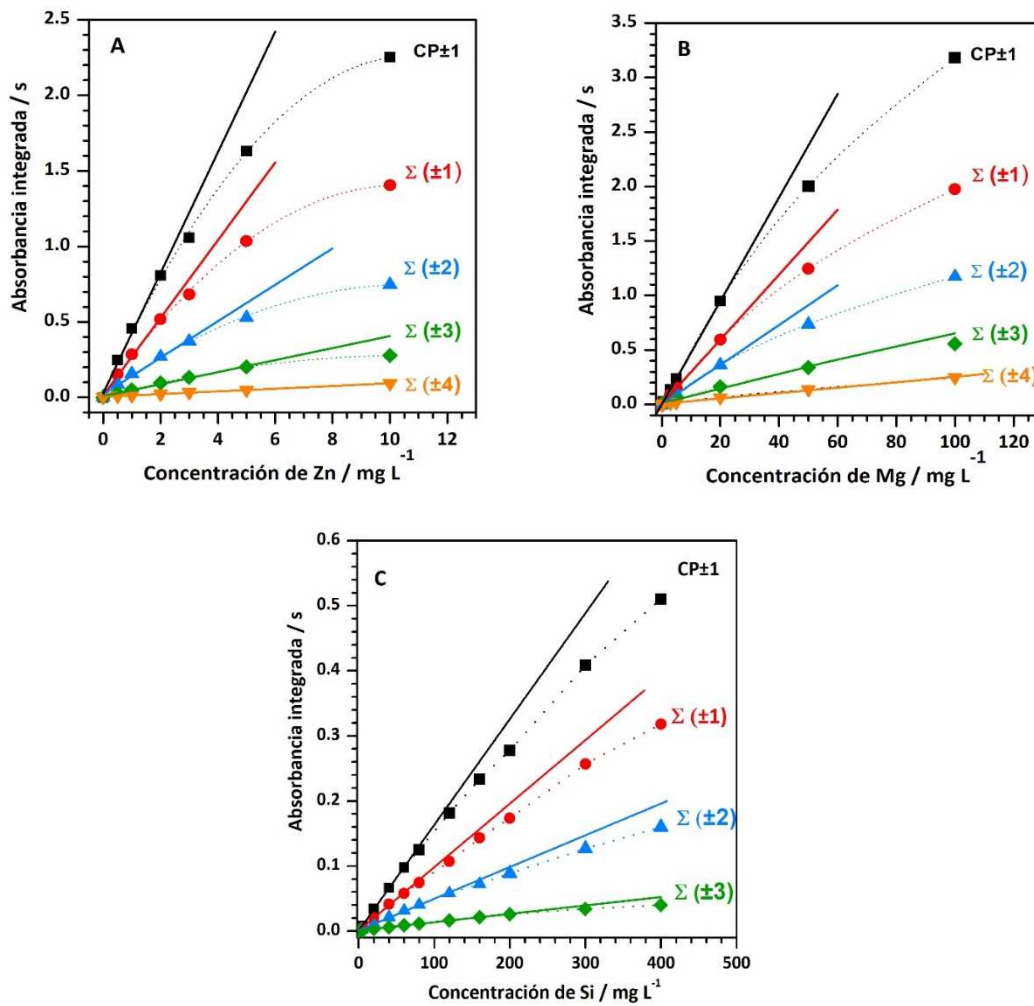
Si el analito no dispone de muchas líneas secundarias o éstas presentan sensibilidades relativas muy similares, el uso de los píxeles laterales o de las alas del perfil de la línea de análisis para la cuantificación de las señales de absorción es la alternativa más viable para llevar a cabo la expansión del intervalo de respuesta lineal. Como hemos visto en el *Apartado IV.3.4*, aumentando el número de píxeles o sectores de longitudes de ondas utilizados para la evaluación de las señales analíticas es posible mejorar la sensibilidad. Sin embargo, a medida que la concentración de analito crece llega un momento en el que se pierde la respuesta lineal cuando se emplean los píxeles centrales. No obstante, el perfil de absorción de la línea de análisis se ensancha al aumentar la concentración, haciendo factible el uso de los píxeles laterales de las alas

del perfil de absorbancia ( $\pm 1, \pm 2, \pm 3\dots$ ) en lugar de los centrales para llevar a cabo la cuantificación de las señales. A modo de ejemplo, en la **Figura IV.4** se muestra el perfil de absorbancia para patrones de Mg de 10 y 100 mg L<sup>-1</sup> a 202.582 nm. En esta figura podemos ver como el perfil de la línea de Mg para un patrón de 10 mg L<sup>-1</sup> está prácticamente cubierto por 10-12 píxeles, pero al aumentar la concentración de Mg a 100 mg L<sup>-1</sup> el número de píxeles que definen el perfil de absorbancia se extiende sobre aproximadamente 20-22 píxeles.



**Figura IV.4.** Espectro de absorbancia integrada en el tiempo frente a la longitud de onda para patrones de Mg de 10 mg L<sup>-1</sup> (línea azul oscura) y 100 mg L<sup>-1</sup> (línea azul clara) en el entorno espectral de la línea secundaria de Mg a una longitud de onda de 202.582 nm. Los puntos indican los píxeles que definen el perfil de absorción atómica.

Para la cuantificación de las señales de Zn, Mg y Si se investigó el uso de los píxeles de las alas del perfil de la línea, con el fin de reducir la sensibilidad y extender el intervalo de respuesta lineal. Este proceso tiene la ventaja de poder llevarse a cabo después de realizar el análisis de la muestra, sin necesidad de llevar a cabo nuevas medidas. En la **Figura IV.5** se muestran las distintas curvas de calibrado obtenidas para la línea principal de Zn a 213.857 nm (**A**), la línea secundaria de Mg a 202.582 nm (**B**) y la línea principal de Si a 251.612 nm (**C**) usando este enfoque de medida. Como puede observarse, a medida que los píxeles seleccionados para cuantificar las señales se encuentran más alejados del CP (101), la sensibilidad disminuye y el intervalo de respuesta lineal se expande.



**Figura IV.5.** Curvas de calibrado para Zn (A), Mg (B) y Si (C) obtenidas cuando se emplean para la cuantificación de las señales los píxeles 100, 101 y 102 (CP±1); 100 y 102 (Σ (±1)); 99 y 103 (Σ (±2)); 98 y 104 (Σ (±3)); 97 y 105 (Σ (±4)).

El uso de este enfoque para la expansión del intervalo lineal es una opción muy interesante para la determinación de Zn, ya que las líneas secundarias para este elemento son escasas y presentan sensibilidades relativas muy bajas. Como puede verse en la **Figura IV.5A**, el ULLR para Zn cuando se utilizan 3 píxeles (CP±1) para la cuantificación de las señales es de aproximadamente 2.0 mg L<sup>-1</sup>, aumentando hasta los 5.3 mg L<sup>-1</sup> cuando se utilizan la suma de las absorbancias integradas de los píxeles 98 y 104 (Σ (±3)), y a más de 10 mg L<sup>-1</sup> cuando se emplean los píxeles 97 y 105 (Σ (±4)). Asimismo, y aunque se eligió una línea secundaria de Mg con una sensibilidad relativa del 4.3%, el ULLR obtenido utilizando 3 píxeles (CP±1) es de aproximadamente 23 mg L<sup>-1</sup>. Sin embargo, este elemento puede estar presente en algunas muestras medioambientales y alimentarias en mayores concentraciones. En este caso, empleando

la suma de las absorbancias integradas de los píxeles laterales 98 y 104 ( $\Sigma (\pm 3)$ ), o los píxeles 97 y 105 ( $\Sigma (\pm 4)$ ) es posible ampliar el ULLR hasta los 52 mg L<sup>-1</sup> y hasta más de 105 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente (**Figura IV.5B**).

El Si posee numerosas líneas secundarias con distintas sensibilidades relativas, sin embargo, en este caso, el uso de los píxeles laterales para expandir la linealidad permite disminuir la sensibilidad sin necesidad de llevar a cabo nuevas medidas. Esto es especialmente relevante en el caso de este elemento ya que la atomización se lleva a cabo empleando una llama de C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-N<sub>2</sub>O y el coste del análisis es mayor. Como puede observarse en la **Figura IV.5C**, empleando este enfoque es posible aumentar el intervalo de linealidad de 70 mg L<sup>-1</sup> cuando se emplean 3 píxeles (CP±1), a más de 200 mg L<sup>-1</sup> si únicamente se emplean los píxeles 98 y 104 ( $\Sigma (\pm 3)$ ).

A modo de resumen en la **Tabla IV.5** se muestran los intervalos de linealidad para cada uno de los elementos analizados en este apartado.

**Tabla IV.5.** Intervalos de respuesta lineal para Mn, K, Na, Ca, Fe, Zn, Mg y Si empleando diferentes enfoques para la expansión de la linealidad.

Elemento	$\lambda$ (nm)	Píxeles empleados	Intervalo de repuesta lineal (mg L <sup>-1</sup> )
Mn	279.482	CP±1	0.027 - 1.8
	279.827	CP±1	0.047 - 8.4
K	769.897	CP±1	0.11 - 6.0
	404.414	CP±1	2.4 - 160
Na	589.592	CP±2	0.047 - 11
	330.237	CP±2	3.0 - 85
Ca	422.673	CP±1	0.33 - 26
	239.856	CP±2	4.0 - 95
Fe	248.327	CP±1	0.10 - 1.6
	248.814	CP±1	0.25 - 7.2
	302.064 <sup>a</sup>	CP±1	0.28 - 15
	302.107 <sup>a</sup>	CP±1	0.80 - 110
Zn	213.857	CP±1	0.06 - 2.0
		$\Sigma(\pm 1)$	0.13 - 2.5
		$\Sigma(\pm 2)$	0.22 - 3.3
		$\Sigma(\pm 3)$	1.0 - 5.3
		$\Sigma(\pm 4)$	4.3 - 10
Mg	202.582	CP±1	0.4 - 23
		$\Sigma(\pm 1)$	0.7 - 30
		$\Sigma(\pm 2)$	1.1 - 40
		$\Sigma(\pm 3)$	3.0 - 60
		$\Sigma(\pm 4)$	10 - 110
Si	251.611	CP±1	0.5 - 70
		$\Sigma(\pm 1)$	2.2 - 80
		$\Sigma(\pm 2)$	5.0 - 120
		$\Sigma(\pm 3)$	14 - 200

<sup>a</sup> Líneas correspondientes al triplete de Fe

## **IV.4. APLICACIÓN DEL MÉTODO A LA DETERMINACIÓN DE ELEMENTOS MINORITARIOS Y MAYORITARIOS EN MUESTRAS DE INTERÉS MEDIOAMBIENTAL**

En esta aplicación se emplearon las condiciones de trabajo optimizadas en el apartado anterior para desarrollar una metodología de análisis que permita llevar a cabo la determinación secuencial rápida de Cd, Ni, Cu, Pb, Zn, Mn, Fe, Mg, Na, K y Ca en muestras medioambientales en una sola etapa de medida y con un consumo de muestra reducido. Para validar la metodología y comprobar su aplicabilidad al análisis de muestras reales se analizaron un material de referencia de agujas de pino (SRM 1575a), suelos y distintos tipos de aguas naturales como agua de mar y río, y aguas destinadas al consumo como aguas embotelladas y agua de grifo.

### **IV.4.1. Introducción**

La determinación de un elevado número de elementos mayoritarios, minoritarios y traza en muestras de aguas, suelos y plantas es una práctica común en los laboratorios dedicados a estudios medioambientales. Estos análisis son esenciales con el fin de caracterizar las muestras y/o controlar la presencia de elementos tóxicos o contaminantes como metales pesados [18, 19]. Por ejemplo, en un suelo utilizado con fines agrícolas debe analizarse el contenido de ciertos elementos como Fe, Mn, Zn o Cu que favorecen el crecimiento de los cultivos [20], pero también debe controlarse el contenido de elementos tóxicos como Cd o Pb que pueden ser absorbidos por las plantas y pasar posteriormente a nuestro organismo [20-22]. Asimismo, el análisis elemental de estas plantas es una práctica común en el sector agrícola para identificar si existen deficiencias o excesos de nutrientes en los cultivos, lo que ayuda a optimizar y evaluar si es necesario el empleo de fertilizantes [23]. Por otro lado, la composición de las aguas debe controlarse ya que puede cambiar sustancialmente por la progresiva contaminación debido a la agricultura intensiva, la industria y al crecimiento de las zonas urbanas. Además, las aguas destinadas al consumo (agua de grifo o embotellada) deben ser sometidas a estrictos controles de calidad con el fin de asegurar que se cumplen los requisitos legales para su comercialización y consumo [24, 25].

### IV.4.2. Procedimientos

#### IV.4.2.1. Preparación de las disoluciones patrón

Mediante la adecuada dilución de la disolución patrón comercial de cada elemento ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ), se prepararon patrones multielementales que contienen los 11 analitos estudiados en esta aplicación a distintas concentraciones. Todos los patrones contienen HCl y disolución tampón Cs-La al 1% (v/v).

#### IV.4.2.2. Muestras y preparación de muestras

##### - Material de referencia:

Para validar la metodología se empleó el material de referencia certificado SRM 1575a agujas de pino para la determinación de elementos traza (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología, NIST, Gaithersburg, EE. UU.). Dicho material está compuesto por hojas de pino (*Pinus taeda*) de Carolina del Norte, secadas durante 48 h a  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ , molidas y finalmente tamizadas, siendo su tamaño de partícula igual o inferior a  $100 \text{ }\mu\text{m}$ .

##### - Muestra de suelo:

Para evaluar la aplicabilidad del método se recogió una muestra de suelo en una zona rural situada junto al Club de Tiro Cantoblanco ubicado cerca del campus de la Universidad Autónoma de Madrid. Una vez en el laboratorio, la muestra (aproximadamente 1 kg) se dejó secar al aire y a temperatura ambiente entre dos hojas de papel de filtro. Una vez seca, la muestra se tamizó empleando un tamiz con una apertura de malla de 2.0 mm. A continuación, una porción representativa de unos 50 g se molió en mortero de ágata y se tamizó a 0.1 mm empleando un tamiz de nylon. La muestra se conservó en un recipiente cerrado de polietileno.

##### - Tratamiento de digestión del material de referencia SRM 1575a y la muestra de suelo:

Se trataron por triplicado con agua regia empleando un sistema de digestión asistido por microondas. Para ello, se pesaron en torno a 0.25 g de material de referencia o de suelo directamente en los tubos de digestión de PFA, empleando una balanza analítica. A continuación, se añadieron 2.0 mL de  $\text{HNO}_3$  y 6.0 mL de HCl concentrado y se llevó a cabo un tratamiento de digestión consistente en dos etapas de calentamiento



sucesivas, en la que se aplicó una potencia inicial de 500 W durante 3 minutos, y una potencia de 1000 W durante 12 minutos. Los digestores se dejaron enfriar dentro del horno microondas durante al menos 15 minutos. Las disoluciones de las muestras se filtraron y los sucesivos lavados con agua ultrapura del vaso digestor se transfirieron a un matraz de 25.0 mL. Finalmente, se añadió el volumen adecuado de disolución de Cs-La para que la concentración final de este reactivo fuera del 1% (v/v), y se completó hasta el volumen final con agua ultrapura. Las disoluciones de las muestras se conservaron a 4 °C en recipientes cerrados de polietileno hasta su análisis.

- **Aguas naturales y aguas de consumo:**

Se analizaron distintos tipos de aguas: aguas naturales de río y mar, y aguas de consumo como distintas aguas embotelladas y agua de grifo. Las muestras de agua embotellada (Aquabona®, Solan de Cabras® y San Joaquín®) se compraron en supermercados de la Comunidad de Madrid. La muestra de agua de grifo se tomó en el laboratorio de nuestro grupo de investigación ubicado en el Departamento de Química Analítica y Análisis Instrumental de la Universidad Autónoma de Madrid. Para ello, se dejó correr el agua durante varios minutos antes de recoger la muestra. La muestra de agua de río se tomó en el Río Ebro a su paso por Miranda de Ebro (Burgos, España), y la muestra de agua de mar se recogió en la costa del Mar Mediterráneo en Denia (Alicante, España). Las aguas se filtraron a través de un filtro de membrana de acetato de celulosa de 0.45 µm y se conservaron refrigeradas a una temperatura de 4°C en recipientes cerrados de polietileno hasta su análisis.

Para llevar a cabo el análisis de las distintas aguas, un volumen de 20 mL se transfirió a un matraz aforado de 25.0 mL, donde se adicionó el volumen necesario de disolución comercial de Cs-La y de HCl al 37% para que la concentración final de ambos reactivos fuera de un 1% (v/v), completándose hasta el volumen final con agua ultrapura. Todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado, empleando tres alícuotas de la misma muestra.

### *IV.4.2.3. Procedimiento de medida y parámetros instrumentales*

La determinación de Cd, Ni, Cu, Pb, Zn, Mn, Fe, Mg, Na, K y Ca se llevó a cabo secuencialmente en una sola etapa de medida usando una llama de C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-aire y el modo de introducción de muestra en discontinuo, empleando los parámetros instrumentales optimizados en el *Apartado IV.3*. La secuencia de medida se establece de manera automática en función del flujo creciente de gas combustible. De este modo, el análisis se realizó en el siguiente orden: Cd, Ni, Cu, Zn, Ca, Mn, Pb, Mg, Fe, K, y Na.

Todos los elementos se determinaron por triplicado empleando las condiciones más apropiadas de medida, sin necesidad de realizar ninguna dilución adicional de la muestra, tras interpolar los valores de absorbancia integrada promedio en la curva de calibrado correspondiente.

### **IV.4.3. Resultados y discusión**

#### *IV.4.3.1. Calibración y evaluación de los parámetros analíticos*

En la **Tabla IV.6** se muestran los parámetros analíticos obtenidos para la determinación secuencial de Cd, Ni, Cu, Pb, Zn, Mn, Fe, Mg, Na, K y Ca. Los LODs, LOQs y los límites superiores de linealidad (ULLR) para cada analito se calcularon como se describe en los procedimientos generales del *Capítulo III* (Apartado III.3.2, página 48).

En todos los casos, los coeficientes de correlación de Pearson ( $r$ ) encontrados son superiores a 0.995. Gracias al uso de varias líneas de trabajo de Mn, Fe, Ca, Na y K con diferentes sensibilidades relativas se han conseguido establecer intervalos lineales de hasta tres órdenes de magnitud. Como se puede apreciar en la **Tabla IV.6**, la disminución de las pendientes de las curvas de calibrado cuando se emplean las líneas secundarias con las sensibilidades más bajas, no producen un incremento proporcional en los valores de LOD, dado que los LODs dependen de la desviación estándar del blanco, y éstas pueden variar para cada línea de absorción empleada debido a las diferentes relaciones de señal-ruido observadas a cada longitud de onda.

**Tabla IV.6.** Parámetros analíticos obtenidos para la determinación secuencial de Cd, Ni, Pb, Cu, Zn, Mn, Mg, Fe, Ca, Na y K en HCl y Cs-La al 1%.

Elemento	$\lambda$ (nm)	Pendiente (s L mg <sup>-1</sup> )	$r$	ULLR (mg L <sup>-1</sup> )	LOD (mg L <sup>-1</sup> )	LOQ (mg L <sup>-1</sup> )	Repetitividad (%)	Reproducibilidad (%)
Cd	228.802	0.2843	0.9966	2.6	0.011	0.037	0.3 – 3.3	1.5 – 8.0
Ni	232.003	0.0780	0.9990	7.5	0.020	0.067	0.8 – 4.0	2.5 – 8.5
Pb	217.001	0.0427	0.9994	7.8	0.062	0.21	0.7 – 4.2	4.6 – 8.2
Cu	324.754	0.1664	0.9987	5.0	0.007	0.023	0.6 – 3.5	5.0 – 8.0
Zn	213.857	0.3912	0.9963	2.2	0.014	0.046	0.2 – 2.7	2.3 – 8.7
Mn	279.482	0.2442	0.9998	1.8	0.008	0.027	1.1 – 2.5	2.4 – 8.5
	279.827	0.1660	0.9996	8.4	0.014	0.047	0.1 – 3.5	4.5 – 8.2
Mg	202.582	0.0545	0.9995	23	0.13	0.42	0.8 – 2.7	3.9 – 7.5
Fe	248.327	0.0862	0.9998	1.6	0.030	0.10	1.4 – 4.9	3.8 – 8.3
	248.814	0.0413	0.9998	7.2	0.075	0.25	0.7 – 2.5	2.0 – 4.8
	302.064	0.0191	0.9997	15	0.085	0.28	0.4 – 3.4	4.1 – 8.6
	302.107	0.0057	0.9996	110	0.24	0.80	1.2 – 6.0	6.0 – 10.0
Ca	422.673	0.0511	0.9994	26	0.099	0.33	0.2 – 5.2	1.5 – 6.9
	239.856	0.0007	0.9983	95	1.2	4.0	1.5 – 6.1	4.6 – 9.1
Na	589.592	0.2273	0.9998	11	0.014	0.047	0.1 – 2.3	4.7 – 8.1
	330.237	0.0042	0.9983	85	0.91	3.0	0.4 – 4.2	3.0 – 8.2
K	769.897	0.1540	0.9999	6.0	0.032	0.11	0.4 – 3.4	3.0 – 9.5
	404.414	0.0016	0.9995	160	0.72	2.4	1.2 – 5.4	2.1 – 10.5

Los valores de los LODs y LOQs obtenidos son similares e incluso en algunos casos mejores a los publicados previamente en la bibliografía por otros autores empleando HR-CS FAAS con el modo de introducción de muestra en continuo [3, 5, 8, 16] o en discontinuo [16, 17]. La precisión, expresada como desviación estándar relativa (RSD) se evaluó en términos de repetitividad y reproducibilidad. Para el estudio de repetitividad, se midieron por triplicado las disoluciones acuosas multielementales preparadas a dos concentraciones diferentes de cada metal. Para estimar la reproducibilidad, las medidas de estas disoluciones se llevaron a cabo en cinco días diferentes. Como puede verse en la **Tabla IV.6**, los valores de RSD obtenidos se encuentran por debajo del 6% para la repetitividad y del 11% para la reproducibilidad para todos los analitos.

## IV.4.3.2. Validación de la metodología y análisis de las muestras

## - Material de referencia:

Para la validación de la metodología, se analizó el material de referencia SRM 1575a tras su digestión en agua regia. En la **Tabla IV.7** se muestran las concentraciones de los elementos analizados aplicando la metodología desarrollada, así como los contenidos certificados y de referencia de estos elementos en dicho material.

**Tabla IV.7.** Resultados (media  $\pm$  desviación estándar) obtenidos para Cd, Ni, Pb, Cu, Zn, Mn, Mg, Fe, Ca, Na y K (n=3), y valores certificados o de referencia en el material de referencia SRM 1575a.

Elemento	Valor encontrado (mg kg <sup>-1</sup> )	Valor en el certificado (mg kg <sup>-1</sup> )
Cd	<1.1	0.233 $\pm$ 0.004 <sup>a</sup>
Cu	3.2 $\pm$ 0.4	2.8 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>
Fe	48 $\pm$ 5	46 $\pm$ 2 <sup>a</sup>
Zn	36 $\pm$ 1	38 $\pm$ 2 <sup>a</sup>
Pb	<6.2	0.167 $\pm$ 0.015 <sup>b</sup>
Mn	475 $\pm$ 6	488 $\pm$ 12 <sup>b</sup>
Ni	<2.0	1.47 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>
Na	66 $\pm$ 7	63 $\pm$ 1 <sup>b</sup>
K	(3.7 $\pm$ 0.7) $\times$ 10 <sup>3</sup>	(4.17 $\pm$ 0.07) $\times$ 10 <sup>3</sup> <sup>a</sup>
Ca	(1.9 $\pm$ 0.3) $\times$ 10 <sup>3</sup>	(2.5 $\pm$ 0.1) $\times$ 10 <sup>3</sup> <sup>a</sup>
Mg	(9.9 $\pm$ 1) $\times$ 10 <sup>2</sup>	(1.06 $\pm$ 0.17) $\times$ 10 <sup>3</sup> <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Valor certificado ; <sup>b</sup> Valor de referencia

Como puede verse en la **Tabla IV.7**, las concentraciones de Cd, Pb y Ni en las disoluciones procedentes de la digestión del material de agujas de pino se encuentran por debajo del LOD de la metodología desarrollada. Dichos LODs se calcularon a partir de los valores obtenidos en la **Tabla IV.6** para una masa de muestra de 250 mg (aproximadamente el peso de muestra empleado en la digestión de este material). Los resultados obtenidos para Fe, Zn, Cu, Mn, Na, K, Ca y Mg son estadísticamente iguales a los valores certificados o de referencia de acuerdo con la prueba t de Student para un nivel de confianza del 95%. Adicionalmente, se llevaron a cabo pruebas de recuperación, agregando a una de las disoluciones de las digestiones del material certificado distintas alícuotas de concentraciones conocidas de estos 11 elementos (**Tabla IV.8**).

**Tabla IV.8.** Concentraciones (media  $\pm$  desviación estándar) y porcentajes de recuperación obtenidos para Cd, Ni, Pb, Cu, Zn, Mn, Mg, Fe, Ca, Na y K, en una réplica de la digestión de SRM 1575a (n = 3).

Elemento	Añadido (mg L <sup>-1</sup> )	Encontrado (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)
Cd	-	< LOD	-
	0.8	0.75 $\pm$ 0.02	94
Cu	-	0.032 $\pm$ 0.002	-
	0.8	0.77 $\pm$ 0.01	93
Fe	-	0.47 $\pm$ 0.02	-
	0.8	1.21 $\pm$ 0.03	95
Zn	-	0.35 $\pm$ 0.01	-
	0.8	1.12 $\pm$ 0.03	97
Pb	-	< LOD	-
	0.8	0.76 $\pm$ 0.04	95
Mn	-	4.6 $\pm$ 0.1	-
	2.0	6.8 $\pm$ 0.2	103
Ni	-	< LOD	-
	0.8	0.74 $\pm$ 0.04	93
Na	-	0.65 $\pm$ 0.02	-
	0.8	1.47 $\pm$ 0.05	101
K	-	36 $\pm$ 1	-
	20	54 $\pm$ 2	97
Ca	-	18.6 $\pm$ 0.5	-
	10	28 $\pm$ 1	98
Mg	-	9.7 $\pm$ 0.2	-
	5.0	14.7 $\pm$ 0.7	100

Como podemos ver en la tabla, las recuperaciones obtenidas fueron adecuadas para todos los elementos, encontrándose los valores de recuperación entre el 93% y 103%.

**- Muestra de suelo:**

El contenido de Fe en la muestra de suelo y de aquellos elementos considerados de interés por su posible toxicidad o por estar regulados en normativas de suelos (Cd, Pb, Cu, Ni, Mn y Zn) se determinó tras llevar a cabo su disolución en agua regia. En la **Tabla IV.9** se muestran los valores obtenidos para estos elementos, así como los valores de referencia (VR90) establecidos para suelos de la Comunidad de Madrid [26].

**Tabla IV.9.** Resultados (media  $\pm$  desviación estándar) obtenidos para Cd, Ni, Pb, Cu, Zn, Mn y Fe, en la muestra de suelo (n = 3).

Elemento	Valor encontrado (mg kg <sup>-1</sup> )	VR90 <sup>a</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )
Cd	<1.1	0.22
Cu	73 $\pm$ 6	20
Fe	$\approx$ (3.2x10 <sup>4</sup> ) <sup>b</sup>	-
Zn	227 $\pm$ 4	70
Pb	331 $\pm$ 5	30
Mn	560 $\pm$ 2	690
Ni	41 $\pm$ 5	21

<sup>a</sup> Valor de referencia (percentil 90) establecido en la legislación de la Comunidad de Madrid [26]

<sup>b</sup> Estimado empleando la línea del triplete de Fe a 302.049 nm (sensibilidad relativa: 2.4%)

Como puede apreciarse en la **Tabla IV.9**, el contenido de Cd en las disoluciones de suelo es menor al LOD obtenido para la metodología y calculado para una masa de muestra de 250 mg. Por otra parte, la concentración de Fe en estas disoluciones es superior al límite superior de linealidad para el Fe (110 mg L<sup>-1</sup>), por lo que su contenido no pudo cuantificarse de forma precisa y solo se estimó utilizando la señal de absorbancia del triplete de Fe a 302.049 nm (sensibilidad relativa de 2.4%). El contenido de Cu, Zn, Ni y Pb encontrado en el suelo analizado es superior al valor de referencia para suelos naturales establecido en la Comunidad de Madrid [26]. Cuando el contenido de alguno de los elementos supera el valor de referencia VR90 es necesario evaluar el tipo de uso (industrial, urbano u otros usos) para el que estos suelos pueden ser aptos. Considerando los niveles genéricos de referencia para suelos contaminados establecidos por la Comunidad de Madrid, el contenido de Cu (<80 mg kg<sup>-1</sup>), Ni (<405 mg kg<sup>-1</sup>), Zn (<1170 mg kg<sup>-1</sup>) en este suelo sería apto para desarrollar actividades agrícolas, forestales y ganaderas (otros usos del suelo). Sin embargo, el suelo presenta un contenido de Pb muy superior al establecido para desarrollar este tipo de actividades (<75 mg kg<sup>-1</sup>), y es ligeramente superior al valor establecido para ser apto para uso urbano (<270 mg kg<sup>-1</sup>), por lo que el único uso permitido para este suelo sería el uso industrial. Dado que la zona en la que se tomaron estas muestras se encuentra muy próxima a un campo de tiro (*Club de tiro Cantoblanco*), el alto contenido de Pb encontrado en este suelo podría deberse a una posible contaminación por la munición empleada en dicho club.

Para evaluar la validez de los análisis, una de las tres disoluciones de suelo se fortificó con concentraciones conocidas de los analitos y se calcularon los porcentajes de recuperación (**Tabla IV.10**). Como puede apreciarse en la tabla, se obtuvieron buenas recuperaciones para todos los elementos analizados, encontrándose los valores de recuperación calculados para todos los elementos entre el 96 y 104%.

**Tabla IV.10.** Concentraciones (media  $\pm$  desviación estándar) y porcentajes de recuperación obtenidos para Cd, Ni, Pb, Cu, Zn, Mn y Fe, en una de las réplicas de la disolución de muestra de suelo (n = 3).

Elemento	Añadido (mg L <sup>-1</sup> )	Encontrado (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)
Cd	-	< LOD	-
	0.800	0.77 $\pm$ 0.02	96
Ni	-	0.29 $\pm$ 0.01	-
	0.800	1.12 $\pm$ 0.09	103
Pb	-	2.38 $\pm$ 0.09	-
	0.800	3.2 $\pm$ 0.1	102
Zn	-	1.63 $\pm$ 0.05	-
	0.400	2.11 $\pm$ 0.07	104
Cu	-	0.521 $\pm$ 0.007	-
	0.800	1.30 $\pm$ 0.02	98
Mn	-	4.02 $\pm$ 0.03	-
	2.00	6.07 $\pm$ 0.05	101

- **Muestras de aguas naturales y aguas de consumo:**

Se analizaron distintas muestras de agua naturales y aguas de consumo. En todas las muestras analizadas las concentraciones de Cd, Ni, Pb, Zn, Cu, Fe y Mn fueron menores a los correspondientes LODs obtenidos en esta metodología. Con el fin de evaluar la validez del método para la determinación de estos elementos en aguas, las muestras de agua de grifo, de río, de mar y una de las muestras de agua embotellada se fortificaron con Cd, Ni, Pb, Zn, Cu y Mn a diferentes niveles de concentración entre 0.20 y 4.0 mg L<sup>-1</sup>, y con una concentración de Fe entre 0.60 y 100 mg L<sup>-1</sup>. En la **Tabla IV.11** se muestran las concentraciones encontradas para cada uno de los elementos adicionados en las muestras, así como los porcentajes de recuperación obtenidos.

**Tabla IV.11.** Concentraciones (media  $\pm$  desviación estándar) y porcentajes de recuperación para Cd, Ni, Pb, Zn, Cu, Fe y Mn en las muestras fortificadas de agua embotellada Solan de Cabras®, agua de grifo, agua de río y agua de mar (n=3).

	Solan de Cabras®			Agua de grifo		Agua de río		Agua de mar	
	Añadido (mg L <sup>-1</sup> )	Encontrado (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)	Encontrado (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)	Encontrado (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)	Encontrado (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)
Cd	0.20	0.21 $\pm$ 0.01	105	0.19 $\pm$ 0.02	95	0.20 $\pm$ 0.01	100	0.23 $\pm$ 0.02	115
	1.00	1.04 $\pm$ 0.06	104	1.07 $\pm$ 0.02	107	1.04 $\pm$ 0.02	104	1.12 $\pm$ 0.02	112
	2.00	2.03 $\pm$ 0.03	102	2.04 $\pm$ 0.06	102	2.10 $\pm$ 0.09	105	2.14 $\pm$ 0.05	107
Ni	0.20	0.19 $\pm$ 0.01	95	0.19 $\pm$ 0.02	95	0.21 $\pm$ 0.02	105	0.18 $\pm$ 0.01	92
	1.00	1.01 $\pm$ 0.03	101	1.03 $\pm$ 0.01	103	0.96 $\pm$ 0.04	96	0.93 $\pm$ 0.08	93
	2.00	2.11 $\pm$ 0.03	105	2.06 $\pm$ 0.03	103	1.99 $\pm$ 0.03	99	1.89 $\pm$ 0.04	95
Pb	0.60	0.60 $\pm$ 0.07	100	0.56 $\pm$ 0.03	93	0.58 $\pm$ 0.03	97	0.62 $\pm$ 0.03	103
	1.00	0.99 $\pm$ 0.04	99	0.96 $\pm$ 0.07	96	0.97 $\pm$ 0.03	97	1.04 $\pm$ 0.08	104
	4.00	3.97 $\pm$ 0.09	99	3.97 $\pm$ 0.21	99	4.19 $\pm$ 0.09	105	4.12 $\pm$ 0.09	103
Zn	0.20	0.22 $\pm$ 0.02	110	0.20 $\pm$ 0.02	100	0.21 $\pm$ 0.01	106	0.21 $\pm$ 0.01	106
	1.00	1.05 $\pm$ 0.09	105	1.05 $\pm$ 0.07	105	1.01 $\pm$ 0.09	101	1.06 $\pm$ 0.06	106
	2.00	1.98 $\pm$ 0.02	99	2.06 $\pm$ 0.07	103	1.96 $\pm$ 0.05	98	2.01 $\pm$ 0.06	101
Cu	0.20	0.20 $\pm$ 0.01	100	0.20 $\pm$ 0.01	100	0.21 $\pm$ 0.02	105	0.19 $\pm$ 0.01	95
	1.00	1.03 $\pm$ 0.02	103	1.02 $\pm$ 0.05	102	0.97 $\pm$ 0.08	97	1.01 $\pm$ 0.02	101
	2.00	1.90 $\pm$ 0.04	95	1.92 $\pm$ 0.03	96	1.98 $\pm$ 0.03	99	1.85 $\pm$ 0.06	93
Fe	0.60	0.63 $\pm$ 0.06	105	0.54 $\pm$ 0.01	90	0.60 $\pm$ 0.03	100	0.57 $\pm$ 0.03	95
	1.00	1.01 $\pm$ 0.03	101	1.01 $\pm$ 0.04	101	0.92 $\pm$ 0.02	92	1.06 $\pm$ 0.03	106
	6.00	5.46 $\pm$ 0.15	91	6.58 $\pm$ 0.04	110	6.01 $\pm$ 0.03	100	5.83 $\pm$ 0.09	97
	10.0	9.84 $\pm$ 0.34	98	10.1 $\pm$ 0.13	101	10.3 $\pm$ 0.08	103	8.84 $\pm$ 0.13	88
Mn	0.20	0.18 $\pm$ 0.01	90	0.20 $\pm$ 0.01	100	0.21 $\pm$ 0.01	105	0.21 $\pm$ 0.01	105
	1.00	1.01 $\pm$ 0.05	101	1.00 $\pm$ 0.06	100	0.99 $\pm$ 0.02	99	0.97 $\pm$ 0.10	97
	2.00	2.03 $\pm$ 0.04	102	2.04 $\pm$ 0.05	102	2.01 $\pm$ 0.09	101	1.94 $\pm$ 0.05	97



Como puede verse en la **Tabla IV.11**, las concentraciones encontradas para todos los elementos presentan una buena concordancia con los valores de concentración añadida. De hecho, las recuperaciones obtenidas variaron entre el 95-115% para Cd, 92-105% para Ni, 93-105% para Pb, 99-110% para Zn, 93-105% para Cu, 88 -110% para Fe y 91-105% para Mn. Es importante señalar que, a diferencia de la metodología desarrollada por Peña-Vázquez *et al.* [8], donde la muestra se mide empleando el modo continuo y tuvo que emplearse la adición estándar como método de calibración para la determinación de Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn en muestras con un alto contenido salino, en la presente tesis gracias al empleo del modo de introducción de muestra en discontinuo ha sido posible llevar a cabo la determinación de estos metales en agua de mar sin necesidad de diluir excesivamente la muestra y empleando la calibración por patrón externo.

También se determinaron las concentraciones de Ca, Mg, Na y K en las muestras de aguas. Con el fin de estudiar la versatilidad de la metodología desarrollada se eligieron muestras de aguas embotelladas con diferentes contenidos de estos elementos. Los resultados obtenidos en las tres muestras de agua mineral embotellada analizadas se muestran en la **Tabla IV.12**. Como puede apreciarse en la tabla, las concentraciones de Na, K, Mg y Ca encontrados en estas aguas no presentan diferencias significativas con los valores indicados en las etiquetas de estas muestras (prueba t de Student para un nivel de confianza del 95%).

**Tabla IV.12.** Concentraciones obtenidas (media  $\pm$  desviación estándar) de Na, K, Ca y Mg, y valores indicados en las etiquetas para las muestras analizadas de agua embotellada (n = 3).

<i>Elemento</i>	<b>Solan de Cabras®</b>		<b>Aquabona®</b>		<b>San Joaquin®</b>	
	<i>Encontrado (mg L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Indicado (mg L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Encontrado (mg L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Indicado (mg L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Encontrado (mg L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Indicado (mg L<sup>-1</sup>)</i>
Na	4.8 $\pm$ 0.3	5.1	2.2 $\pm$ 0.2	2.1	8.5 $\pm$ 0.4	8.6
K	1.12 $\pm$ 0.06	1.1	0.28 $\pm$ 0.01	-	1.80 $\pm$ 0.07	-
Ca	53 $\pm$ 3	59.4	82 $\pm$ 5	90.4	33 $\pm$ 1	35.2
Mg	26.3 $\pm$ 0.8	25.6	2.7 $\pm$ 0.03	2.7	16.5 $\pm$ 0.7	15.1

En la **Tabla IV.13** se muestran las concentraciones de Ca, Mg, Na y K para una de las aguas embotelladas, el agua de río y el agua de grifo, así como los porcentajes de recuperación encontrados cuando alícuotas de estas muestras se fortificaron con distintas concentraciones de dichos elementos. Estos elementos no se determinaron en la muestra de agua de mar dado su alto contenido. Asimismo, los porcentajes de recuperación obtenidos para estas muestras variaron entre el 92-113% para Ca, 103-106% para Mg, 97-106% para Na, y 101-111% para K.

**Tabla IV.13.** Concentraciones (media  $\pm$  desviación estándar) y porcentajes de recuperación obtenidos para Ca, Mg, Na y K en una muestra fortificada de agua embotellada Solan de Cabras®, agua de grifo y agua de río (n=3).

	Solan de Cabras®			Agua de grifo			Agua de río		
	Añadido (mg L <sup>-1</sup> )	Encontrado (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)	Añadido (mg L <sup>-1</sup> )	Encontrado (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)	Añadido (mg L <sup>-1</sup> )	Encontrado (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)
Ca	-	53 $\pm$ 3	-	-	9.7 $\pm$ 0.8	-	-	42 $\pm$ 2	-
	25.0	77 $\pm$ 5	92	6.00	15 $\pm$ 1	96	25.0	76 $\pm$ 6	113
Mg	-	26.3 $\pm$ 0.8	-	-	1.67 $\pm$ 0.07	-	-	8.72 $\pm$ 0.09	-
	10.0	36.9 $\pm$ 0.3	103	10.0	12.4 $\pm$ 1.2	106	10.0	19.6 $\pm$ 0.08	105
Na	-	4.8 $\pm$ 0.3	-	-	11.2 $\pm$ 0.8	-	-	53.3 $\pm$ 0.5	-
	2.50	7.5 $\pm$ 0.2	99	2.50	13.3 $\pm$ 1.1	97	25.0	83 $\pm$ 6	106
K	-	1.12 $\pm$ 0.06	-	-	0.97 $\pm$ 0.01	-	-	2.0 $\pm$ 0.2	-
	2.50	3.83 $\pm$ 0.04	106	2.50	3.49 $\pm$ 0.02	101	2.50	5.0 $\pm$ 0.3	111

## IV.5. APLICACIÓN DEL MÉTODO A LA DETERMINACIÓN DE Zn, Cu, Mn, Mg Y Si EN MUESTRAS DE INTERES ALIMENTARIO

Las condiciones de trabajo optimizadas en el *Apartado IV.3* se han aplicado para llevar a cabo la determinación multielemental rápida y con poco consumo de muestra de Mg, Mn, Cu, Zn y Si en siete bebidas comerciales a base de preparados de frutas y extractos de té, seis infusiones preparadas a partir de distintas hierbas y dos suplementos alimenticios comerciales, sin necesidad de realizar tratamiento previo de las muestras.

### IV.5.1. Introducción

Elementos como Zn, Cu, Mn y Mg son considerados minerales esenciales requeridos por el organismo para su buen funcionamiento, ya que tienen un papel fundamental en numerosos procesos vitales. Por ello, es importante que las concentraciones de estos elementos se encuentren dentro de los niveles adecuados, ya que tanto la carencia como el exceso de minerales pueden acarrear consecuencias graves para la salud. Otros elementos como Si, a pesar de que existen ciertas evidencias de que su consumo es beneficioso para el organismo, no son aún considerados minerales esenciales dado que hasta la fecha no se ha demostrado que estén directamente implicados en ninguna función bioquímica concreta [27,28].

Estos elementos se incorporan al organismo a través de la ingesta estando muy vinculada su concentración en el cuerpo a los hábitos alimentarios de la población. Después del agua, las bebidas no alcohólicas más consumidas en todo el mundo son las infusiones, zumos y bebidas refrescantes, por lo que estas bebidas constituyen una de las principales fuentes de obtención de estos elementos esenciales. Por otro lado, para compensar las deficiencias en la ingesta de estos nutrientes se comercializan un gran número de suplementos alimenticios que incorporan vitaminas y minerales. Dado el alto consumo de estas bebidas y suplementos alimenticios es importante que estos productos se sometan a estrictos controles para garantizar que se cumplen los criterios de calidad establecidos antes de su comercialización [29].

El análisis de estas bebidas se realiza comúnmente empleando técnicas atómicas como AAS, ICP-OES o ICP-MS [30-32]. Sin embargo, la determinación de elementos en este tipo de muestras puede verse afectada por la aparición de interferencias, debidas principalmente a las altas cantidades de sustancias solubles como azúcares, proteínas o diferentes aditivos como conservantes o estabilizantes. Estas interferencias pueden ser especialmente relevantes a la hora de determinar Si, ya que la respuesta analítica de este elemento es muy dependiente de la especie química y de la naturaleza de la muestra, y suele verse afectada por la aparición de interferencias espectrales y no espectrales en la mayoría de las técnicas atómicas [33-35]. Las principales dificultades cuando se emplean métodos basados en AAS para la determinación de Si, surgen debido a que las líneas más sensibles de este elemento (251.611/ 251.432 nm) se encuentran a longitudes de onda muy bajas donde es más frecuente encontrar superposiciones espectrales con moléculas diatómicas como PO, CS o NO [1,36,37].

Para minimizar la aparición de interferencias debidas a las características de la matriz de muestra, la mayor parte de las metodologías analíticas requieren de una etapa inicial de tratamiento de muestra (digestión, extracción, centrifugación y filtración, o dilución extrema de la muestra) y/o necesitan el empleo de métodos de calibración por adición estándar para lograr resultados adecuados [31,32,38-43]. Estos procedimientos suelen aumentar considerablemente la cantidad de muestra y el tiempo requerido para llevar a cabo el análisis. Por otra parte, los procedimientos de digestión de muestra empleados habitualmente para la destrucción de la matriz, aumentan las posibilidades de que se produzcan pérdidas de los analitos y/o se contaminen las muestras. Los riesgos asociados a estos procedimientos son especialmente relevantes en la determinación de Si debido a la ubicuidad de este elemento y a la alta volatilidad de algunos compuestos de Si [33]. De hecho, en un estudio interlaboratorio sobre la determinación de Si en muestras biológicas y de alimentos mediante técnicas atómicas [44], los principales problemas encontrados en estos análisis son consecuencia de la necesidad de someter a las muestras a tratamientos como la digestión total antes del análisis.

Ante esta problemática, la optimización de métodos que permitan llevar a cabo el análisis directo o con un mínimo tratamiento de muestra es una estrategia muy atractiva que puede simplificar y agilizar la caracterización de estos productos y minimizar los problemas en la determinación de Si derivados de los tratamientos de muestra [31,32, 45-47].

Como se ha comentado en la introducción de este capítulo y tal como hemos podido demostrar en la aplicación anterior, la HR-CS FAAS presenta excelentes prestaciones para desarrollar métodos de análisis multielemental. Además, gracias a la mejor capacidad de corrección de fondo y a la monitorización simultánea de una pequeña región del espectro alrededor de la línea de análisis estos equipos permiten detectar con mayor facilidad si se producen interferencias espectrales debidas a la matriz de la muestra, facilitando el desarrollo de metodologías de análisis directas sobre muestras con nulo o escaso tratamiento.

### IV.5.2. Procedimientos

#### IV.5.2.1. Preparación de las disoluciones patrón

Se prepararon patrones multielementales de Mg, Mn, Cu, Zn y Si, por adecuada dilución de las disoluciones comerciales ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) de cada uno de ellos. En estas disoluciones se añadieron las cantidades necesarias de  $\text{HNO}_3$  al 65% y de La de  $100 \text{ g L}^{-1}$ , de modo que la concentración de estos reactivos en la disolución final fuese del 0.6% y de  $10 \text{ g L}^{-1}$  respectivamente.

#### IV.5.2.2. Muestras y preparación de muestras

##### - Bebidas refrescantes:

Se analizaron siete bebidas comerciales: una bebida isotónica o deportiva de sabor cítrico, un refresco de té al limón, un mosto, una limonada, una naranjada, una bebida preparada a partir de zumo de manzana concentrado y una bebida que contiene zumo de uva y granada concentrado. Todas estas bebidas se adquirieron en supermercados de la Comunidad de Madrid. Las muestras se conservaron en sus envases originales a

temperatura ambiente, y se agitaron cuidadosamente con el fin de homogenizarlas antes de ser analizadas. Una vez abiertos los envase, se conservaron refrigeradas.

Para llevar a cabo el análisis de estas bebidas, se transfirió un volumen de 20 mL de muestra a un matraz aforado de 25.0 mL donde se adicionó el volumen necesario de la disolución de La de  $100 \text{ g L}^{-1}$  y de  $\text{HNO}_3$  al 65% para que la concentración final de estos reactivos fuera de  $10 \text{ g L}^{-1}$  y del 0.6 % respectivamente, enrasándose hasta el volumen final con agua ultrapura. Todas las muestras se prepararon por triplicado.

- **Muestras para la preparación de infusiones:**

Se prepararon infusiones a partir de seis tipos diferentes de hierbas. Para ello, se utilizaron hojas secas de té verde, negro y rojo, hojas secas de rooibos, tallos secos de cola de caballo y flor de manzanilla. Estas muestras se adquirieron en supermercados de la Comunidad de Madrid en forma de bolsitas manufacturadas individuales y selladas, a excepción de los tallos secos de cola de caballo que se adquirieron en una herboristería en paquetes de mayor tamaño. Para la preparación de las infusiones se pesó en torno a 1.0 g de muestra (aproximadamente el peso contenido en las bolsitas comerciales) en un vaso de precipitado. A continuación, se añadieron 100 mL de agua ultrapura hirviendo y se dejó extraer la muestra durante 5 minutos. Finalmente, la infusión se filtró a través de papel de filtro para eliminar el residuo herbáceo y se dejó enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente. Para preparar la infusión a partir de los tallos secos de cola de caballo el tiempo para obtener la infusión se aumentó de 5 a 15 minutos siguiendo la recomendación indicada en la etiqueta del paquete.

Para llevar a cabo el análisis de las infusiones, se tomaron 20 mL de cada una de ellas diluyéndose como ha sido indicado para las muestras de bebidas refrescantes. Todas las muestras se prepararon por triplicado.

- **Suplementos alimenticios:**

Se analizaron dos suplementos alimenticios comerciales, uno preparado a partir de extracto de cola de caballo y otro a partir de extracto de plantas de ortiga. Las muestras de suplementos alimenticios se adquirieron en herbolarios de la Comunidad de Madrid y se conservaron en su envase original a temperatura ambiente hasta llevar

a cabo su análisis. Antes del análisis, las muestras se agitaron cuidadosamente de manera manual para su homogenización.

Para llevar a cabo el análisis de estos suplementos, las muestras se diluyeron de manera similar a las bebidas refrescantes y las infusiones utilizando una alícuota de 10 mL de cada muestra. Todas las muestras se prepararon por triplicado.

### *IV.5.2.3. Procedimiento de medida y parámetros instrumentales*

La determinación de Cu, Zn, Mn, Mg y Si se llevó a cabo secuencialmente empleando el modo de introducción de muestra en discontinuo y los parámetros instrumentales optimizados en el *Apartado IV.3*. La determinación de estos 5 elementos se llevó a cabo en dos secuencias de medida de acuerdo al tipo de llama y en función del flujo creciente de gas combustible de acuerdo con el siguiente orden: 1) Cu, Zn, Mn y Mg empleándose una llama de C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-aire; 2) Si empleándose una llama de C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-N<sub>2</sub>O.

Todos los elementos se determinaron bajo las condiciones óptimas, sobre la misma muestra, sin necesidad de llevar a cabo diluciones adicionales. Las muestras se midieron por triplicado, interpolándose los valores promedio de absorbancia integrada de cada analito en la curva de calibrado correspondiente.

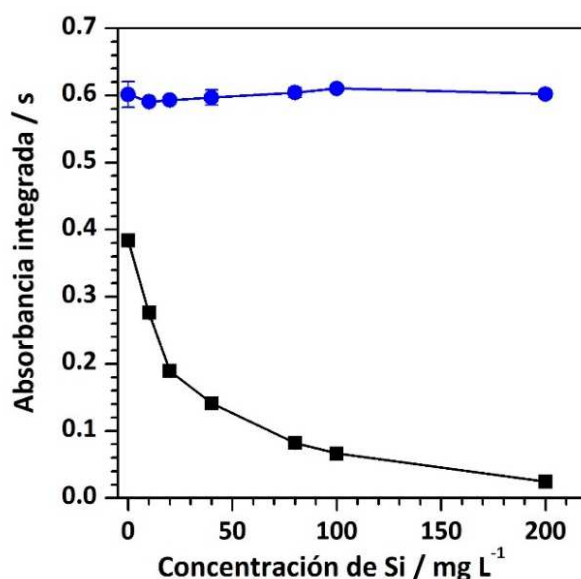
### **IV.5.3. Resultados y discusión**

#### *IV.5.3.1. Estudio de la cantidad de modificador de lantano*

La determinación de metales alcalinotérreos como Ca o Mg mediante FAAS puede verse afectada por la presencia de grandes cantidades de P, Al y Si en las muestras debido a la formación de compuestos químicos difíciles de disociar [1]. Dado que en esta aplicación se pretende llevar a cabo la determinación conjunta de Cu, Zn, Mn, Mg y Si y teniendo en cuenta la posible interferencia de Si sobre el Mg, se investigó la influencia que concentraciones crecientes de este elemento ejercen sobre la señal de Mg. Para ello, se prepararon disoluciones patrón de 10.0 mg L<sup>-1</sup> de Mg en presencia de diferentes concentraciones de Si y se midieron sus absorbancias aplicando las condiciones previamente optimizadas en el *Apartado IV.3*.



Como puede observarse en la **Figura IV.7**, a medida que aumenta la concentración de Si en las disoluciones la señal de Mg decrece significativamente.

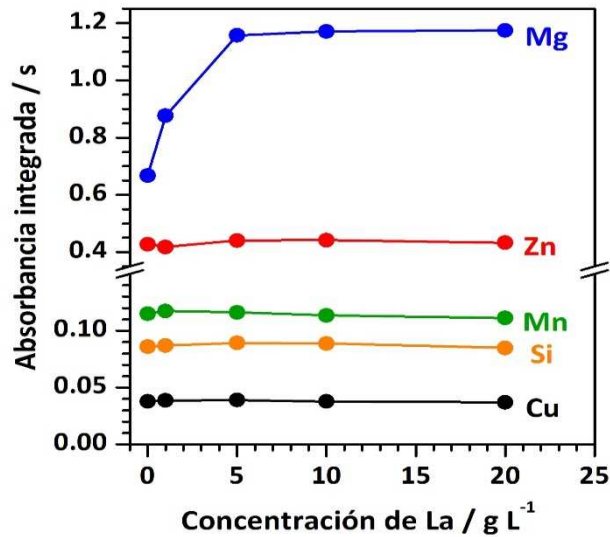


**Figura IV.7.** Influencia de la concentración de Si sobre los valores de absorbancia integrados de Mg para disoluciones patrón de Mg de 10 mg L<sup>-1</sup> en ausencia (■) y en presencia de 10 g L<sup>-1</sup> de La (●).

Dado que para la eliminación de este tipo de interferencias químicas es común el uso de supresores de interferencias o agentes liberadores como sales de La o Sr, se adicionó una concentración de La de 10 g L<sup>-1</sup> a las disoluciones patrón de Mg que contenían Si. Como puede verse en la **Figura IV.7**, en presencia de La se elimina la interferencia de Si, no observándose diferencias significativas en los valores de absorbancia integrada de Mg en presencia de concentraciones de Si de entre 0 y 200 mg L<sup>-1</sup>. Por otro lado, en presencia de modificador, la absorbancia integrada para Mg aumenta significativamente en ausencia y en presencia de Si.

A la vista de estos resultados y para corroborar la utilidad de la adición de La para corregir la interferencia de Si en matrices más complejas, se añadieron concentraciones crecientes de este elemento de entre 0 y 20 g L<sup>-1</sup> a una de las muestras a analizar. Para este estudio, se eligió el suplemento alimenticio preparado a partir de extracto de ortiga (Suplemento alimenticio 2), ya que esta muestra contenía los cinco analitos y presentaba un alto contenido de Si y Mg. Además, para garantizar la presencia de un exceso de Si lo suficientemente elevado, se añadieron 20.0 mg L<sup>-1</sup> de este elemento a la disolución de esta muestra, preparada por dilución 1:5 en HNO<sub>3</sub> al 0.6%.

En la **Figura IV.8** se muestra la influencia que la concentración de La tiene sobre la señal analítica de Mg, Zn, Mn, Cu y Si.



**Figura IV.8.** Influencia de la concentración de La en los valores de absorbancia integrada de Cu, Si, Mn, Zn y Mg para una disolución del suplemento alimenticio 2 preparada por dilución 1:5 en 0.6% de HNO<sub>3</sub>, fortificada con 20.0 mg L<sup>-1</sup> de Si.

Como puede observarse en la **Figura IV.8**, la presencia de La en la disolución de la muestra no tuvo una influencia significativa sobre las señales de Cu, Zn, Mn y Si. Además, como cabía esperar, en presencia de concentraciones crecientes de La en la disolución de la muestra la absorbancia integrada de Mg aumenta, no apreciándose diferencias significativas en su señal analítica para concentraciones superiores a 5 g L<sup>-1</sup>. Con el fin de garantizar la estabilidad de los valores de absorbancia de Mg en muestras con concentraciones más altas de Mg y Si, se añadió La en concentración 10 g L<sup>-1</sup> a todas las disoluciones patrón y muestras analizadas en esta aplicación.

#### IV.5.3.2. Calibración y evaluación de los parámetros analíticos

Una vez establecidas las condiciones de análisis para la determinación conjunta de Cu, Zn, Mn, Mg y Si, se construyeron las curvas de calibrado y se evaluaron los parámetros analíticos del método (**Tabla IV.14**).

**Tabla IV.14.** Parámetros analíticos de la determinación secuencial de Cu, Zn, Mn, Mg y Si en HNO<sub>3</sub> al 0.6% y 10 g L<sup>-1</sup> de La.

Elemento	Pendiente (s L mg <sup>-1</sup> )	<i>r</i>	ULLR (mg L <sup>-1</sup> )	LOD (mg L <sup>-1</sup> )	LOQ (mg L <sup>-1</sup> )	Repetitividad (%)	Reproducibilidad (%)
Cu	0.1794	0.9999	5.0	0.008	0.027	0.3 – 2.4	2.8 – 7.5
Zn	0.4054	0.9971	2.0	0.017	0.057	0.4 – 3.3	4.3 – 9.0
Mn	0.1559	0.9986	8.4	0.011	0.037	0.3 – 3.9	4.9 – 8.3
Si	0.0016	0.9996	70	0.16	0.53	1.2 – 4.2	3.1 – 8.5
Mg	0.0564	0.9990	23	0.11	0.37	0.8 – 2.3	3.9 – 7.9

Como puede verse en la **Tabla IV.14**, se obtuvieron intervalos lineales de hasta dos órdenes de magnitud con coeficientes de correlación de Pearson (*r*) superiores a 0.997 para todos los elementos. Es de esperar que estas condiciones de trabajo sean adecuadas para la determinación de Cu y Mn en la mayoría de las muestras que se desea analizar. Sin embargo, el contenido de Zn, Mg y/o Si, en alguna de las muestras puede ser mayor a los límites superiores de los intervalos lineales (ULLR) indicados. Para extender el límite superior del intervalo lineal de Zn, Si y Mg, se utilizó el enfoque del registro de los píxeles laterales para la evaluación de las señales (Apartado IV.3.5, página 62). De este modo, se establecieron intervalos de trabajo lineales de 0.057 mg L<sup>-1</sup> a 10 mg L<sup>-1</sup> para Zn, de 0.53 mg L<sup>-1</sup> a 200 mg L<sup>-1</sup> para Si y de 0.37 mg L<sup>-1</sup> a 110 mg L<sup>-1</sup> para Mg.

La precisión se evaluó midiendo, por triplicado, disoluciones patrón multi-elementales que contenían diferentes concentraciones de cada uno de los analitos. Las determinaciones se llevaron a cabo en el mismo día (repetitividad) y en cinco días no consecutivos (reproducibilidad). Los valores de precisión, expresada como desviación estándar relativa (RSD), obtenidos para todos los elementos fueron inferiores al 4% en los estudios de repetitividad y del 9% en los estudios de reproducibilidad.

Los parámetros analitos obtenidos para Cu, Zn, Mn y Mg son similares a los mostrados en la aplicación el anterior (Apartado IV.4.3.1, página 72) a pesar de emplearse diferentes medios de disolución para la preparación de los patrones. Por otra parte, los LOD y LOQ obtenidos para Si empleando el modo de introducción de muestra en discontinuo son comparables a los obtenidos por otros autores utilizando la línea principal de Si y condiciones de atomización similares a las empleadas en esta aplicación, pero utilizando el modo de introducción de muestra en continuo [37]. Podemos concluir que, empleando el método desarrollado se consiguen buenos parámetros analíticos, con una reducción importante de la cantidad de muestra necesaria para llevar a cabo el análisis gracias al empleo del modo discontinuo.

### *IV.5.3.3. Análisis de las muestras y validación de la metodología*

#### *- Bebidas refrescantes comerciales:*

El método propuesto se aplicó para llevar a cabo la determinación de Cu, Zn, Mn, Mg y Si en diferentes bebidas. El contenido de estos elementos en las bebidas comerciales puede ser muy variable y depende en gran medida del tipo y/o de la fruta utilizada. Además, las condiciones en las que estas son procesadas y almacenadas, especialmente el procedimiento de extracción empleado para la obtención de los jugos de frutas son factores críticos que afectan al contenido final de estos elementos en las bebidas. Por otro lado, otros factores como las características de los suelos (composición mineral, pH...) así como las prácticas y procedimientos agrícolas aplicados durante el crecimiento de plantas y frutas (aplicación de fertilizantes, condiciones de irrigación...) también afectan a la composición química final de estos extractos de frutas o plantas [32]. Los resultados obtenidos para las distintas bebidas analizadas se muestran en la **Tabla IV.15**.

**Tabla IV.15.** Concentraciones obtenidas (media  $\pm$  desviación estándar) de Cu, Zn, Mn, Mg y Si en bebidas refrescantes comerciales (n = 3).

BEBIDA	CONCENTRACIÓN (mg L <sup>-1</sup> )				
	Cu	Zn	Mn	Si	Mg
Isotónica sabor cítricos	<0.010 <sup>a</sup>	<0.021 <sup>a</sup>	<0.014 <sup>a</sup>	<0.20 <sup>a</sup>	2.53 $\pm$ 0.02
Té al limón	<0.010 <sup>a</sup>	<0.021 <sup>a</sup>	0.39 $\pm$ 0.03	<0.20 <sup>a</sup>	4.9 $\pm$ 0.1
Limonada	0.047 $\pm$ 0.005	<0.021 <sup>a</sup>	<0.014 <sup>a</sup>	2.0 $\pm$ 0.2	10.9 $\pm$ 0.1
Naranjada	0.032 $\pm$ 0.003	<0.021 <sup>a</sup>	<0.014 <sup>a</sup>	<0.20 <sup>a</sup>	16.4 $\pm$ 0.6
Bebida a base de concentrado de zumo de uva y granada	0.063 $\pm$ 0.003	0.126 $\pm$ 0.004	0.207 $\pm$ 0.002	5.2 $\pm$ 0.2	28.4 $\pm$ 0.2
Bebida a base de concentrado de zumo de manzana	0.18 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.01	0.31 $\pm$ 0.02	<0.20 <sup>a</sup>	36 $\pm$ 2
Mosto	<0.010 <sup>a</sup>	0.40 $\pm$ 0.01	1.06 $\pm$ 0.01	20 $\pm$ 2	62 $\pm$ 2

<sup>a</sup> Concentraciones inferiores al LOD.

En general, las concentraciones más altas de Cu, Zn, Mn, Mg y Si se encontraron en las bebidas que contienen extractos o concentrados de frutas (limón, naranja, granada con uva, manzana y mosto), siendo el contenido de estos elementos comparativamente menor en la bebida isotónica con sabor a cítricos y en la bebida de té al limón. De hecho, las concentraciones de Cu, Zn, Mn y Si en estas muestras se encuentran por debajo de los LODs calculados para estos elementos, excepto para el Mn en el té al limón. Entre las cinco bebidas que contienen extractos o concentrados de frutas, las mayores concentraciones de Zn, Mn, Mg y Si se encontraron en el mosto, mientras que el concentrado de manzana mostró el mayor contenido de Cu. En general, la limonada y la naranjada mostraron los contenidos más bajos de estos elementos esenciales. Otros autores han encontrado concentraciones similares de estos elementos esenciales en bebidas comerciales preparadas a partir de concentrado de manzana y/o uva [32, 43, 46]. Las siete bebidas refrescantes analizadas presentan concentraciones de Mg muy diferentes, variando entre los 2.53 mg L<sup>-1</sup> de la bebida isotónica con sabor a cítricos y los 62 mg L<sup>-1</sup> del mosto. La determinación de Mg en las bebidas comerciales con un contenido muy alto de este elemento (> 23 mg L<sup>-1</sup>), se llevó a cabo utilizando el enfoque de los píxeles laterales o de las alas de la línea de análisis.

Con el fin de evaluar la validez del método para llevar a cabo la determinación directa en este tipo de muestras, se agregaron a las bebidas refrescantes diferentes

concentraciones de los elementos esenciales estudiados (entre 0.5 mg L<sup>-1</sup> y 2.5 mg L<sup>-1</sup> para Cu; 0.5 mg L<sup>-1</sup> y 2.5 mg L<sup>-1</sup> para Zn; 1.0 mg L<sup>-1</sup> y 2.5 mg L<sup>-1</sup> para Mn; 2.0 mg L<sup>-1</sup> y 12.5 mg L<sup>-1</sup> para Si; y 2.0 mg L<sup>-1</sup> y 25.0 mg L<sup>-1</sup> para Mg) y se calcularon los porcentajes de recuperación para cada uno de los elementos y muestras. Tal como puede observarse en la **Tabla IV.16**, se lograron buenas recuperaciones en las siete muestras, obteniéndose valores comprendidos entre un 95-106% para Cu, un 94-107% para Zn, un 94-108% para Mn, un 96-108% para Si y un 95-107% para Mg.

**Tabla IV.16.** Concentraciones (media  $\pm$  desviación estándar) y porcentajes de recuperación obtenidos para Cu, Zn, Mn, Mg y Si en las muestras fortificadas de bebidas refrescantes (n = 3).

BEBIDA	AÑADIDO (mg L <sup>-1</sup> )	Cu		Zn		Mn		Si		Mg	
		Encontrado (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)	Encontrado (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)	Encontrado (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)	Encontrado (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)	Encontrado (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)
Isotónica	-	< 0.010 <sup>a</sup>	-	< 0.021 <sup>a</sup>	-	< 0.014 <sup>a</sup>	-	<0.20 <sup>a</sup>	-	2.53 $\pm$ 0.02	-
	1.00 Cu, Zn, Mn; 2.00 Si, Mg	1.06 $\pm$ 0.02	106	1.06 $\pm$ 0.02	106	0.98 $\pm$ 0.02	98	2.07 $\pm$ 0.07	104	4.85 $\pm$ 0.03	107
	2.00 Cu, Zn, Mn; 5.00 Si, Mg	2.12 $\pm$ 0.01	106	2.01 $\pm$ 0.02	100	1.98 $\pm$ 0.01	99	5.0 $\pm$ 0.2	100	8.0 $\pm$ 0.1	106
Té al limón	-	< 0.010 <sup>a</sup>	-	< 0.021 <sup>a</sup>	-	0.39 $\pm$ 0.03	-	<0.20 <sup>a</sup>	-	4.9 $\pm$ 0.1	-
	0.50 Cu, Zn, Mn; 5.00 Si; 2.00 Mg	0.50 $\pm$ 0.01	100	0.472 $\pm$ 0.007	94	1.5 $\pm$ 0.1	108	4.9 $\pm$ 0.2	98	6.9 $\pm$ 0.1	100
	1.00 Cu, Zn, Mn; 10.0 Si; 5.00 Mg	1.00 $\pm$ 0.01	100	1.03 $\pm$ 0.02	103	2.46 $\pm$ 0.01	103	10.1 $\pm$ 0.3	101	10.0 $\pm$ 0.2	101
Limonada	-	0.047 $\pm$ 0.005	-	< 0.021 <sup>a</sup>	-	< 0.014 <sup>a</sup>	-	2.0 $\pm$ 0.2	-	10.9 $\pm$ 0.1	-
	1.00 Cu, Zn, Mn; 5.00 Si, Mg	1.02 $\pm$ 0.04	98	1.01 $\pm$ 0.02	101	1.02 $\pm$ 0.02	102	6.7 $\pm$ 0.2	96	15.7 $\pm$ 0.2	99
	2.00 Cu, Zn, Mn; 10.0 Si, Mg	2.02 $\pm$ 0.02	99	1.88 $\pm$ 0.01	94	2.07 $\pm$ 0.02	104	12.0 $\pm$ 0.4	100	21.4 $\pm$ 0.2	102
Naranja	-	0.032 $\pm$ 0.003	-	< 0.021 <sup>a</sup>	-	< 0.014 <sup>a</sup>	-	<0.20 <sup>a</sup>	-	16.4 $\pm$ 0.6	-
	1.00 Cu, Zn, Mn; 5.00 Si, Mg	0.98 $\pm$ 0.03	95	1.06 $\pm$ 0.04	106	0.98 $\pm$ 0.06	98	5.1 $\pm$ 0.3	102	20.3 $\pm$ 0.5	95
	2.00 Cu, Zn, Mn; 10.0 Si, Mg	1.94 $\pm$ 0.03	95	2.08 $\pm$ 0.08	104	2.08 $\pm$ 0.08	104	10.2 $\pm$ 0.5	102	25.2 $\pm$ 0.1	95
Bebida a base concentrado de uva y granada	-	0.063 $\pm$ 0.003	-	0.126 $\pm$ 0.004	-	0.207 $\pm$ 0.002	-	5.2 $\pm$ 0.2	-	28.4 $\pm$ 0.2	-
	1.00 Cu, Zn, Mn; 5.00 Si, Mg	1.06 $\pm$ 0.01	100	1.20 $\pm$ 0.01	107	1.17 $\pm$ 0.03	97	10.3 $\pm$ 0.3	101	32.7 $\pm$ 0.5	98
	2.00 Cu, Zn, Mn; 10.0 Si, Mg	2.00 $\pm$ 0.02	97	2.08 $\pm$ 0.01	98	2.08 $\pm$ 0.03	94	16.0 $\pm$ 0.2	105	36.9 $\pm$ 0.3	96
Bebida a base concentrado de manzana	-	0.18 $\pm$ 0.01	-	0.09 $\pm$ 0.01	-	0.31 $\pm$ 0.02	-	<0.20 <sup>a</sup>	-	36 $\pm$ 2	-
	1.00 Cu, Zn, Mn; 2.50 Si; 10.0 Mg	1.13 $\pm$ 0.02	97	1.14 $\pm$ 0.02	105	1.35 $\pm$ 0.01	103	2.7 $\pm$ 0.04	108	47.4 $\pm$ 0.5	103
	2.00 Cu, Zn, Mn; 10.0 Si; 20.0 Mg	2.12 $\pm$ 0.04	97	2.14 $\pm$ 0.04	102	2.37 $\pm$ 0.04	102	10.5 $\pm$ 0.3	105	55.0 $\pm$ 0.4	98
Mosto	-	< 0.010 <sup>a</sup>	-	0.40 $\pm$ 0.01	-	1.06 $\pm$ 0.01	-	20 $\pm$ 2	-	62 $\pm$ 2	-
	1.25 Cu, Zn, Mn; 6.25 Si, Mg	1.29 $\pm$ 0.02	103	1.76 $\pm$ 0.09	107	2.3 $\pm$ 0.1	100	25.3 $\pm$ 0.7	96	74 $\pm$ 1	99
	2.50 Cu, Zn, Mn; 12.5 Si; 25.0 Mg	2.47 $\pm$ 0.04	99	2.8 $\pm$ 0.1	97	3.4 $\pm$ 0.2	96	31.7 $\pm$ 0.8	98	84 $\pm$ 4	97

<sup>a</sup> Concentración inferior al LOD.

- **Infusiones preparadas a partir de distintas hierbas:**

Se emplearon seis tipos diferentes de hierbas (hojas de té verde, té negro y té rojo, hoja de rooibos, flor de manzanilla y tallos secos de cola de caballo) para la preparación de las infusiones analizadas en esta aplicación. El grado de extracción de estos elementos cuando se prepara una infusión depende en gran medida de la relación entre la masa de la muestra y el volumen de agua empleada, el tipo de agua, y las condiciones de elaboración como la temperatura, el tiempo, así como del uso o no de la agitación durante el proceso de preparación [31, 47]. Por esta razón, todas las infusiones se prepararon por triplicado empleando agua ultrapura de acuerdo con el procedimiento indicado en el *Apartado IV.5.2.2*. Siguiendo las recomendaciones del etiquetado del paquete de tallos de cola de caballo, el tiempo de infusión se aumentó de 5 a 15 minutos para preparar las infusiones de esta muestra. En la **Tabla IV.17** se muestran las concentraciones de Cu, Zn, Mn, Si y Mg obtenidas en las siete infusiones.

**Tabla IV.17.** Concentraciones obtenidas (media  $\pm$  desviación estándar) de Cu, Zn, Mn, Mg y Si en infusiones preparadas a partir de diferentes muestras herbáceas (n = 3).

INFUSIÓN	CONCENTRACIÓN (mg L <sup>-1</sup> )				
	Cu	Zn	Mn	Si	Mg
Té verde	0.055 $\pm$ 0.007	<0.021 <sup>a</sup>	3.30 $\pm$ 0.04	<0.20 <sup>a</sup>	5.20 $\pm$ 0.05
Té negro	0.060 $\pm$ 0.006	<0.021 <sup>a</sup>	3.6 $\pm$ 0.1	<0.20 <sup>a</sup>	9.4 $\pm$ 0.3
Té rojo	0.068 $\pm$ 0.004	<0.021 <sup>a</sup>	1.5 $\pm$ 0.1	<0.20 <sup>a</sup>	8.9 $\pm$ 0.7
Rooibos	<0.010 <sup>a</sup>	<0.021 <sup>a</sup>	0.146 $\pm$ 0.002	<0.20 <sup>a</sup>	5.6 $\pm$ 0.2
Manzanilla	<0.010 <sup>a</sup>	<0.021 <sup>a</sup>	0.15 $\pm$ 0.02	<0.20 <sup>a</sup>	7.2 $\pm$ 0.5
Cola de caballo	0.048 $\pm$ 0.003	<0.021 <sup>a</sup>	0.088 $\pm$ 0.005	9.2 $\pm$ 0.1	37 $\pm$ 1

<sup>a</sup> Concentraciones inferiores al LOD.

Como se puede apreciar en la tabla, la concentración de Zn en todas las infusiones analizadas se encuentra por debajo del LOD. El contenido de Cu es muy similar en las infusiones preparadas a partir de hojas de té verde, negro y rojo y de los tallos secos de cola de caballo, mientras que este elemento no se detectó en la infusión de rooibos ni de manzanilla. Por otro lado, se encontraron concentraciones similares de Mn en las infusiones de rooibos, manzanilla y en las preparadas a partir de tallos secos de cola de



caballo, pero estos contenidos son al menos diez veces menores que los hallados en las infusiones de té verde, té negro y té rojo. Cabe destacar que la única infusión en la que se encontró una cantidad cuantificable de Si fue en la preparada a partir de los tallos secos de cola de caballo. Por otra parte, el Mg fue el elemento que presentaba las concentraciones más altas en todas las infusiones preparadas, variando su concentración entre los 5.20 mg L<sup>-1</sup> (infusión de té verde) y los 37 mg L<sup>-1</sup> (infusión de cola de caballo). Por tanto, nuevamente fue necesario emplear el método de registro de píxeles laterales de la línea de Mg, para poder llevar a cabo la determinación de este elemento en las infusiones preparadas a partir de los tallos de cola de caballo. Las concentraciones de estos elementos esenciales en las infusiones analizadas en este trabajo son comparables a las informadas previamente por otros autores para infusiones preparadas empleando muestras y procedimientos de infusión similares [12, 40, 48, 49]. Cabe señalar que, a diferencia de la metodología desarrollada por Paz-Rodríguez *et al.* [12] donde tuvo que emplearse la adición estándar como método de calibración para llevar a cabo el análisis de las distintas infusiones mediante HR-CS FAAS, la metodología desarrollada en este capítulo ha permitido llevar a cabo el análisis de seis tipos de infusiones diferentes empleando la calibración por patrón externo, evitando tener que realizar una calibración para cada una de las muestras a analizar.

Para validar la metodología, las infusiones se enriquecieron con concentraciones de entre 1.00 mg L<sup>-1</sup> y 10 mg L<sup>-1</sup> de los cinco elementos, obteniéndose recuperaciones adecuadas entre el 96%-108% para Cu, el 98% -115% para Zn, el 95%-105% para Mn, el 96%-108% para Si y el 96%-107% para Mg (**Tabla IV.18**).

**Tabla IV.18.** Concentraciones (media  $\pm$  desviación estándar) y porcentajes de recuperación obtenidos para Cu, Zn, Mn, Mg y Si en las muestras fortificadas de infusiones de hierbas (n = 3).

INFUSIÓN	AÑADIDO (mg L <sup>-1</sup> )	Cu		Zn		Mn		Si		Mg	
		Encontrado (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)	Encontrado (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)	Encontrado (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)	Encontrado (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)	Encontrado (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)
	-	0.055 $\pm$ 0.006	-	< 0.021 <sup>a</sup>	-	3.30 $\pm$ 0.04	-	<0.20 <sup>a</sup>	-	5.20 $\pm$ 0.05	-
Té verde	1.00 Cu, Zn, Mn; 5.00 Si, Mg	1.11 $\pm$ 0.03	106	1.15 $\pm$ 0.04	115	4.3 $\pm$ 0.2	100	5.0 $\pm$ 0.1	100	10.9 $\pm$ 0.1	107
	2.00 Cu, Zn, Mn; 10.0 Si, Mg	2.15 $\pm$ 0.04	104	2.10 $\pm$ 0.08	105	5.2 $\pm$ 0.2	98	10.6 $\pm$ 0.1	106	15.9 $\pm$ 0.4	105
	-	0.060 $\pm$ 0.006	-	< 0.021 <sup>a</sup>	-	3.6 $\pm$ 0.1	-	<0.20 <sup>a</sup>	-	9.4 $\pm$ 0.3	-
Té negro	1.00 Cu, Zn, Mn; 5.00 Si, Mg	1.09 $\pm$ 0.02	102	1.14 $\pm$ 0.03	114	4.42 $\pm$ 0.06	96	5.1 $\pm$ 0.2	102	14.5 $\pm$ 0.4	101
	2.00 Cu, Zn, Mn; 10.0 Si, Mg	2.10 $\pm$ 0.01	102	2.06 $\pm$ 0.01	103	5.31 $\pm$ 0.05	95	10.1 $\pm$ 0.2	101	19.4 $\pm$ 0.6	100
	-	0.068 $\pm$ 0.004	-	< 0.021 <sup>a</sup>	-	1.5 $\pm$ 0.1	-	<0.20	-	8.9 $\pm$ 0.7	-
Té rojo	1.00 Cu, Zn, Mn; 5.00 Si, Mg	1.15 $\pm$ 0.01	107	1.07 $\pm$ 0.08	107	2.5 $\pm$ 0.08	100	4.94 $\pm$ 0.01	99	14.7 $\pm$ 0.2	106
	2.00 Cu, Zn, Mn; 10.0 Si, Mg	2.24 $\pm$ 0.03	108	2.1 $\pm$ 0.1	105	3.6 $\pm$ 0.2	103	9.79 $\pm$ 0.08	98	20.1 $\pm$ 0.6	106
	-	< 0.010 <sup>a</sup>	-	< 0.021 <sup>a</sup>	-	0.146 $\pm$ 0.002	-	<0.20 <sup>a</sup>	-	5.6 $\pm$ 0.2	-
Rooibos	1.00 Cu, Zn, Mn; 5.00 Si, Mg	1.04 $\pm$ 0.01	104	1.11 $\pm$ 0.04	111	1.19 $\pm$ 0.02	104	5.4 $\pm$ 0.2	108	11.0 $\pm$ 0.4	104
	2.00 Cu, Zn, Mn; 10.0 Si, Mg	2.0 $\pm$ 0.1	100	2.10 $\pm$ 0.01	105	2.1 $\pm$ 0.1	98	10.3 $\pm$ 0.5	103	16.2 $\pm$ 0.1	104
	-	< 0.010 <sup>a</sup>	-	< 0.021 <sup>a</sup>	-	0.15 $\pm$ 0.02	-	<0.20 <sup>a</sup>	-	7.2 $\pm$ 0.2	-
Manzanilla	1.00 Cu, Zn, Mn; 5.00 Si, Mg	1.02 $\pm$ 0.02	99	1.08 $\pm$ 0.02	108	1.21 $\pm$ 0.01	105	4.8 $\pm$ 0.2	96	12.6 $\pm$ 0.4	103
	2.00 Cu, Zn, Mn; 10.0 Si, Mg	1.92 $\pm$ 0.01	96	1.95 $\pm$ 0.04	98	2.05 $\pm$ 0.03	95	9.9 $\pm$ 0.2	99	16.8 $\pm$ 0.1	98
	-	0.048 $\pm$ 0.003	-	< 0.021 <sup>a</sup>	-	0.088 $\pm$ 0.005	-	9.2 $\pm$ 0.1	-	37 $\pm$ 1	-
Cola de caballo	1.00 Cu, Zn, Mn; 5.00 Si, Mg	1.04 $\pm$ 0.03	99	1.05 $\pm$ 0.01	105	1.14 $\pm$ 0.02	105	14.2 $\pm$ 0.8	100	41 $\pm$ 3	98
	2.00 Cu, Zn, Mn; 10.0 Si, Mg	2.0 $\pm$ 0.1	97	1.95 $\pm$ 0.04	98	2.1 $\pm$ 0.1	101	19 $\pm$ 2	99	45 $\pm$ 2	96

<sup>a</sup> Concentraciones inferiores al LOD.

- **Suplementos alimenticios:**

Se analizaron dos suplementos alimenticios comerciales preparados a partir de extractos concentrados de hierbas de cola de caballo (Suplemento alimenticio 1) y ortiga (Suplemento alimenticio 2). Como se muestra en la **Tabla IV.19**, ambas muestras contienen cantidades cuantificables de Cu, Zn, Mn, Si y Mg, que en alguno de los casos exceden el límite superior de linealidad estudiado para estos elementos cuando se emplean 3 píxeles (CP±1) para la cuantificación de las señales. De este modo, para determinar el contenido de Zn, Si y Mg en el suplemento alimenticio 2, se emplearon los píxeles laterales de la línea para poder ampliar el intervalo de respuesta lineal. Por otra parte, la concentración de Mg encontrada en el suplemento alimenticio 1 es muy elevada, de hecho, es más alta que el límite superior de linealidad para este elemento cuando se usan los píxeles laterales 97 y 105 ( $\Sigma (\pm 4)$ ) para la cuantificación de la señal. Debido a su elevado contenido, no se determinó el Mg en esta muestra, ya que hubiera sido necesario llevar a cabo una dilución adicional de la muestra, lo que no consideramos adecuado teniendo en cuenta los objetivos propuestos en este capítulo.

**Tabla IV.19.** Concentraciones obtenidas (media  $\pm$  desviación estándar) de Cu, Zn, Mn, Mg y Si en los suplementos alimenticios (n = 3).

MUESTRA	CONCENTRACIÓN (mg L <sup>-1</sup> )				
	Cu	Zn	Mn	Si	Mg
Suplemento 1	0.14±0.01	0.81±0.09	1.34±0.08	23±1	> 275 <sup>a</sup>
Suplemento 2	0.96±0.04	4.9±0.2	3.2±0.2	172±8	96±3

<sup>a</sup> El valor está por encima del límite superior del rango lineal para una solución preparada por dilución 1: 2.5 de muestra

Las muestras de Suplementos 1 y 2 se fortificaron por triplicado con diferentes concentraciones de los cinco elementos para obtener los valores de recuperación. Los resultados de este estudio se muestran en la **Tabla IV.20**. Las recuperaciones calculadas (dentro del 94-109%) confirman la validez de la metodología desarrollada para llevar a cabo el análisis de estas muestras.

**Tabla IV. 20.** Concentraciones (media  $\pm$  desviación estándar) y porcentajes de recuperación obtenidos para Cu, Zn, Mn, Mg y Si en las muestras fortificadas de suplementos alimenticios (n = 3).

Elemento	Suplemento 1			Suplemento 2		
	Añadido (mg L <sup>-1</sup> )	Encontrado (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)	Añadido (mg L <sup>-1</sup> )	Encontrado (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)
Cu	-	0.14 $\pm$ 0.01	-	-	0.96 $\pm$ 0.04	-
	1.25	1.43 $\pm$ 0.08	103	2.50	3.5 $\pm$ 0.2	101
	2.50	2.48 $\pm$ 0.04	94	5.00	5.8 $\pm$ 0.3	97
Zn	-	0.81 $\pm$ 0.09	-	-	4.9 $\pm$ 0.2	-
	1.25	2.2 $\pm$ 0.1	107	1.25	6.7 $\pm$ 0.3	109
	2.50	3.19 $\pm$ 0.03	96	2.50	7.4 $\pm$ 0.1	100
Mn	-	1.34 $\pm$ 0.08	-	-	3.2 $\pm$ 0.2	-
	1.25	2.7 $\pm$ 0.1	104	2.50	5.8 $\pm$ 0.3	102
	2.50	3.66 $\pm$ 0.07	95	5.00	8.0 $\pm$ 0.4	98
Si	-	23 $\pm$ 1	-	-	172 $\pm$ 8	-
	12.5	35 $\pm$ 2	99	25.0	197 $\pm$ 6	100
	25.0	45 $\pm$ 2	94	50.0	209 $\pm$ 9	94
Mg	-	> 275 <sup>a</sup>	-	-	96 $\pm$ 3	-
	-	-	-	12.5	107 $\pm$ 2	99
	-	-	-	25.0	117 $\pm$ 1	97

<sup>a</sup> El valor está por encima del límite superior del rango lineal para una solución preparada por dilución 1: 2.5 de muestra

## IV.6. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede concluir que la metodología desarrollada en este capítulo, aprovechando las posibilidades aportadas por la HR-CS FAAS, cumple con los objetivos propuestos:

- Ha quedado demostrada la posibilidad de determinación de un número elevado de elementos en modo secuencial rápido y con bajo consumo de muestra.
- Los parámetros analíticos permiten el empleo de esta metodología para la caracterización y control rápido de muestras de interés ambiental y alimentario.
- Se han analizado muestras que presentan contenidos muy variables de los elementos de interés, desde trazas y minoritarios hasta mayoritarios:
  - Se ha llevado a cabo la determinación de Cd, Ni, Cu, Zn, Pb, Fe, Mn, Ca, Mg, K y Na en muestras medioambientales tales como aguas, plantas y suelos. A pesar de la diferencia de concentraciones esperadas en estas muestras entre elementos contaminantes como Cd o Pb y mayoritarios como Na, K y Ca, el análisis puede llevarse a cabo en la misma alícuota de muestra sin la necesidad de llevar a cabo diluciones adicionales y utilizando un volumen de muestra de aproximadamente 10 mL para la determinación de los 11 analitos.
  - Se ha conseguido la determinación secuencial rápida de Cu, Zn, Mn, Mg y Si en bebidas comerciales, infusiones y suplementos alimenticios. Al igual que en el caso de las muestras ambientales, a pesar de las diferentes concentraciones de estos 5 elementos en las muestras alimentarias analizadas, la determinación de estos elementos se ha llevado a cabo en la misma alícuota de muestra, sin la necesidad de preparar distintas diluciones para medir la absorbancia de cada elemento ni llevar a cabo medidas adicionales.

## IV.7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] B. Welz, M. Sperling, *Atomic Absorption Spectrometry*, third ed. Wiley-VCH, Weinheim, 1999.
- [2] Z. Fang, B. Welz, G. Schlemmer, *Analysis of Samples With High Dissolved Solids Content Using Flow Injection Flame Atomic Absorption Spectrometry*, *J. Anal. At. Spectrom.* 4 (1989) 91-95.
- [3] J.L. Raposo, S.R. de Oliveira, N.M. Caldas, J.A.G. Neto, *Evaluation of alternate lines of Fe for sequential multi-element determination of Cu, Fe, Mn and Zn in soil extracts by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry*, *Anal. Chim. Acta* 627 (2008) 198-202.
- [4] T. Frentiu, M. Ponta, R. Hategan, *Validation of an analytical method based on the high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry for the fast sequential determination of several hazardous/priority hazardous metals in soils*, *Chem. Cent. J.* 7 (2013) 43-53.
- [5] S.R. de Oliveira, J.L. Raposo, J.A.G. Neto, *Fast sequential multi-element determination of Ca, Mg, K, Cu, Fe, Mn and Zn for foliar diagnosis using high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry: feasibility of secondary lines, side pixel registration and least-squares background correction*, *Spectrochim. Acta B* 64 (2009) 593-596.
- [6] S.R. Oliveira, J. A. G. Neto, J. A. Nóbrega, B. T. Jones, *Determination of macro- and micronutrients in plant leaves by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry combining instrumental and sample preparation strategies*, *Spectrochim. Acta B* 65 (2010) 316-320.
- [7] R. B. Ferreira, S.R. Oliveira, V.P. Franzini, A. Virgilio, J.L. Raposo Jr., J.A. Gomes Neto, *Evaluation of lines of phosphorus and potassium by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry for liquid fertilizer analysis*, *Atom. Spectrosc.* 32 (2011) 56-61.

- [8] E. Peña-Vazquez, M. C. Barciela-Alonso, C. Pita-Calvo, R. Domínguez-González, P. Bermejo-Barrera, *Use of high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry (HR-CS FAAS) for sequential multi-element determination of metals in seawater and wastewater samples*, J. Appl. Spectrosc. 82 (2015) 681-686.
- [9] M. A. Bechlin, J. A. G. Neto, J. A. Nóbrega, *Evaluation of lines of boron, phosphorus and sulfur by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry for plant analysis*, Microchem. J. 109 (2013) 134-138.
- [10] J. Santos, M.T. Oliva-Teles, C. Delerue-Matos, M.B.P.P. Oliveira, *Multi-elemental analysis of ready-to-eat "baby leaf" vegetables using microwave digestion and high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry*, Food Chem. 151 (2014) 311-316.
- [11] G.C. Brandao, G.D. Matos, S.L.C. Ferreira, *Slurry sampling and high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry using secondary lines for the determination of Ca and Mg in dairy products*, Microchem. J. 98 (2011) 231-233.
- [12] B. Paz-Rodríguez, M. R. Domínguez-González, M. Aboal-Somoza, P. Bermejo-Barrera, *Application of High Resolution-Continuum Source Flame Atomic Absorption Spectrometry (HR-CS FAAS): Determination of trace elements in tea and tisanes*, Food Chem. 170 (2015) 492-500.
- [13] E. Stelmach, A. Szymczycha-Madeja, P. Pohl, *A simplified determination of total concentrations of Ca, Fe, Mg and Mn in addition to their bioaccessible fraction in popular instant coffee brews*, Food Chem. 197 (2016) 388-394.
- [14] K. Miranda, A. L. Vieira, M. A. Bechlin, F. M. Fortunato, A. Virgilio, E. C. Ferreira, J. A. G. Neto, *Determination of Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Se, and Zn in Foodstuffs by Atomic Spectrometry After Sample Preparation Using a Low-Cost Closed-Vessel Conductively Heated Digestion System*, Food Anal. Methods 7 (2016) 1887-1894.

- [15] P. Pohl, A. Dzimitrowicz, P. Jamroz, K. Greda, *Development and optimization of simplified method of fast sequential HR-CS-FAAS analysis of apple juices on the content of Ca, Fe, K, Mg, Mn and Na with the aid of response surface methodology*, *Talanta* 189 (2018) 182-189.
- [16] L. Fernández-López, B. Gómez-Nieto, M. J. Gismera, M. T. Sevilla, J. R. Procopio, *Direct determination of copper and zinc in alcoholic and non-alcoholic drinks using high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry and internal standardization*, *Spectrochim. Acta B* 147 (2018) 21-27.
- [17] W. Boschetti, R.T. Rampazzo, M.B. Dessuy, M.G. R. Vale, A. de Oliveira Rios, P. Hertz, V. Manfroi, P. G. Celso, M. F. Ferrão, *Detection of the origin of Brazilian wines based on the determination of only four elements using high-resolution continuum source flame AAS*, *Talanta* 111 (2013) 147-155.
- [18] J. Ferguson, *The heavy elements. Chemistry, environmental, impact and health effects*, Pergamon Press, 1990.
- [19] H. Bradl, *Heavy metals in the environment: origin, interaction and remediation*, Academic Vol. 6 London, 2002.
- [20] A. Kabata-Pendias, H. Pendias, *Trace elements in soil and plants*, CRC Press, 1985.
- [21] Y. N. Jolly, A. Islam, S. Akbar, *Transfer of metals from soil to vegetables and possible health risk assessment*, *Springer Plus* 2 (2013) 385-392.
- [22] G. U. Chibuike, S. C. Obiora, *Heavy Metal Polluted Soils: Effect on Plants and Bioremediation Methods*, *Appl. Environ. Soil Sci.* (2014) 1-12.
- [23] M.E. Farago, A. Mehra, *Plants and chemical elements*, Wiley-VCH, 1994.
- [24] Council Directive 98/83/EC Quality of water intended for human consumption, *Official Journal of the European Communities*, L 330/32 (1998).
- [25] WHO, *Guidelines for Drinking Water Quality, Volume 1. Recommendation*, (World Health Organization, Geneva, 2008).



- [26] ORDEN 2770/2006, de 11 de agosto, de la Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio, por la que se procede al establecimiento de niveles genéricos de referencia de metales pesados y otros elementos traza en suelos contaminados de la Comunidad de Madrid, B.O.C.M. 204 (2006) 29-30.
- [27] A. Sigel, H. Sigel, R.K.O. Sigel, *Interrelations between essential metal ions and human diseases*, Metal ions in life sciences 13, Springer, 2013.
- [28] J.W. Erdman, I.A. Macdonald, S.H. Zeisel, *Present Knowledge in Nutrition*, Wiley, 2012.
- [29] P. Smichowski, D. A. Batistoni, *Essential and potentially toxic chemical elements in beverages*, en *The determination of chemical elements in food: applications for atomic and mass spectrometry*, S. Caroli (ed.) John Wiley & Sons (2007) 455-501.
- [30] G. B. van der Voet, A. Sarafanov, T. I. Todorov, J. A. Centeno, W. B. Jonas, J. A. Ives, F. G. Mullick, *Clinical and Analytical Toxicology of Dietary Supplements: A Case Study and a Review of the Literature*, Biol. Trace Elem. Res. 125 (2008) 1-12.
- [31] A. Szymczycha-Madeja, M. Welna, P. Pohl, *Elemental analysis of teas and their infusions by spectrometric methods*, Trends Anal. Chem. 35 (2012) 165-181.
- [32] A. Szymczycha-Madeja, M. Welna, D. Jedryczko, P. Pohl, *Developments and strategies in the spectrochemical elemental analysis of fruit juices*, Trends Anal. Chem. 55 (2014) 68-80.
- [33] F. Chainet, Ch.P. Lienemann, M. Courtiade, J. Ponthus, O.F.X. Donard, *Silicon speciation by hyphenated techniques for environmental, biological and industrial issues: a review*, J. Anal. At. Spectrom. 26 (2011) 30-51.
- [34] R. Sanchez, J.L. Todoli, C.P. Lienemann, J.M. Mermet, *Effect of silicon chemical form on the emission intensity in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry for xylene matrices*, J. Anal. At. Spectrom. 24 (2009) 391-401.
- [35] C. J. Rademeyer, I. Vermaak, *Atomization mechanisms of silicon in a graphite furnace atomizer*, J. Anal. At. Spectrom. 7 (1992) 347-351.

- [36] M. Resano, M. R. Flórez, E. García-Ruiz, *Progress in the determination of metalloids and non-metals by means of high-resolution continuum source atomic or molecular absorption spectrometry. A critical review*, Anal Bioanal Chem 406 (2014) 2239-2259.
- [37] Z. Kowalewska, J. Pilarczyk, L. Gosciniak, *Spectral aspects of the determination of Si in organic and aqueous solutions using high-resolution continuum source or line source flame atomic absorption spectrometry*, Spectrochim. Acta B 120 (2016) 45-56.
- [38] M. Harmankaya, S. Gezgin, M. M. Özcan, *Comparative evaluation of some macro- and micro element and heavy metal contents in commercial fruit juices*, Environ. Monit. Assess. 184 (2012) 5415-5420.
- [39] N. Jalbani, F. Ahmed, T. G. Kazi, U. Rashid, A. B. Munshi, A. Kandhro, *Determination of essential elements (Cu, Fe and Zn) in juices of commercially available in Pakistan*, Food Chem. Toxicol. 48 (2010) 2737-2740.
- [40] T. Karak, R. M. Bhagat, *Trace elements in tea leaves, made tea and tea infusion: A review*, Food Res. Int. 43 (2010) 2234-2252.
- [41] A. Krejcova, I. Ludvikova, T. Cernohorsky, M. Pouzar, *Elemental analysis of nutritional preparations by inductively coupled plasma mass and optical emission spectrometry*, Food Chem. 132 (2012) 588-596.
- [42] S. Soriano, A. D. Pereira Netto, R. J Cassella, *Determination of Cu, Fe, Mn and Zn by flame atomic absorption spectrometry in multivitamin/multimineral dosage forms or tablets after an acidic extraction*, J. Pharm. Biomed. Anal. 43 (2007) 304-310.
- [43] A. B. Williams, O. O. Ayejuyo, A. F. Ogunyale, *Trace metal levels in fruit juices and carbonated beverages in Nigeria*, Environ. Monit. Assess. 156 (2009) 303-306.

- [44] K.V. Dyck, H. Robberecht, R.V. Cauwenbergh, H. Deelstra, J. Arnaud, L. Willemyns, F. Benijts, J.A. Centeno, H. Taylor, M.E. Soares, M.L. Bastos, M.A. Ferreira, P.C. D'Haese, L.V. Lamberts, M. Hoenig, G. Knapp, S.J. Lugowski, L. Moens, J. Riondato, R.V. Grieken, M. Claes, R. Verheyen, L. Clement, M. Uytterhoeven, *Spectrometric determination of silicon in food and biological samples: an interlaboratory trial*, J. Anal. At. Spectrom. 15 (2000) 735-74.
- [45] G. A. Zachariadis, A. F. Olympiou, *Use of slurry suspension sample introduction technique in fast multielement analysis of multimineral and multivitamin formulations by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry*, J. Pharm. Biomed. Anal. 47 (2008) 541-546.
- [46] A. Szymczycha-Madeja, M. Welna, *Evaluation of a simple and fast method for the multi-elemental analysis in commercial fruit juice samples using atomic emission spectrometry*, Food Chem. 141 (2013) 3466-3472.
- [47] M. Welna, A. Szymczycha-Madeja, E. Stelmach, P. Pohl, *Speciation and Fractionation of Elements in Tea Infusions*, Crit. Rev. Anal. Chem. 42 (2012) 349-365.
- [48] P.L. Fernandez, F. Pablos, M. J. Martin, A. G. González, *Multi-element analysis of tea beverages by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry*, Food Chem. 76 (2002) 483-489.
- [49] N. Aksuner, E. Henden, Z. Aker, E. Engin, S. Satik, *Determination of essential and non-essential elements in various tea leaves and tea infusions consumed in Turkey*, Food Addit. Contam. B 5 (2012) 126-132.



## **CAPÍTULO V / CHAPTER V:**

Determinación de silicio en emulsiones dobles  
agua-aceite-agua mediante HR-CS FAAS

Silicon determination in double water-oil-water  
emulsions by HR-CS FAAS



## V.1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en la optimización de un método para la determinación directa de silicio en emulsiones agua-aceite. La necesidad de disponer de esta metodología surge de una colaboración de nuestro grupo con el grupo de investigación *Carnes y Productos Cárnicos (CARPROCAR)* del *Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (ICTAN-CSIC)*. Parte de las actividades del CARPROCAR se centran en el diseño y formulación de emulsiones dobles agua-aceite-agua ( $W_1/O/W_2$ ) para encapsular ingredientes funcionales, el silicio entre ellos, y facilitar así su incorporación en alimentos cárnicos.

### - Emulsiones dobles agua-aceite-agua. Propiedades y aplicaciones:

Las emulsiones dobles agua-aceite-agua ( $W_1/O/W_2$ ) son complejos sistemas líquidos multifásicos en los que pequeñas gotas de fase acuosa ( $W_1$ ) se dispersan dentro una gota de mayor tamaño de fase lipídica (O), que a su vez se dispersan en el interior de una segunda fase acuosa continua ( $W_2$ ). En la **Figura V.1** se muestra una representación esquemática de la estructura de las emulsiones dobles ( $W_1/O/W_2$ ).

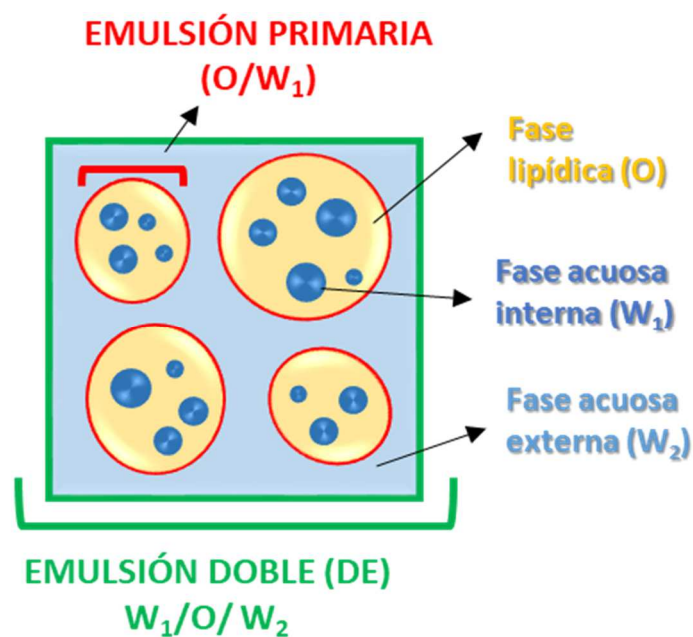


Figura V.1. Representación esquemática de la estructura de una emulsión doble ( $W_1/O/W_2$ ).

Estos sistemas multi-compartimentados tienen la capacidad de atrapar y proteger sustancias hidrofílicas en la fase acuosa interna, y controlar la velocidad a la que éstas se suministran y liberan desde el interior de una fase a otra. Estas propiedades de las emulsiones dobles  $W_1/O/W_2$  hacen que estos sistemas sean una excelente opción para la encapsulación y protección de sustancias inactivas cuando se administran en disolución, tales como fármacos y sustancias bioactivas como polipéptidos y proteínas, que de este modo pueden liberarse de forma controlada y prolongada [1-5]. Por ejemplo, este tipo de emulsiones se han empleado para la encapsulación de insulina con el fin de llevar a cabo la administración vía oral de esta hormona [3-5].

En la última década numerosas investigaciones se han centrado en el diseño de emulsiones dobles para la formulación de nuevos ingredientes funcionales que permitan la suplementación de compuestos bioactivos y el desarrollo de alimentos más saludables y con mejores propiedades [6-7]. En este sentido, los sistemas de emulsiones dobles  $W_1/O/W_2$  han demostrado poseer excelentes propiedades para encapsular y proteger compuestos como vitaminas, compuestos fenólicos, aminoácidos, carotenoides y/o minerales [8-12], mejorar las características sensoriales de los alimentos [13], así como para producir alimentos bajos en grasas o con un perfil de ácidos grasos más saludables [14-15].

### - *Beneficios del consumo de silicio:*

Como se ha comentado en el *Apartado IV.5.1* (página 82), en la actualidad el Si no se considera un elemento esencial para los seres humanos ya que aún no está clara la función bioquímica concreta que este metaloide desempeña en el organismo. Sin embargo, se sospecha que el Si desempeña un papel fundamental en el desarrollo de huesos y tejidos y que su deficiencia en el organismo puede causar pérdida de cabello, envejecimiento de la piel y deterioro de las uñas. Además, numerosos estudios apuntan a que el Si puede tener un efecto modulador sobre la respuesta inmune e inflamatoria y se ha asociado a problemas relacionados con la salud mental [16-20].



Teniendo en cuenta los posibles efectos beneficiosos del Si, en los últimos años ha crecido significativamente el interés por la incorporación de distintos compuestos de Si en productos alimentarios y suplementos alimenticios. Para este propósito, los sistemas de emulsiones dobles  $W_1/O/W_2$  presentan características óptimas para la encapsulación y protección de formas de Si biodisponibles solubles en medio acuoso y abren nuevas posibilidades para el diseño y desarrollo de sistemas que permitan llevar a cabo la administración controlada de este metaloide.

- *Determinación de Si en muestras complejas mediante técnicas atómicas:*

La determinación de Si mediante la mayoría de las técnicas atómicas se considera problemática, sobre todo cuando se desea analizar muestras muy complejas como aceites, preparados farmacéuticos o productos alimenticios. Como se ha comentado en el capítulo anterior (Apartado IV.5.1) dichas dificultades derivan principalmente de la necesidad de someter las muestras a un tratamiento inicial para destruir la matriz, etapa en la que se incrementa el riesgo de que las muestras se contaminen dada la ubicuidad de este elemento. Por otro lado, el análisis directo de las muestras suele verse limitado por la poca tolerancia de algunas técnicas atómicas a interferencias derivadas de la composición de la matriz de muestra [21]. Por ejemplo, cuando se emplean las técnicas de ICP para la determinación de metales o metaloides en matrices con un alto contenido orgánico las medidas pueden verse afectadas por cambios en las características del plasma, la formación de depósitos de carbón y la aparición de interferencias espectrales [22,23]. De hecho, la determinación de Si empleando métodos basados en ICP-MS puede verse altamente interferida por la formación de iones poliatómicos producidos por la presencia de oxígeno, carbono y nitrógeno (por ejemplo:  $^{12}C^{16}O^+$ ,  $^{14}N^{2+}$ ,  $^{14}N^{16}O^+$ ) que dificultan la determinación precisa de los distintos isótopos de Si [24].

Aunque las metodologías basadas en las técnicas de AAS suelen presentar una mayor tolerancia a las matrices orgánicas, la determinación de Si empleando AAS también suele verse afectada por la aparición de interferencias espectrales [25]. Sin embargo, estas interferencias pueden minimizarse o eliminarse con mayor facilidad empleando espectrómetros de HR-CS AAS.

En el capítulo anterior se ha demostrado que la HR-CS FAAS puede emplearse para la cuantificación de Si en diferentes bebidas comerciales, infusiones de hierbas y suplementos alimenticios sin necesidad de llevar a cabo ningún tratamiento para destruir la matriz de muestra. De hecho, los análisis se llevaron a cabo realizando una simple dilución de las muestras. Sin embargo, la determinación de Si en muestras como aceites supone un gran reto debido al contenido de materia orgánica, viscosidad y tensión superficial de estas muestras.

En la bibliografía podemos encontrar diferentes métodos diseñados para simplificar la determinación de Si en muestras de aceite. En este contexto, Oliveira *et al.* [26] desarrollaron una metodología para la determinación de Si en aceites vegetales y muestras de biodiesel por HR-CS FAAS después de su dilución con xileno y usando patrones de Si preparados en este medio para la calibración. Como alternativa a la dilución de la muestra en disolventes orgánicos, Goncalves *et al.* [27] propusieron la utilización de emulsiones de aceite-agua como procedimiento de preparación de muestras para determinar Mg, Cr, Cu, Pb, Ni, Al, y Si por FAAS en aceites lubricantes.

La formación de emulsiones es una estrategia empleada para la preparación de muestras orgánicas, como aceites comestibles, combustibles y otros productos derivados del petróleo, evitando de este modo los procedimientos de destrucción de la matriz. La optimización del procedimiento de preparación de estas emulsiones hace posible que estos sistemas presenten una adecuada estabilidad y una viscosidad similar a las de una disolución acuosa. De este modo, se facilita el análisis de este tipo de muestras mediante técnicas atómicas con sistemas de introducción de muestra por aspiración, ya que permite que la calibración pueda llevarse a cabo de manera sencilla utilizando patrones acuosos [28,29].

Estos sistemas emulsionados se han aplicado con éxito para la determinación de distintos metales en muestras como productos a base de petróleo, productos alimenticios y cosméticos mediante métodos basados en AAS [28-31]. Sin embargo, hasta la fecha son escasos los trabajos en que se ha abordado la determinación de Si en muestras de estas características [27, 32, 33] y sólo en uno de ellos [27] se ha llevado a cabo la determinación mediante FAAS.

## V.2. OBJETIVOS

Como se ha indicado, la encapsulación de sustancias, tales como el Si, en sistemas de emulsiones dobles, es una estrategia muy interesante para la preparación de ingredientes funcionales. Para el seguimiento de estos procesos y el control de los productos derivados, es necesario disponer de métodos analíticos adecuados. Teniendo en cuenta estas premisas, el **objetivo** de este capítulo es la optimización de un método rápido y sencillo, basado en la HR-CS FAAS, adecuado para la determinación de Si en dobles emulsiones  $W_1/O/W_2$ , de manera directa o con un tratamiento mínimo de muestra.

## V.3. PROCEDIMIENTOS

### V.3.1. Composición y preparación de las emulsiones agua-aceite-agua

Las emulsiones dobles agua-aceite-agua ( $W_1/O/W_2$ ) utilizadas en esta tesis han sido preparadas por el grupo de investigación CARPROCAR. Se formularon tres tipos de emulsiones dobles (DE) denominadas DE-1, DE-2 y DE-3, con diferente composición de la fase acuosa interna. Para cada una de las emulsiones dobles formuladas se prepararon dobles emulsiones sin Si (blanco de doble emulsión) y dobles emulsiones incorporando Si en las fases acuosas internas (muestra de doble emulsión).

#### *Composición y preparación de las fases de la doble emulsión:*

- **Fase acuosa interna ( $W_1$ ):** compuesta por 0.58% de NaCl (Panreac Química S.A, España) en la emulsión DE-1; 0.58% de NaCl y 0.50% de caseinato de sodio (Friesland Campina DMV, Países Bajos) en la emulsión DE-2; y 0.58% de NaCl y 3.0% de gelatina (Tradissimo, Trades S.A, España) en la emulsión DE-3. Todas las fases acuosas internas contienen 0.02 % de azida sódica (Sigma-Aldrich, España) para prevenir el crecimiento microbiano.

- **Fase lipídica (O):** compuesta por 96 g de aceite de oliva Virgen Extra (Carbonell, SOS Cuétara S.A, España) y 6 g de polirricinoleato de poliglicerol (PGPR) de grado alimentario (Bavaro Chemicals, España) como surfactante lipofílico. Para la preparación de la fase lipídica ambos componentes se mezclaron durante 15 minutos a una temperatura de 60 °C y una velocidad de 2400 rpm empleando como emulsificador el procesador de alimentos Thermomix® TM-31 (Vorwerk, Alemania).
- **Fase acuosa externa (W<sub>2</sub>):** compuesta por 0.58% de NaCl y 0.50% de caseinato de sodio.

### *Preparación de las emulsiones dobles (W<sub>1</sub>/O/W<sub>2</sub>):*

La preparación de las emulsiones dobles (W<sub>1</sub>/O/W<sub>2</sub>) se llevó a cabo empleando un procedimiento de emulsificación en dos etapas. En la primera etapa se formó la emulsión primaria (W<sub>1</sub>/O) mediante la homogenización de la fase acuosa (W<sub>1</sub>) y la fase lipídica (O). A continuación, se homogeneizó la emulsión W<sub>1</sub>/O con la fase acuosa (W<sub>2</sub>).

Para la formación de la emulsión primaria (W<sub>1</sub>/O), se añadieron lentamente 20 g de la correspondiente fase acuosa interna (W<sub>1</sub>) sobre 80 g de la fase lipídica (O), mezclándose ambas fases durante 15 minutos a una temperatura de 60 °C y una velocidad de 2400 rpm en el procesador de alimentos Thermomix® TM-31. La emulsión primaria (O/W<sub>1</sub>) obtenida se pasó a través de un homogeneizador de alta presión de dos etapas a 55/7 MPa (Panda Plus 2000, GEA NiroSoavi, Italia). A continuación, se añadieron 40 g de emulsión primaria (O/W<sub>1</sub>) lentamente sobre 60 g de fase acuosa externa (W<sub>2</sub>), mezclándose durante 15 minutos a una temperatura de 37 °C y una velocidad de 1400 rpm. Las dobles emulsiones se pasaron a través del homogeneizador de alta presión a 15/3 MPa para obtener las dobles emulsiones (W<sub>1</sub>/O/W<sub>2</sub>) finales.

Como fuente de Si para la preparación de las emulsiones dobles (DE-1, DE-2 y DE-3) se empleó un extracto comercial acuoso de plantas de ortiga rico en este elemento que contiene alrededor de 4800 mg de ortigas en 40 mL. Ya que el contenido de Si no se especifica en el etiquetado de este producto, se determinó la concentración de este elemento en el lote del extracto comercial mediante HR-CS FAAS. Para ello, se empleó la metodología descrita en el capítulo anterior (Apartado IV.3). Se encontró un contenido de Si en dicho lote de  $373 \pm 9 \text{ mg L}^{-1}$ . Para la preparación de las muestras de emulsión doble DE-1, DE-2 y DE-3, se añadió a cada una de las fases acuosas internas ( $W_1$ ) descritas una cantidad conocida del extracto comercial de ortigas para que la concentración final de Si en las emulsiones dobles ( $W_1/O/W_2$ ) fuera de  $30 \text{ mg L}^{-1}$ .

### **V.3.2. Preparación de las disoluciones patrón**

A partir de la disolución patrón comercial de Si ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) se prepararon disoluciones patrón de distintas concentraciones en agua ultrapura o en el blanco de emulsión doble preparado como se describe en el *Apartado V.3.1*. Se empleó agua ultrapura como medio de dilución para la preparación de todos los patrones de Si dado que el uso de un medio ácido o básico desestabiliza las emulsiones.

Se prepararon patrones de Si con diferentes proporciones de blanco de la emulsión doble. Para ello, se mezcló el volumen adecuado del blanco de la emulsión doble correspondiente y del patrón de Si concentrado, completando el volumen total con agua ultrapura. Los diferentes factores de dilución empleados en la preparación de estos patrones se expresan como volumen de emulsión doble entre volumen total, correspondiendo el factor 1.0 al patrón preparado en el blanco de emulsión doble que no ha sido diluido con agua ultrapura, y el factor 0.0 al patrón preparado únicamente en agua ultrapura.

### V.3.3. Procedimiento de medida y parámetros instrumentales

La determinación de Si se llevó a cabo empleando una llama de  $C_2H_2-N_2O$ , a la longitud de onda de trabajo de 251.612 nm. La composición de la llama y la altura del mechero se optimizaron en el *Apartado IV.3.2* (página 55). La muestra se introdujo en el espectrofotómetro empleando los modos de introducción de muestra continuo y discontinuo. Los parámetros instrumentales se resumen en la **Tabla V.1**.

**Tabla V.1.** Condiciones de medida para la determinación de Si en emulsiones dobles  $W_1/O/W_2$ .

PARAMETROS INSTRUMENTALES		
Longitud de onda	251.611 nm	
Sensibilidad relativa	100 %	
Flujo de $C_2H_2$	270 L h <sup>-1</sup>	
Flujo de $N_2O$	376 L h <sup>-1</sup>	
Altura de mechero	7 mm	
Número de píxeles seleccionados	3 (CP±1)	
Tiempo de inyección de muestra	<sup>a</sup> 3.0 s	<sup>b</sup> 1.0 s
Tiempo de medida	<sup>a</sup> 3.0 s	<sup>b</sup> 7.0 s

<sup>a</sup> modo de introducción de muestra continuo; <sup>b</sup> modo de introducción de muestra discontinuo

En el modo de introducción de muestra en discontinuo, se utilizó la suma de las absorbancias integradas (PVSA) de los valores obtenidos para 3 píxeles del detector (CP±1) para la evaluación y cuantificación de las señales. En el modo de introducción de muestra en continuo, se empleó la suma de los valores medios de absorbancia individuales (WSA) de 3 píxeles (CP±1).

La cuantificación de Si en las muestras de doble emulsión se llevó a cabo por triplicado, interpolando los valores promedio de PVSA o WSA en la curva de calibrado correspondiente.

## V.4. OPTIMIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA

Para llevar a cabo la determinación de Si, en primer lugar, se evaluó si la composición de la llama y altura de mechero optimizadas en el capítulo anterior (Apartado IV.3.2, página 55) empleando como medio de disolución HCl y Cs-La al 1% eran adecuadas para la determinación de Si en agua ultrapura. Para ello, se prepararon y midieron patrones de Si de diferentes concentraciones en ambos medios. Puesto que no se observaron variaciones significativas entre los valores de absorbancia obtenidos para las disoluciones patrón preparadas en HCl y Cs-La al 1% y en agua ultrapura, no fue necesario llevar a cabo cambios en los parámetros de medida.

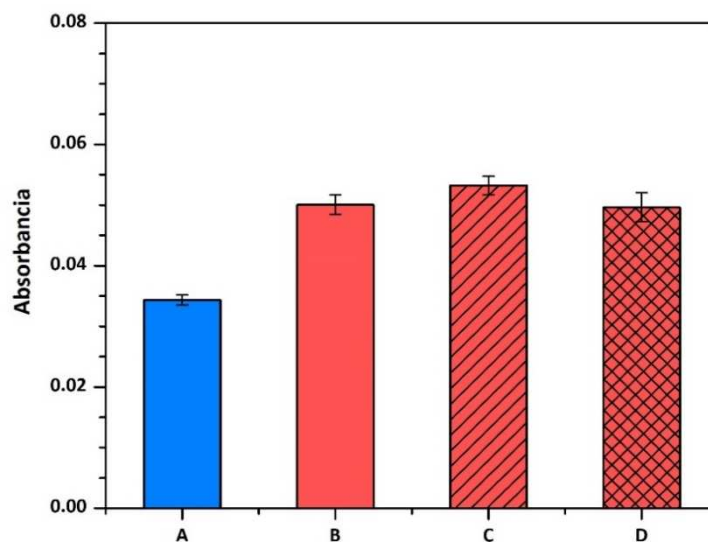
En la optimización del método se evaluaron los modos de introducción de muestra en continuo y discontinuo. De acuerdo con los resultados obtenidos en el *Capítulo IV* (Apartado IV.3.3, página 57), para el modo de introducción de muestra en discontinuo se emplearon 1.0 s y 7.0 s como tiempos óptimos de inyección y medida, respectivamente. Para el análisis en continuo, se escogieron tiempos de inyección y medida de 3.0 s como condiciones óptimas (**Tabla V.1**).

### V.4.1. Influencia de la composición de la emulsión doble sobre la señal de absorbancia

Para establecer si la composición de la matriz de las dobles emulsiones influye en los valores de absorbancia de Si, se prepararon disoluciones patrón de 10.0 mg L<sup>-1</sup> de Si en los blancos de las tres emulsiones dobles formuladas (DE-1, DE-2 o DE-3). A continuación, se midió la absorbancia de estas disoluciones empleando el modo de introducción de muestra en continuo.

Como se puede ver en la **Figura V.2**, los valores de absorbancia obtenidos para los tres patrones preparados empleando los blancos de emulsiones dobles son muy similares. De acuerdo con estos resultados, se puede considerar que la composición de la fase acuosa interna de las emulsiones DE-1, DE-2 y DE-3 (NaCl, NaCl + caseinato de sodio, y NaCl + gelatina, respectivamente) no influye significativamente en la señal de absorbancia. Sin embargo, estos valores de absorbancia son mucho mayores que los obtenidos para un patrón de Si de igual concentración preparado en agua ultrapura. Este

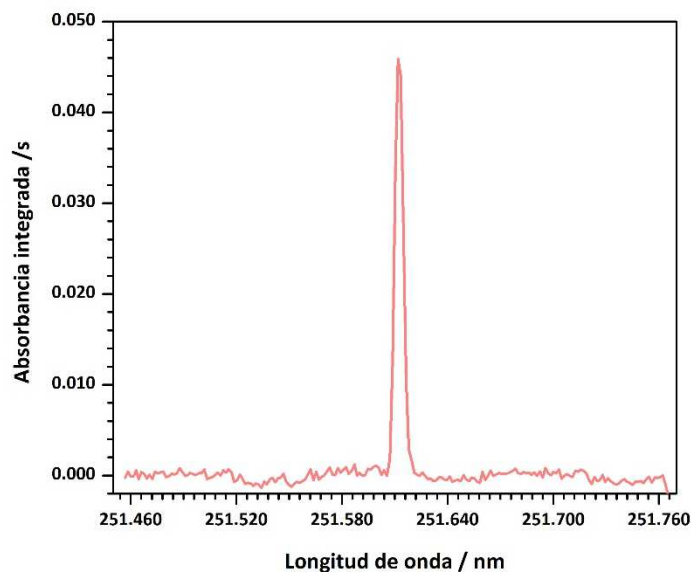
hecho indica que la matriz de la doble emulsión afecta significativamente al proceso de medida o que algún componente, común en las tres emulsiones dobles, puede ser causa de la aparición de interferencias espectrales que afecten al valor de absorbancia.



**Figura V.2.** Valores de absorbancia para un patrón de Si de  $10.0 \text{ mg L}^{-1}$  ( $n=3$ ) preparado en agua ultrapura (A) y en el blanco de las emulsiones dobles DE-1 (B), DE-2 (C) y DE-3 (D) utilizando el modo de introducción de muestra en continuo. Las barras de error representan la desviación estándar para tres repeticiones.

Para comprobar si existen interferencias espectrales en el análisis de estos patrones, se examinaron los espectros de absorbancia integrada frente al tiempo y la longitud de onda registrados para los patrones de Si preparados en agua ultrapura y en los blancos de las tres emulsiones dobles. A modo de ejemplo, en la **Figura V.3** se muestra el espectro registrado para la emulsión doble DE-1.



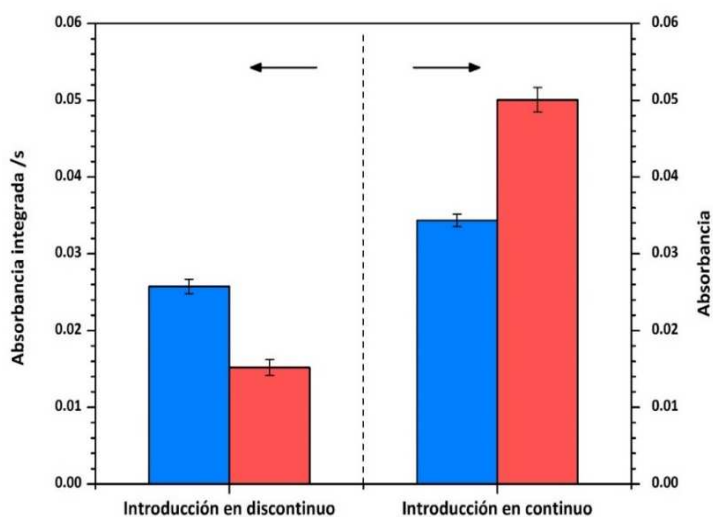


**Figura V.3.** Espectro de absorción integrada en el tiempo y la longitud de onda para la emulsión doble DE-1.

Como puede observarse en la **Figura V.3**, no se observaron estructuras moleculares, ni líneas de absorción atómicas de otros elementos en la región espectral de medida. Por lo tanto, el aumento de absorción observado en la **Figura V.2** para los patrones de Si preparados empleando los blancos de las distintas emulsiones dobles, no puede atribuirse a una superposición de la línea principal de Si con un espectro molecular y/o una línea de absorción atómica de otro elemento.

De acuerdo con estos resultados, otros factores como variaciones en la eficacia de transporte y/o de atomización del analito, pueden ser la causa de las diferencias observadas en los valores de absorción entre los patrones de Si preparados en los distintos medios. En FAAS, es común que las señales analíticas puedan verse afectadas por la composición y propiedades físicas de las muestras. Por ejemplo, la presencia de grandes cantidades de sustancias orgánicas como disolventes, aceites o surfactantes pueden causar cambios importantes en la viscosidad, densidad y tensión superficial de las disoluciones, afectando a la velocidad de aspiración, así como a la eficacia de nebulización y de atomización [34].

Para estudiar si la matriz de la emulsión doble afecta a la eficacia de transporte de la muestra, se midieron los patrones de Si preparados en agua ultrapura y en el blanco de la emulsión doble DE-1 empleando los modos de introducción de muestra en continuo y discontinuo (**Figura V.4.**).

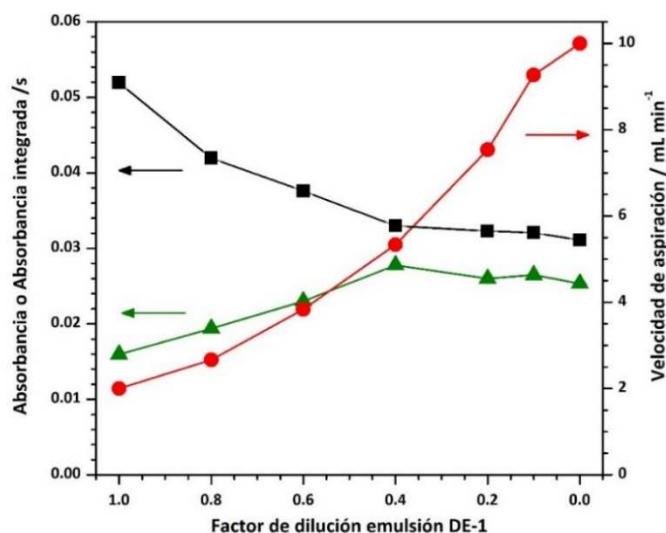


**Figura V.4.** Señales de absorbancia para un patrón de Si de  $10.0 \text{ mg L}^{-1}$  preparado en agua ultrapura (azul) y en el blanco de la emulsión doble DE-1 (rojo) usando el modo de introducción de muestra en continuo y discontinuo ( $n=3$ ). Las barras de error representan la desviación estándar para tres repeticiones.

Como puede verse en la **Figura V.4**, cuando se emplea la introducción de muestra en continuo la señal de absorbancia para el patrón de Si preparado en agua ultrapura es menor que la obtenida para el patrón preparado en la emulsión doble. Sin embargo, cuando se introduce la muestra en modo discontinuo, se observa un comportamiento opuesto, siendo el valor de la señal del patrón de Si en agua ultrapura mayor que la del patrón en la emulsión doble. La disminución en la señal del patrón en la emulsión doble cuando se emplea el modo de introducción de muestra en discontinuo podría indicar que la cantidad de muestra que alcanza la llama es menor cuando se emplea este modo de introducción de muestra. Este resultado podría sugerir que la matriz de la doble emulsión afecta de modo negativo a la eficacia de transporte y/o a la eficacia de nebulización de la muestra. Sin embargo, los resultados obtenidos en el estudio llevado a cabo empleando el modo de introducción de muestra en continuo aparentemente contradicen esta suposición. Estos hechos parecen indicar que diferentes procesos,

inducidos por la matriz de la doble emulsión, pueden estar influyendo al mismo tiempo en el proceso de medida.

Con el fin de obtener información adicional sobre el efecto que la matriz de la emulsión doble tiene sobre las señales de Si, se prepararon patrones de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  en el blanco de la emulsión doble DE-1 empleando diferentes factores de dilución y se midieron la velocidad de aspiración y los valores de absorbancia para estos patrones empleando los modos de introducción de muestra en continuo y en discontinuo. En la **Figura V.5** se muestra cómo varía la velocidad de aspiración y los valores de absorbancia o absorbancia integrada para ambos modos de introducción de muestra en función del factor de dilución de los patrones.



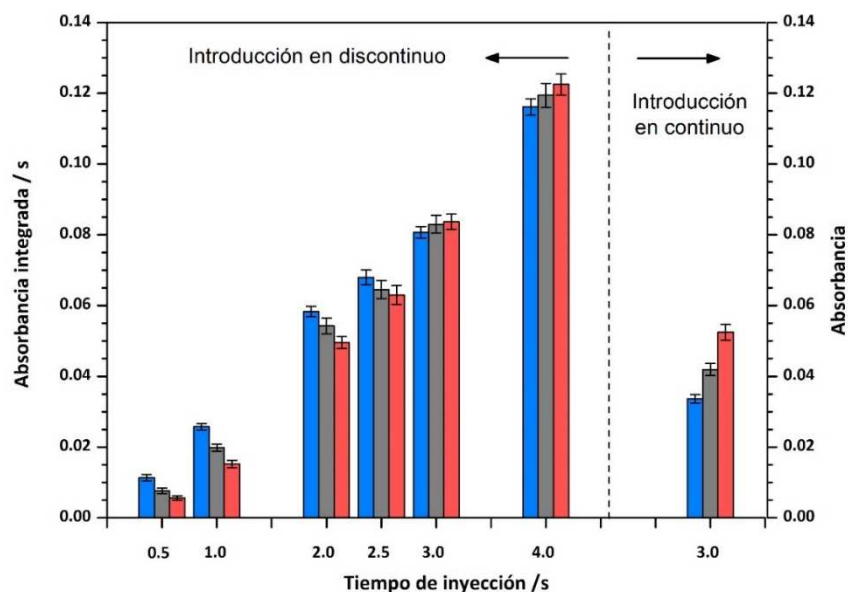
**Figura V.5.** Velocidad de aspiración (círculos rojos) y señales de absorbancia o absorbancia integrada para patrones de Si de  $10.0 \text{ mg L}^{-1}$  preparados en la emulsión doble DE-1 con diferentes factores de dilución en agua ultrapura empleando los modos de introducción de muestra en continuo (cuadrados negros) y en discontinuo (triángulos verdes).

Como se puede ver en la **Figura V.5**, la velocidad de aspiración aumenta gradualmente a medida que disminuye el factor de dilución del patrón preparado en el blanco de la doble emulsión. De hecho, la velocidad de aspiración se reduce aproximadamente un 80%, de  $10 \text{ mL min}^{-1}$  con el patrón preparado en agua ultrapura (factor de dilución 0.0), a  $2 \text{ mL min}^{-1}$  en el patrón de Si preparado en el blanco de emulsión doble no diluida (factor de dilución 1.0). Sin embargo, cuando se aspiran patrones preparados en emulsión doble con un factor de dilución menor al 0.4 se

observa que los valores de las señales de Si no varían significativamente tanto para el modo de introducción de muestra en continuo como en discontinuo. No obstante, para los patrones con factores de dilución comprendidos entre 0.4 y 1.0, la señal de absorbancia integrada disminuye progresivamente a medida que aumenta el factor de dilución cuando se introduce la muestra en discontinuo, mientras que cuando se emplea el modo de introducción en continuo, se observa como la absorbancia aumenta.

Estos resultados parecen corroborar que en presencia de una gran cantidad de matriz de emulsión doble la eficacia de atomización, así como la velocidad de aspiración y/o la eficacia de nebulización se ven afectados. En la bibliografía se cita que la presencia de disolventes orgánicos en muestras y patrones pueden modificar significativamente la velocidad de aspiración, la eficacia de nebulización y el proceso de proceso de atomización al producirse cambios en la composición química de la llama debido a las características de la matriz [34]. Teniendo en cuenta el alto contenido de aceite empleado en la preparación de las emulsiones dobles ( $\approx 30\%$  de aceite de oliva), los cambios observados en las señales de absorbancia para los patrones preparados en este medio podrían deberse a procesos inducidos por dicho componente durante el proceso de medida.

Con el fin de obtener información adicional sobre la influencia que la matriz de la emulsión doble tiene sobre la señal de Si, los patrones ( $10.0 \text{ mg L}^{-1}$ ) preparados en agua ultrapura, en el blanco de emulsión doble sin diluir, y en el blanco de la emulsión doble con un factor de dilución de 0.8, se midieron empleando diferentes tiempos de inyección para el modo de introducción de muestra en discontinuo. En la **Figura V.6** se presentan los valores de absorbancia integrada obtenidos para estos patrones a los diferentes tiempos de inyección empleados (0.5, 1.0, 2.0, 2.5, 3.0 y 4.0 s). Las señales de absorbancia obtenidas para estos patrones empleando el modo de introducción de muestra en continuo también se incluyen en esta figura con el fin de comparar los efectos producidos por la matriz de la emulsión doble en ambos modos de introducción de muestra.

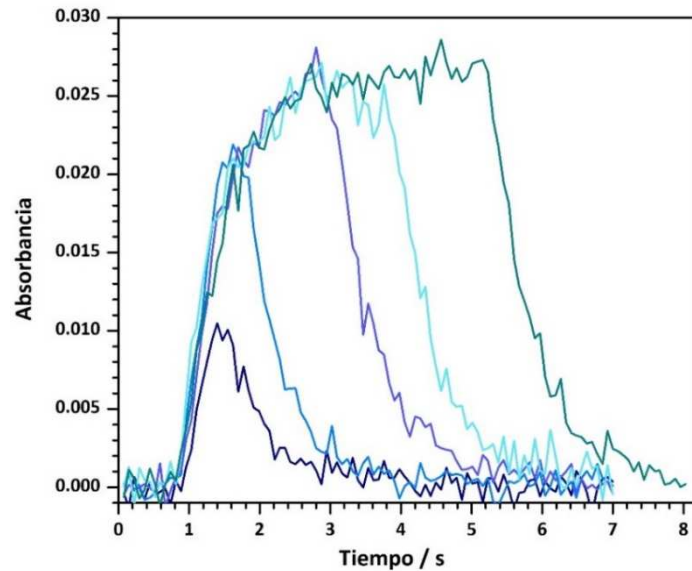


**Figura V.6.** Señales de absorbancia para patrones de Si de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  ( $n=3$ ) preparados en agua ultrapura (azul), en el blanco de emulsión doble DE-1 con un factor de dilución de 0.8 (gris) y en emulsión doble DE-1 sin diluir (rojo) utilizando tiempos de inyección de 0.5, 1.0, 2.0, 2.5, 3.0 y 4.0 s en el modo de introducción de muestra en discontinuo y un tiempo de medida e inyección de muestra de 3.0 s en el modo de introducción de muestra en continuo. Las barras de error representan la desviación estándar para tres repeticiones.

Como se puede observar en la **Figura V.6**, las señales de todos los patrones de Si aumentan cuando se incrementa el tiempo de inyección. Para tiempos cortos de inyección de entre 0.5 y 2.0 s, las señales obtenidas para los patrones preparados en el blanco de la emulsión doble diluida y sin diluir son inferiores a las del patrón preparado en agua ultrapura, siendo más pronunciada la diferencia para los patrones preparados en el blanco de la doble emulsión no diluida. Sin embargo, para tiempos de inyección de 3.0 y 4.0 s, las señales de absorbancia son más elevadas para los patrones preparados en el blanco de emulsión que para el patrón en agua ultrapura. Este comportamiento es muy similar al que observamos para estos patrones usando el modo de introducción de muestra continuo.

Por otro lado, si nos fijamos en las distintas señales transitorias de absorbancia obtenidas para el patrón preparado en agua ultrapura, empleando cada uno de los tiempos de inyección seleccionados (**Figura V.7**), se puede observar como al incrementarse el tiempo de inyección entre 0.5 s y 2.0 s, tanto la altura como la anchura de las señales aumentan. Sin embargo, para tiempos de inyección superiores a 2.0 s las alturas de las señales de Si son muy similares, incrementándose únicamente su anchura.

Este hecho, sugiere que para tiempos de inyección superiores a 2.0 s el suministro de la muestra es pseudo-continuo, y en estos casos los efectos producidos en las medidas podrían asemejarse a los observados cuando se utiliza el modo de introducción de muestra en continuo.



**Figura V.7.** Señales transitorias de absorbancia para un patrón de Si de  $10.0 \text{ mg L}^{-1}$  en agua ultrapura cuando se emplea el modo de introducción de muestra en discontinuo para tiempos de inyección de 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 s.

A la vista de estos resultados es evidente que la presencia de una gran cantidad de emulsión doble tiene una influencia importante sobre la absorbancia de Si. Cuando se emplea el modo de introducción en discontinuo, para tiempos muy cortos, parecen magnificarse las diferencias existentes en la eficacia de transporte de la muestra y/o la eficacia de nebulización, para los patrones preparados en agua ultrapura y los preparados empleando el blanco de emulsión doble. Sin embargo, si la introducción de muestra se realiza en continuo, o los tiempos de inyección empleando el modo discontinuo son muy elevados, las variaciones que pueden existir entre las velocidades de aspiración de estos patrones no parecen influir significativamente en la señal de absorbancia, pesando más en estos casos los cambios que un alto contenido de la matriz de la doble emulsión en la llama pueden inducir en el proceso de atomización de Si.

#### V.4.2. Calibración y evaluación de los parámetros analíticos

Se estudió la viabilidad de llevar a cabo la calibración utilizando el método de patrón externo empleando patrones de preparados en agua ultrapura. Para confirmar que es posible llevar a cabo esta calibración se compararon las pendientes de las curvas de calibrado obtenidas empleando patrones preparados en agua ultrapura y en el blanco de la doble emulsión DE-1 con diferentes factores de dilución, utilizando los modos de introducción de muestra en continuo y discontinuo. Para ambos modos de introducción de muestra, las pendientes de las curvas de calibrado obtenidas usando patrones en agua ultrapura ( $0.00317 \pm 0.00005 \text{ L mg}^{-1}$  y  $0.00233 \pm 0.00004 \text{ s L mg}^{-1}$ , para los modos continuo y discontinuo, respectivamente) no fueron significativamente diferentes de las correspondientes a las curvas de calibrado obtenidas con patrones preparados en el blanco de la doble emulsión con factores de dilución iguales o inferiores al 0.4 ( $0.00310 \pm 0.00004 \text{ L mg}^{-1}$  y  $0.00238 \pm 0.00009 \text{ s L mg}^{-1}$  en los modos continuo y discontinuo, respectivamente).

Una vez comprobado que es posible efectuar la calibración con patrones acuosos, se evaluaron los parámetros analíticos del método. Para ello, se prepararon patrones de Si en agua ultrapura con concentraciones entre 0 y  $80 \text{ mg L}^{-1}$ , y se midieron las señales de absorbancia media (WSA) o de absorbancia integrada (PVSA) en función del modo de introducción de muestra correspondiente (continuo o discontinuo, respectivamente). En la **Tabla V.2** se recogen los parámetros analíticos obtenidos para cada uno de los modos de introducción de muestra.

**Tabla V.2.** Parámetros analíticos para la determinación de Si mediante HR-CS FAAS para los modos de introducción de muestra en continuo y discontinuo.

PARÁMETROS	MODO DE INTRODUCCIÓN DE MUESTRA	
	Continuo	Discontinuo
Sensibilidad <sup>a</sup>	$0.00317 \pm 0.00005$	$0.00233 \pm 0.00004$
<i>r</i>	0.9975	0.9979
ULLR ( $\text{mg L}^{-1}$ )	23	70
LOD ( $\text{mg L}^{-1}$ )	0.04	0.11
LOQ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	0.15	0.36
Repetitividad ( <i>RSD</i> , %) <sup>b</sup>	< 4.5 %	< 7.0 %
Reproducibilidad ( <i>RSD</i> , %) <sup>b</sup>	< 7.2 %	< 11 %

<sup>a</sup>  $\text{L mg}^{-1}$  para la medida en continuo;  $\text{s L mg}^{-1}$  para la medida en discontinuo ; <sup>b</sup> (n = 3)

Como se puede observar en la **Tabla V.2**, el límite superior del intervalo lineal cuando se emplea el modo de introducción de muestra en continuo ( $23 \text{ mg L}^{-1}$ ), es significativamente inferior al observado cuando se emplea el modo de introducción de muestra en discontinuo ( $70 \text{ mg L}^{-1}$ ). Por otro lado, los LOD y LOQ cuando las medidas se llevan a cabo empleando la introducción de muestra en discontinuo ( $0.11$  y  $0.36 \text{ mg L}^{-1}$ ), son superiores a los valores obtenidos cuando se utiliza el modo de introducción de muestra en continuo ( $0.04$  y  $0.11 \text{ mg L}^{-1}$ ).

Los LOD y LOQ obtenidos con la metodología propuesta y empleando patrones de Si preparados en agua ultrapura cuando se emplea el modo de introducción de muestra en discontinuo son muy similares a los encontrados en el capítulo anterior (Apartado IV.5.3.2, página 89), donde la determinación de Si se llevó a cabo empleando patrones preparados en  $\text{HNO}_3$  y en presencia de modificador de lantano. Para el modo de introducción de muestra en continuo los LOD y LOQ obtenidos son similares o incluso mejores a los publicados por otros autores para la determinación de Si en medios acuoso y/o disolventes orgánicos [25, 26]. Kowalewska *et al.* [25] obtuvieron los mejores LODs,  $0.01$  y  $0.05 \text{ mg L}^{-1}$ , cuando emplearon diferentes compuestos de Si en disolventes orgánicos, aumentando este LOD a  $0.23 \text{ mg L}^{-1}$  cuando las disoluciones de Si se prepararon en medio acuoso. Oliveira *et al.* [26] obtuvieron un LOD de  $0.06 \text{ mg L}^{-1}$  preparando las disoluciones patrón de Si en xileno. Por otra parte, los LOD obtenidos en esta metodología son superiores a los obtenidos por Raposo *et al.* [35], donde los autores obtuvieron un LOD de  $0.0084 \text{ mg L}^{-1}$ . Cabe señalar que en dicho trabajo los autores emplearon wolframio como patrón interno en la calibración, lo que permite mejorar la precisión de las medidas y por tanto los LOD y LOQ. Aunque los LOD y LOQ de la metodología desarrollada sean ligeramente superiores a los obtenidos por otros autores, estos valores son adecuados para la determinación de Si en las muestras que se desean analizar, la preparación de los patrones de calibrado es más simple y menor el tiempo de análisis.

La precisión del método, expresada como la desviación estándar relativa (RSD%), se evaluó tanto en términos de repetitividad como de reproducibilidad empleando patrones de Si preparados en agua ultrapura y patrones preparados en el blanco de la



doble emulsión con un factor de dilución del 0.4. Para estimar la repetitividad, se midieron por triplicado las absorbancias para patrones con concentraciones diferentes (2.0 y 10.0 mg L<sup>-1</sup>) preparadas en ambos medios. Para estudiar la reproducibilidad del método, las medidas de estas disoluciones se llevaron a cabo en tres días diferentes. La mejor precisión se obtuvo para el modo de introducción de muestras en continuo, con valores de RSD por debajo del 4.5% y el 7.2% para la repetitividad y la reproducibilidad, respectivamente, utilizando patrones en agua ultrapura y del 6.9% y el 9.6% para la repetitividad y la reproducibilidad, respectivamente, utilizando patrones preparados en la doble emulsión. Utilizando el modo de introducción de muestra en discontinuo, se obtuvieron valores de RSD ligeramente superiores (< 7.0% y < 11% para la repetitividad y reproducibilidad, respectivamente, para los patrones preparados en agua ultrapura y < 8.5% y < 15% para la repetitividad y reproducibilidad, respectivamente, para los patrones preparados en emulsión doble diluida). Los valores de RDS obtenidos empleando ambos modos de introducción son satisfactorios para la determinación de Si en el tipo de muestras objetivo de este capítulo.

## **V.5. APLICACIÓN DEL MÉTODO AL ANÁLISIS DE EMULSIONES W<sub>1</sub>/O/W<sub>2</sub>**

En un primer trabajo llevado a cabo conjuntamente con el grupo de investigación *CARPROCAR* se estudiaron las propiedades fisicoquímicas de las distintas emulsiones dobles, y se evaluó la eficacia de encapsulación de Si y la estabilidad de las dobles emulsiones DE-1, DE-2 y DE-3 diseñadas [36]. Dicha evaluación se llevó a cabo de forma indirecta midiendo mediante HR-CS FAAS la concentración de Si que quedaba libre en la fase acuosa externa (W<sub>2</sub>) tras llevar a cabo el proceso de encapsulación. Para ello, después de la preparación de las emulsiones, la doble emulsión W<sub>1</sub>/O/W<sub>2</sub> se centrifugó y filtró con el fin de separar la fase acuosa externa W<sub>2</sub> de la emulsión primaria W<sub>1</sub>/O.

Con el fin de reducir el tiempo requerido para llevar a cabo el estudio de estas emulsiones, el método desarrollado en este capítulo se aplicó para cuantificar el contenido de Si directamente en las muestras de emulsiones dobles diseñadas. Para ello, antes del análisis y teniendo en cuenta el alto contenido de Si esperado en las emulsiones, 1.0 mL de la correspondiente emulsión doble se diluyó hasta un volumen

de 10.0 mL con agua ultrapura (factor de dilución de 0.1). En la **Tabla V.3** se muestran los contenidos de Si encontrados en las muestras de emulsiones dobles (DE-1, DE-2 y DE-3) empleando los modos de introducción de muestra en continuo y en discontinuo.

**Tabla V.3.** Concentración de Si (media  $\pm$  desviación estándar) en las diferentes emulsiones dobles, y porcentajes de recuperación obtenidos aplicando el método de análisis propuesto para los modos de introducción de muestra en continuo y en discontinuo (n=3).

Muestra	Añadido (mg L <sup>-1</sup> )	CONTINUO		DISCONTINUO	
		Encontrado (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)	Encontrado (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)
DE-1	-	18.4 $\pm$ 0.8	-	19 $\pm$ 1	-
DE-2	-	17.6 $\pm$ 0.9	-	18 $\pm$ 1	-
DE-2	20.0	37 $\pm$ 2	98	36 $\pm$ 3	95
DE-2	30.0	47 $\pm$ 2	99	50 $\pm$ 3	104
DE-3	-	16.2 $\pm$ 0.7	-	17 $\pm$ 1	-
DE-3	10.0	25 $\pm$ 1	95	26 $\pm$ 2	96
DE-3	20.0	38 $\pm$ 2	105	39 $\pm$ 3	105

Como puede verse en la **Tabla V.3**, no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de Si obtenidas empleando ambos modos de introducción. Además, a pesar de la diferente composición de la fase acuosa interna ( $W_1$ ), el contenido de Si encontrado para las emulsiones DE-1, DE-2 y DE-3 es muy similar. Estos resultados concuerdan con las conclusiones halladas en el primero de los trabajos realizados sobre estos sistemas de emulsión, en el que se observó que la eficacia de encapsulación de Si no se veía significativamente afectada por la composición de la fase acuosa interna [36].

Con el fin de validar la metodología propuesta, las distintas muestras de emulsión doble se fortificaron con diferentes concentraciones de Si. Como se puede ver en la **Tabla V.3**, los resultados de recuperación encontrados son cercanos al 100% en todos los casos, situándose en valores de entre el 95% y 105% para ambos modos de introducción de muestra. Por otro lado, se estimó la concentración de Si esperada en las muestras de emulsiones dobles analizadas teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el trabajo anterior sobre la eficacia de la encapsulación de Si [36], así como el procedimiento de preparación de estas emulsiones y la cantidad de extracto de ortiga rico en Si incorporado en la fase interna de las muestras. Teniendo en cuenta que la eficacia de encapsulación de Si de las emulsiones diseñadas se encuentra entre un 72%

y un 78%, las concentraciones de Si esperadas en las muestras analizadas deben oscilar entre los 17 mg L<sup>-1</sup> y los 19 mg L<sup>-1</sup>. Como puede apreciarse en la **Tabla V.3**, no se encontraron diferencias significativas entre los valores de Si obtenidos utilizando el método propuesto y las concentraciones esperadas de Si en estas muestras. Estos resultados confirman que el método desarrollado es adecuado y puede aplicarse con éxito para la determinación de Si en las emulsiones dobles formuladas, reduciéndose considerablemente el tiempo requerido para sus análisis.

## **V.6. CONCLUSIONES**

De acuerdo con los resultados obtenidos en los diferentes estudios realizados, se puede concluir que:

- Aunque la presencia de grandes cantidades de matriz de emulsión doble influye en la eficacia de atomización, en la velocidad de aspiración y/o la eficacia de nebulización, es posible llevar a cabo la determinación rápida y directa de Si en emulsiones W<sub>1</sub>/O/W<sub>2</sub> seleccionando las condiciones óptimas para la introducción de la muestra y diluyendo adecuadamente la muestra con agua ultrapura.
- Para factores de dilución menores o igual a 0.4 es posible efectuar una calibración simple con patrones preparados en agua ultrapura.
- Ambos modos de introducción de muestra (continuo y discontinuo) pueden emplearse para llevar a cabo el análisis.
- El método desarrollado presenta sensibilidades, precisiones y valores de LODs y LOQs adecuados para la caracterización del Si encapsulado en emulsiones dobles.
- El mejor LOD y las mejores precisiones se obtuvieron para el modo de introducción de la muestra en continuo, pero la gran cantidad de muestra que se aspira empleando este modo de introducción, hace que sea necesario detener más frecuentemente la secuencia de análisis para limpiar el sistema de nebulización y evitar su obstrucción, que para el modo de introducción de muestra en discontinuo. Con el modo de introducción discontinua de la muestra, además de minimizar este efecto indeseable, el consumo de muestra se redujo considerablemente.

## V.7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] A. Agrawal, S. Kulkarni, S.B. Sharma, *Recent advancements and applications of multiple emulsions*, Int. J. Adv. Pharm. 4 (2015) 94-102.
- [2] G. M. Tedajo, S. Bouttier, J. Fourniat, J. L. Grossiord, J. P. Marty, M. Seiller, *Release of antiseptics from the aqueous compartments of a w/o/w multiple emulsion*, Int. J. Pharm. 288 (2005) 63-72.
- [3] M. L. Cole, T. L. Whateley, *Release rate profiles of theophylline and insulin from stable multiple w/o/w emulsions*, J. Controlled Release 49 (1997) 51-58.
- [4] F. Cournarie, M. P. Savelli, V. Rosilio, F. Bretez, C. Vauthier, J. L. Grossiord, M. Seiller, *Insulin-loaded W/O/W multiple emulsions: comparison of the performances of systems prepared with medium-chain-triglycerides and fish oil*, Eur. J. Pharm. Biopharm. 58 (2004) 477-482.
- [5] B. Mutaliyeva, D. Grigoriev, G. Madybekova, A. Sharipova, S. Aidarova, A. Saparbekova, R. Miller, *Microencapsulation of insulin and its release using w/o/w double emulsion method*, Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 521 (2017) 147-152.
- [6] G. Muschiolik, E. Dickinson, *Double emulsions relevant to food systems: preparation, stability, and applications*, Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 16 (2017) 532-555.
- [7] F. Jiménez-Colmenero, *Potential applications of multiple emulsions in the development of healthy and functional foods*, Food Res. Int. 52 (2013) 64-74.
- [8] B. Li, Y. Jiang, F. Liu, Z. Chai, Y. Li, Y. Li, X. Leng, *Synergistic effects of whey protein-polysaccharide complexes on the controlled release of lipid-soluble and water-soluble vitamins in  $W_1/O/W_2$  double emulsion systems*, Int. J. Food Sci. Tech. 47 (2012) 248-254.
- [9] J. Wang, A. Shi, D. Agyei, Q. Wang, *Formulation of water-in-oil-in-water (W/O/W) emulsions containing trans-resveratrol*, RSC Adv. 7 (2017) 35917-35927.

- [10] M. Bonnet, M. Cansell, A. Berkaoui, M.H. Ropers, M. Anton, F. Leal-Calderon, *Release rate profiles of magnesium from multiple W/O/W emulsions*, Food Hydrocoll. 23 (2009) 92-101.
- [11] J. Weiss, I. Scherze, G. Muschiolik, *Polysaccharide gel with multiple emulsions*, Food Hydrocoll. 19 (2005) 605-615.
- [12] M. E. Rodríguez-Huezo, R. Pedroza-Islas, L. A. Prado-Barragán, C. I. Beristain, E. J. Vernon-Carter, *Microencapsulation by spray drying of multiple emulsions containing carotenoids*, J. Food Sci. 69 (2004) E351-E359.
- [13] M. E. Malone, I. A. M. Appelqvist, I. T. Norton, *Oral behaviour of food hydrocolloids and emulsions. Part 2. Taste and aroma release*, Food Hydrocoll. 17 (2003) 775-784.
- [14] M. Yildirim, G. Sumnu, S. Sahin, *Rheology, particle-size distribution, and stability of low-fat mayonnaise produced via double emulsions*, Food Sci. Biotechnol. 25 (2016) 1613-1618.
- [15] V. Eisinaite, D. Juraite, K. Schroën, D. Leskauskaite, *Food-grade double emulsions as effective fat replacers in meat systems*, J. Food Eng. 213 (2017) 54-59.
- [16] A.V. Hirner, D. Flasbeck, *Speciation of silicon*, en *Handbook of elemental speciation II: Species in the environment, food, medicine & occupational health*, R. Cornelis, H. Crews, J. Caruso, K.G. Heumann (eds.), John Wiley & Sons, Ltd., 2005, pp. 366-377.
- [17] K.R. Martin, *Silicon: The health benefits of a metalloid*, en *Interrelations between essential metal ions and human diseases*, A. Sigel, H. Sigel, R.K.O. Sigel (eds.), Metal ions in life sciences 13, Springer, 2013, pp. 451-473.
- [18] A. Barel, M. Calomme, A. Timchenko, K. De. Paepe, N. Demeester, V. Rogiers, P. Clarys, D. Vanden Berghe, *Effect of oral intake of choline-stabilized orthosilicic acid on skin, nails and hair in women with photodamaged skin*, Arch. Dermatol. Res. 297 (2005) 147-153.
- [19] F.H. Nielsen, *Update on the possible nutritional importance of silicon*, J. Trace Elem. Med. Biol. 28 (2014) 379-382.

- [20] J.L. Domingo, M. Gomez, M.T. Colomina, *Oral silicon supplementation: an effective therapy for preventing oral aluminum absorption and retention in mammals*, Nutr. Res. 69 (2011) 41-51.
- [21] F. Chainet, Ch.P. Lienemann, M. Courtiade, J. Ponthus, O.F.X. Donard, *Silicon speciation by hyphenated techniques for environmental, biological and industrial issues: A review*, J. Anal. At. Spectrom. 26 (2011) 30-51.
- [22] R. Sanchez, C. Sánchez, C.P. Lienemann, J.L. Todolí, *Metal and metalloid determination in biodiesel and bioethanol*, J. Anal. At. Spectrom. 30 (2015) 64-101.
- [23] R. Sánchez, J.L. Todolí, C.P. Lienemann, J.M. Mermet, *Determination of trace elements in petroleum products by inductively coupled plasma techniques: A critical review*, Spectrochim. Acta B 88 (2013) 104-126.
- [24] T.W. May, R.H. Wiedmeyer, *A table of polyatomic interferences in ICP-MS*, At. Spectrosc. 19 (1998) 150-155.
- [25] Z. Kowalewska, J. Pilarczyk, L. Gosciniak, *Spectral aspects of the determination of Si in organic and aqueous solutions using high-resolution continuum source or line source flame atomic absorption spectrometry*, Spectrochim. Acta B 120 (2016) 45-56.
- [26] L.C.C. de Oliveira, M.A. Vieira, A.S. Ribeiro, M.T. Lisboa, R.A. Gonçalves, R.C. de Campos, *Determination of Silicon in Vegetable Oil and Biodiesel by High-Resolution Continuum Source Flame Atomic Absorption Spectrometry Using Sample Dilution with Xylene*, Energy Fuels 26 (2012) 7041-7044.
- [27] I.M. Goncalves, M. Murillo, A.M. González, *Determination of metals in used lubricating oils by AAS using emulsified samples*, Talanta 47 (1998) 1033-10.
- [28] J.L. Burguera, M. Burguera, *Analytical applications of emulsions and microemulsions*, Talanta 96 (2012) 11-20.

- [29] C. Viana, D. Bohrer, L.M. de Carvalho, P.C. do Nascimento, M.B. da Rosa, *Emulsified systems for metal determination by spectrometric methods*, Trends Anal. Chem. 53 (2014) 49-59.
- [30] F. H. Lyra, M. T. W. D. Carneiro, G. P. Brandão, H. M. Pessoa, E. V. de Castro, *Determination of Na, K, Ca and Mg in biodiesel samples by flame atomic absorption spectrometry (FAAS) using microemulsion as sample preparation*, Microchem. J. 96 (2010) 180-185.
- [31] R. S. Amais, E. E. Garcia, M. R. Monteiro, J. A. Nóbrega, *Determination of Ca, Mg, and Zn in biodiesel microemulsions by FAAS using discrete nebulization*, Fuel 93 (2012) 167-171.
- [32] M.V. Reboucas, D. Domingos, A.S.O. Santos, L. Sampaio, *Determination of trace metals in naphtha by graphite furnace atomic absorption spectrometry: Comparison between direct injection and microemulsion pretreatment procedures*, Fuel Process. Technol. 91 (2010) 1702-1709.
- [33] M.S. Luz, P.V. Oliveira, *Niobium carbide as permanent modifier for silicon determination in petrochemical products by emulsion-based sampling GF AAS*, Fuel 116 (2014) 255-260.
- [34] K. Szivos, *The application of organic solvents in atomic absorption spectrophotometry*, Period. Polytech. Chem. Eng. 25 (1981) 121-132.
- [35] J.L. Raposo Jr., S.R. Oliveira, J.A.G. Neto, J.A. Nobrega, B.T. Jones, *Determination of silicon in lubricating oil by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry using least-square background correction and internal standardization*, Anal. Lett. 44 (2011) 2150-2161.
- [36] S. Cofrades, R. Bou, B. Gómez-Nieto, J.R. Procopio, A. Errabi, F. Jimenez-Colmenero, *Physicochemical properties and encapsulation of silicon in double emulsions for healthier food applications*, J. Food Sci. Technol. 53 (2016) 3884-3893.





## **CAPÍTULO VI / CHAPTER VI:**

Determinación de calcio en micro-muestras  
biológicas mediante HR-CS GFAAS

Calcium determination in biological micro-samples  
by HR-CS GFAAS



## VI.1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en la optimización de una metodología analítica para la determinación directa de calcio en micro-muestras biológicas. La motivación de desarrollar esta metodología surge como fruto de la demanda analítica por parte del grupo de investigación *Señalización mitocondrial de calcio y señalización de insulina/leptina en envejecimiento* del Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CBMSO) dirigido por la Dra. Jorgina Satrústegui.

### - *Importancia y regulación del calcio en el organismo:*

El Ca es un elemento esencial para los seres vivos y juega un papel fundamental en el control y regulación de diferentes procesos de gran importancia para la vida de las células. El Ca es el mineral más abundante de nuestro organismo y el tercer catión más abundante a nivel extracelular, tras el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{K}^+$ . Prácticamente, la totalidad del Ca corporal (entre el 98-99%) se encuentra en el tejido óseo, formando minerales cálcicos como hidroxapatito y otros fosfatos de calcio, que proporcionan resistencia e integridad estructural a huesos y dientes. De hecho, el esqueleto constituye el principal reservorio de Ca del organismo, existiendo un equilibrio dinámico en el que el esqueleto está continuamente formándose y reabsorbiéndose, con el fin de mantener los niveles de calcemia. El 1-2 % del Ca restante del organismo se halla en los distintos fluidos corporales intracelulares y extracelulares en forma de calcio libre ( $\text{Ca}^{2+}$ ), unido a proteínas o formando complejos solubles con iones como el bicarbonato, citrato, fosfato y lactato [1].

Numerosos procesos biológicos son directamente dependientes de las concentraciones de Ca intracelular y extracelular. Estas concentraciones están estrictamente reguladas en el organismo, con el fin de mantener los niveles de este elemento dentro de unos límites estrechos y estables [2,3]. El nivel basal de Ca en el citoplasma se encuentra habitualmente entre 0.1 y 0.2  $\mu\text{M}$ , siendo considerablemente superior el nivel en ciertos orgánulos intracelulares, como las mitocondrias y el retículo endoplasmático [3]. La concentración de Ca extracelular suele ser entre diez y mil veces superior a la concentración intracelular, siendo del orden de unos pocos mM en los mamíferos. Esta diferencia entre las concentraciones extracelulares e intracelulares

permite al Ca actuar como mensajero en la transducción de señales extracelulares al interior de la célula, regulando distintos procesos vitales como la contracción y relajación muscular, la división y crecimiento celular, la regulación enzimática y la secreción de hormonas [1-3].

El Ca extracelular participa en el proceso de coagulación sanguínea al actuar como cofactor en la activación de las enzimas plasmáticas y está implicado en la eficiente mineralización del tejido óseo. Los niveles de Ca extracelulares están regulados por la hormona paratiroidea, la calcitonina y la vitamina D. Irregularidades en el proceso de homeostasis del Ca, pueden provocar tanto deficiencias (hipocalcemia) como un exceso (hipercalcemia) de este elemento en la sangre. Valores anómalos de Ca en el organismo están relacionados con diferentes trastornos y enfermedades [1, 2].

### - *Métodos analíticos para la determinación de calcio en muestras biomédicas y clínicas:*

El control de los niveles de Ca extracelulares e intracelulares es un tema de gran interés en el campo de la biomedicina y el análisis clínico. Las matrices analizadas más frecuentemente en estos campos son los fluidos extracelulares como sangre, plasma, suero u orina, así como muestras de diferentes tejidos. Entre los distintos métodos de análisis, las metodologías basadas en técnicas atómicas como la AAS, ICP-OES y ICP-MS se emplean frecuentemente como métodos de referencia para determinar Ca en este tipo de muestras [2, 4-7]. Todas estas metodologías requieren habitualmente un tratamiento inicial de la muestra para eliminar los componentes de la matriz y/o del empleo de métodos de calibración por adición estándar para minimizar la aparición de interferencias. Los riesgos de contaminación asociados a este tipo de tratamientos son especialmente relevantes en la determinación de Ca dada la ubicuidad de este elemento en el ambiente. Por otro lado, estas etapas previas de tratamiento de muestra aumentan el tiempo y el coste final del análisis y habitualmente requieren del empleo de una mayor cantidad de muestra. Para evitar estas etapas de tratamiento, se ha propuesto el uso de metodologías basadas en técnicas como la Fluorescencia de Rayos X (XRF) capaces de generar una señal analítica de Ca directamente sobre la muestra sin digerir [8, 9]. Sin embargo, la exactitud y precisión de estos métodos no siempre es suficiente para llevar a cabo el análisis de muestras clínicas.

La cuantificación de Ca en orgánulos intracelulares supone un mayor desafío analítico que el análisis de muestras extracelulares. La concentración intracelular de Ca es mucho más baja que la extracelular, por lo que es necesario el empleo de métodos analíticos lo suficientemente sensibles. Aunque las técnicas atómicas anteriormente mencionadas (AAS, ICP-MS o ICP-OES) presentan sensibilidades y precisiones adecuadas para abordar estos análisis, habitualmente requieren una apreciable cantidad de muestra. Como consecuencia, la resolución espacial necesaria para conocer la distribución del analito en la muestra con estos métodos es muy limitada. El análisis de estas muestras se ha abordado frecuentemente por técnicas que involucran el bombardeo de la muestra con electrones o átomos cargados como la técnica de Microanálisis de Rayos X por Microsonda de Electrones (EPXMA), la Espectroscopia Electrónica de Pérdidas de Energía (EELS), la Emisión de Rayos X Inducida por Partículas (PIXE), la Microscopia Iónica de Transmisión de Barrido (STIM) y la Espectroscopia de Plasma Inducido por Láser (LIBS), con las que se pueden alcanzar resoluciones espaciales del orden de unos pocos nanómetros [3, 10-14]. Sin embargo, cuando se usan estos métodos es habitual tener que llegar a un compromiso entre la resolución y el nivel de detección deseado, lo que dificulta en muchos casos la cuantificación de Ca intracelular.

Ante esta problemática, resulta necesario el desarrollo de metodologías analíticas que permitan determinar bajos niveles de Ca. Dada la alta sensibilidad de la GFAAS y la pequeña cantidad de muestra requerida, los métodos basados en el análisis directo de muestra mediante GFAAS son excelentes alternativas cuando se quiere estudiar la distribución de un analito en una muestra o se dispone de una cantidad de muestra muy limitada para el análisis. Estas metodologías basadas en GFAAS se han empleado para la determinación directa de elementos traza en fluidos extracelulares como sangre u orina empleando métodos de calibración por adición estándar para compensar los efectos de matriz [15, 16]. En la presente década se han desarrollado métodos basados en la HR-CS GFAAS para el análisis de este tipo de muestras. Así, Rello *et al.* [17] emplearon esta técnica para llevar a cabo la determinación simultánea de Mo y Ti de manera directa en muestras de orina depositadas en papel de filtro para uso clínico. Resano *et al.* han publicado varios trabajos donde se emplea la HR-CS GFAAS para llevar a cabo el análisis de especímenes individuales de *Daphnia magna*, un pequeño crustáceo planctónico

comúnmente empleado en estudios de citotoxicidad [18,19], o para estudiar la distribución de Au en distintos órganos de ratón que habían sido inoculados con nanopartículas de este elemento [20].

### VI.2. OBJETIVOS

El **objetivo** de este capítulo es desarrollar una metodología de análisis rápida, precisa y con un consumo mínimo de muestra que permita llevar a cabo la determinación de Ca en muestras de interés clínico y biomédico. Dado el amplio intervalo de concentraciones en que puede encontrarse el Ca en estas muestras, además de emplear una línea secundaria de Ca, se evaluó la posibilidad de ampliar el límite superior de linealidad, sin necesidad de realizar medidas o diluciones adicionales de las muestras, utilizando las alas del perfil de la línea para la cuantificación de las señales de absorbancia.

La metodología desarrollada se aplicó para llevar a cabo el análisis de muestras intracelulares como suspensiones de mitocondrias y muestras extracelulares como sangre.

### VI.3. PROCEDIMIENTOS

#### VI.3.1. Muestras y preparación de muestras

##### - Suspensiones de mitocondrias:

Las suspensiones de mitocondrias de hígados de ratón analizadas en este capítulo fueron proporcionadas por el grupo de investigación de la Dra. Jorgina Satrústegui del Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CBMSO).

El trabajo con animales para la obtención de estas muestras se realizó de acuerdo con los procedimientos aprobados en la Directiva 86/609 / CEE de la Unión Europea y con la aprobación del Comité de Ética de la Universidad Autónoma de Madrid.

Las muestras de mitocondrias se aislaron por centrifugación diferencial siguiendo el procedimiento descrito por Amigo *et al.* [21]. Para ello, se extirparon, lavaron y cortaron en finos trozos los hígados de los ratones. A continuación, los hígados picados se suspendieron y homogeneizaron en el tampón de aislamiento MSK de pH 7.4 (75 mM de D-manitol, 25 mM de sacarosa, 5 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_3$ , 20 mM de Tris-HCl, 0.5 mM de AEDT, 100 mM de KCl y 0.1% de albumina de suero bovino (BSA) libre de ácidos grasos). Mediante un proceso de centrifugación se aislaron las mitocondrias de estas muestras. Tras aislar las mitocondrias, éstas se resuspendieron en el tampón MSK. Estas suspensiones se transfirieron a tubos Eppendorf y se mantuvieron congeladas a  $-18\text{ }^\circ\text{C}$  hasta su análisis.

Antes del análisis, las muestras se descongelaron lentamente hasta alcanzar la temperatura ambiente y se homogeneizaron empleando un agitador tipo vórtex. El análisis de las suspensiones de mitocondrias se llevó a cabo sin necesidad de ningún tratamiento adicional de la muestra.

- **Muestras de sangre:**

Las muestras de sangre fueron donadas por tres voluntarios sanos, después de haber firmado el documento de consentimiento informado.

Las muestras se extrajeron mediante punción venosa estándar por un profesional sanitario. Las muestras se recogieron en tubos de 4 mL que contenían 7.2 mg de  $\text{K}_2\text{AEDT}$  (Vacutest Kima srl, Italia), y se almacenaron refrigeradas a  $4\text{ }^\circ\text{C}$  hasta su análisis.

Antes del análisis, las muestras se equilibraron hasta alcanzar la temperatura ambiente y se agitaron cuidadosamente de manera manual para su homogenización. A continuación, 0.50 mL de muestra de sangre se transfirieron a un matraz aforado de 10.0 mL, diluyéndose hasta la marca con agua ultrapura. Las muestras de sangre así preparadas se analizaron sin necesidad de llevar a cabo tratamientos o diluciones adicionales.

### VI.3.2. Preparación de las disoluciones patrón

Se prepararon patrones de Ca de distintas concentraciones empleando como medio de dilución agua ultrapura o disolución tampón MSK. La composición de dicho tampón se detalla en el *Apartado VI.3.1*. La preparación de los distintos patrones de Ca en agua ultrapura se llevó a cabo mediante la adecuada dilución de la disolución patrón comercial de Ca de 1000 mg L<sup>-1</sup>. La preparación de los patrones de Ca de diferentes concentraciones en el tampón de aislamiento MSK se llevó a cabo añadiendo a un volumen fijo de la disolución tampón un volumen constante de diferentes disoluciones patrón de Ca de concentración adecuada, preparadas en agua ultrapura, de modo que tras la dilución la concentración final de Ca fuera la deseada.

### VI.3.3. Procedimiento de medida y parámetros instrumentales

La determinación de Ca se llevó a cabo utilizando la línea secundaria de este elemento a 239.856 nm cuya sensibilidad relativa es del 1.1%. El programa de temperaturas empleado se muestra en la **Tabla VI.1**. Dada la naturaleza transitoria de las señales de absorbancia obtenidas en HR-CS GFAAS, para la evaluación y cuantificación de la señal de Ca se empleó la suma de las absorbancias integradas (PVSA) de los valores obtenidos para 3 píxeles del detector (CP±1).

**Tabla VI.1.** Programa de temperaturas optimizado para la determinación de Ca.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C s <sup>-1</sup> )	Tiempo de mantenimiento (s)	Flujo de argón (L min <sup>-1</sup> )
Secado 1	90	3	20	2.0
Secado 2	110	5	10	2.0
Pirólisis 1	550	50	20	2.0
Pirólisis 2	1200	300	10	2.0
Auto cero	1200	0	5	0.0
Atomización	2600	1500	10	0.0
Limpieza	2700	500	9	2.0

Las curvas de calibrado se construyeron diariamente dosificando manualmente con ayuda de una micropipeta 20 µL de la correspondiente disolución patrón de Ca sobre la plataforma para muestras sólidas (ver **Figura III.4B**, Apartado III.1.1, página 42). Para la determinación de Ca en las suspensiones de mitocondrias y las muestras de sangre se



dosificó un volumen adecuado entre 5 y 20  $\mu\text{L}$  sobre la plataforma para la realización de las medidas.

La cuantificación de Ca en las muestras se llevó a cabo por triplicado, tras interpolar el valor de absorbancia integrada promedio en la correspondiente curva de calibrado.

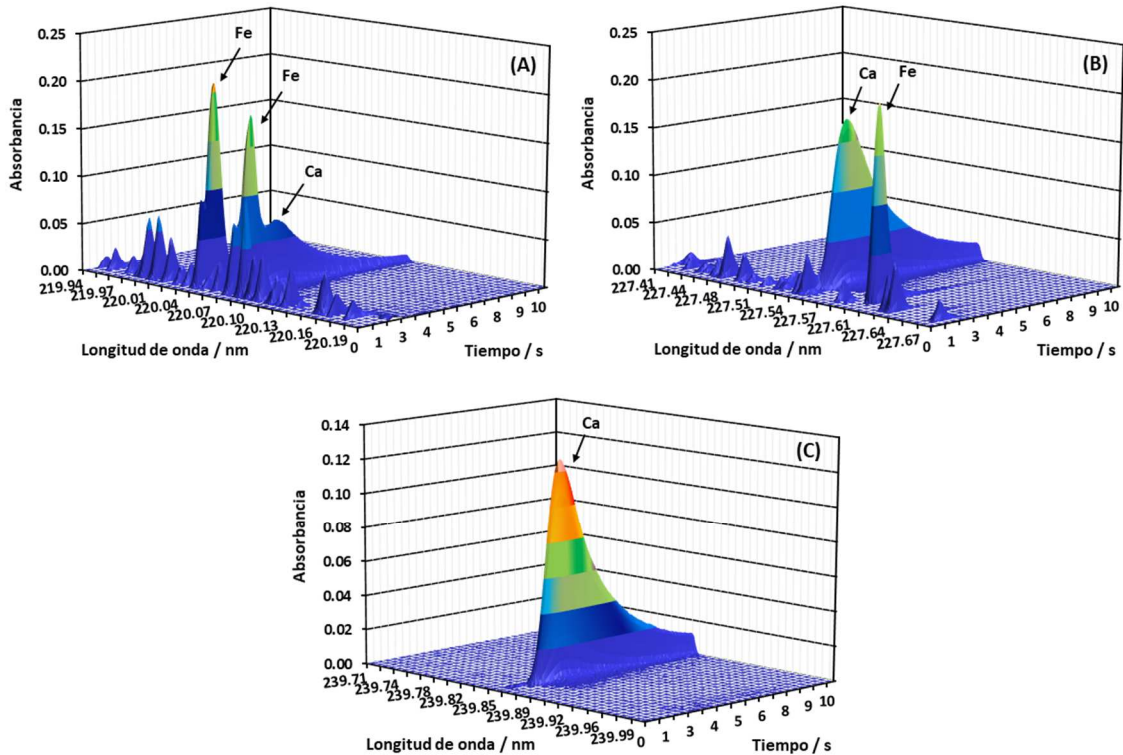
## **VI.4. OPTIMIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS**

### **VI.4.1. Elección de la longitud de onda de medida**

El Ca presenta varias líneas de absorción con distinta sensibilidad en el intervalo espectral de trabajo entre 185 y 900 nm. Entre ellas, se seleccionaron y evaluaron cuatro líneas, la línea principal de Ca a 422.673 nm con una sensibilidad relativa del 100%, y tres líneas secundarias a 220.073 nm, 227.547 nm y 239.856 nm, con sensibilidades relativas del 0.7, 1.7 y 1.1%, respectivamente.

La línea principal de Ca comúnmente se emplea en FAAS para la determinación de este elemento en concentraciones del orden de los miligramos litro, pero su uso en GFAAS es poco frecuente [22, 23]. Dado que los niveles de Ca en muestras biológicas intracelulares y extracelulares son normalmente del orden de  $\mu\text{M}$  o mM (0.04 – 40  $\text{mg L}^{-1}$ ), la línea principal de Ca es demasiado sensible y sería necesario emplear un factor de dilución muy elevado para el análisis de las muestras. El uso de una de las líneas secundarias de Ca, cuya sensibilidad media es entorno al 1.0%, parece más adecuado para la cuantificación de este elemento en las muestras que se desea analizar en este capítulo.

Con el fin de determinar cuál de las líneas secundarias de Ca es más apropiada para llevar a cabo el análisis de las muestras, para cada una de las líneas de análisis seleccionadas, se registraron y examinaron los espectros de absorbancia integrada frente al tiempo y la longitud de onda. A modo de ejemplo en la **Figura VI.1** se muestran los espectros obtenidos para el entorno de las líneas secundarias de Ca a 220.073 nm, 227.547 nm y 239.856 nm, cuando se analizó una muestra de suspensión de mitocondrias.



**Figura VI.1.** Espectros de absorbancia frente a la longitud de onda y el tiempo registrados para 5  $\mu\text{L}$  de muestra de suspensión de mitocondrias en la región espectral centrada en las líneas secundarias de Ca a 220.073 nm **(A)**, 227.547 nm **(B)** y 239.856 nm **(C)**.

En el entorno espectral de la línea secundaria de Ca a 220.073 nm (**Figura VI.1A**) además de la señal de absorbancia correspondiente a este elemento pueden observarse una serie de señales de fondo estructurado y dos señales de absorbancia correspondientes a líneas secundarias de Fe a 220.039 nm y 220.068 nm. Como puede apreciarse en la **Figura VI.1A**, a pesar de la elevada resolución que proporcionan los equipos de HR-CS AAS (aproximadamente 1.5 pm por píxel para esta zona espectral), la línea de absorción de Ca a 220.073 nm solapa completamente con la línea secundaria de Fe a 220.068 nm así como con (B) la señal de fondo estructurado, impidiendo la correcta cuantificación de este elemento. Para los espectros registrados en el entorno espectral de la línea secundaria de Ca a 227.547 nm (**Figura VI.1B**), también puede observarse la aparición de una serie de señales de fondo estructurado similares a las que aparecen en las proximidades de la línea secundaria de Ca a 220.073 nm. Además, en las proximidades de esta línea de análisis aparece una segunda línea atómica correspondiente a la línea secundaria de Fe a 227.560 nm. En este caso las líneas de Ca y Fe aparecen perfectamente separadas, pero la línea de Ca solapa con las señales de

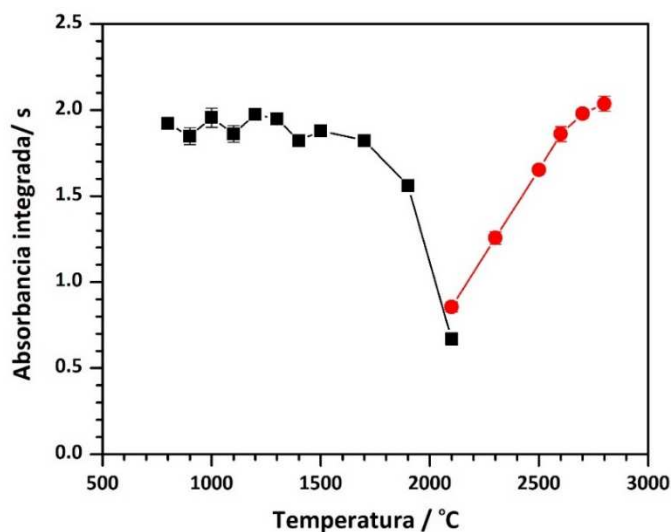
fondo estructurado, dificultando el uso de esta línea de Ca para el análisis de las muestras. En los espectros registrados en el entorno de la línea secundaria de Ca a 239.856 nm (**Figura VI.1C**) no se observan líneas atómicas de otros elementos ni señales de fondo estructurado que puedan ser causa de interferencias espectrales.

Como se ha comentado en el *Capítulo I* (Apartado 1.3.2, página 13), los equipos para HR-CS AAS permiten corregir matemáticamente mediante la aplicación de algoritmos LSBC interferencias espectrales como las observadas en las **Figuras VI.1 A y B**. Sin embargo, teniendo en cuenta que las sensibilidades relativas de las tres líneas secundarias de Ca evaluadas son muy similares, resulta menos tedioso seleccionar una línea secundaria libre de interferencias que identificar y eliminar estas interferencias. De este modo, se seleccionó la línea secundaria de Ca localizada a 239.856 nm como longitud de onda de trabajo para llevar a cabo la optimización de la metodología. Esta línea secundaria se ha empleado con éxito en el *Capítulo IV* para llevar a cabo la determinación de Ca en muestras medioambientales mediante HR-CS FAAS. Asimismo, podemos encontrar varios trabajos en la bibliografía donde se ha empleado dicha línea para llevar a cabo el análisis de distintas muestras como productos lácteos [24] y plantas [25] mediante HR-CS FAAS. Sin embargo, no se han encontrado trabajos previos sobre su uso en GFAAS.

#### **VI.4.2. Optimización del programa de temperatura**

Una vez establecida la longitud de onda de medida, se seleccionaron las condiciones del programa de temperatura más adecuadas para llevar a cabo la determinación de Ca en muestras biológicas. Con el fin de llevar a cabo un secado homogéneo de las disoluciones patrón y las muestras introducidas en el atomizador, se establecieron dos etapas de secado a 90 y 110 °C durante 20 y 10 s, respectivamente. Además, considerando el elevado contenido de materia orgánica de las muestras que se desea analizar en este capítulo, se fijó una primera etapa de pirólisis con una temperatura moderada de 550 °C durante 20 s. Para optimizar la temperatura de la segunda etapa de pirólisis y de la etapa de atomización se construyeron las curvas de pirólisis y atomización empleando una disolución patrón de Ca de 1.00 mg L<sup>-1</sup> en agua ultrapura (20 ng de Ca para un volumen de inyección de 20 µL).

Para obtener la curva de pirólisis de Ca, se varió la temperatura de pirólisis entre 800 °C y 2100 °C, manteniendo fija la temperatura de atomización a 2600 °C. Como puede observarse en la **Figura VI.2**, la absorbancia integrada permanece prácticamente constante entre 800 °C y 1700 °C, temperatura a partir de la cual la absorbancia integrada decae. Estos resultados indican que es factible el empleo de temperaturas de pirólisis lo suficientemente elevadas, que permitan eliminar la mayor parte de los componentes presentes en la matriz de las muestras, sin necesidad de emplear ningún modificador de matriz, y sin riesgo de que se produzca pérdida del analito durante la etapa de pirólisis. En principio, una temperatura moderada de pirólisis de unos 800 - 900 °C suele ser suficientemente para destruir la mayor parte de los componentes orgánicos presentes en las muestras biológicas. Con el fin de evitar interferencias espectrales causadas por la matriz de muestra y teniendo en cuenta la estabilidad térmica de este elemento se seleccionó una temperatura de pirólisis de 1200 °C.



**Figura VI.2.** Curvas de pirólisis (cuadros negros) y atomización (círculos rojos) para una disolución patrón de Ca de 1.00 mg L<sup>-1</sup> en agua ultrapura (20 ng de Ca). Temperatura de atomización utilizada para la curva de pirólisis: 2600 °C; temperatura de pirólisis utilizada para la curva de atomización: 1200 °C. Volumen de inyección: 20 µL.

El Ca es un elemento muy refractario que tiene tendencia a formar carburos estables. Esta característica hace que las señales de absorbancia de Ca sean anchas y presenten colas apreciables, y que sea un elemento con una gran tendencia a acumularse en la superficie de grafito produciendo el denominado *efecto memoria*. La temperatura de atomización se optimizó con el fin de obtener señales estrechas y

definidas, con valores de absorbancia integrada lo más elevados posible. Para obtener la curva de atomización se registraron las señales de absorbancia integrada para una disolución de Ca de  $1.00 \text{ mg L}^{-1}$  (20 ng de Ca), variando la temperatura de atomización entre 2100 °C y 2800 °C, y aplicando una temperatura de pirólisis constante de 1200 °C (**Figura VI.2**). En dicha figura, podemos observar como la absorbancia integrada aumenta bruscamente entre 2100 °C y 2600 °C, temperatura a partir de la cual el aumento es menos pronunciado. Por otra parte, se observó que a medida que se incrementaba la temperatura de atomización las señales de Ca obtenidas eran más estrechas y definidas. Sin embargo, dado que la vida útil de los tubos y plataformas de grafito disminuye rápidamente cuando se trabaja a temperaturas de atomización elevadas durante largos tiempos, se eligió como temperatura óptima de atomización 2600 °C. Para dicha temperatura se obtuvieron picos de absorbancia bien definidos, las señales de absorbancia integrada son prácticamente máximas y el deterioro de los componentes de grafito se reduce significativamente.

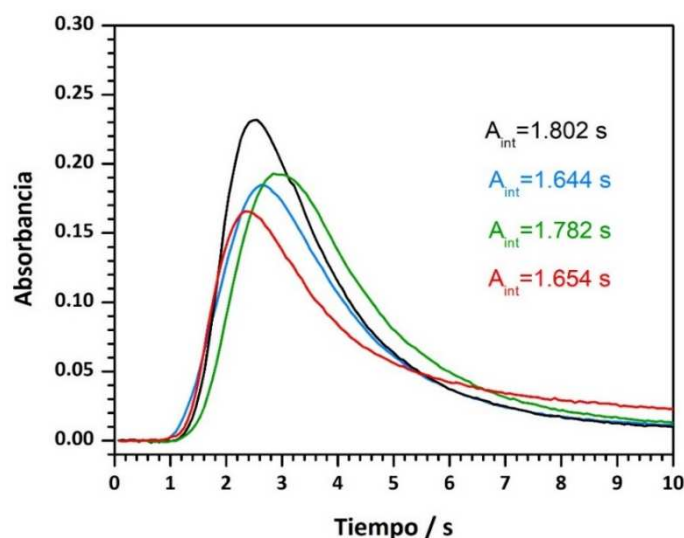
Para asegurar que las plataforma y tubo de grafito quedan limpios, después de la atomización se llevó a cabo una etapa de limpieza con una temperatura de 2700 °C. Se ensayaron varios tiempos de limpieza entre 3 y 10 s con el fin de evitar el *efecto memoria* entre medidas. Se observó que un tiempo de limpieza de 9 s es suficiente para evitar la presencia de Ca en posteriores medidas. Las condiciones óptimas finales del programa de temperatura se muestran en la **Tabla VI.1** (Apartado VI.3.3, página 143).

#### **VI.4.3. Influencia de la cantidad de muestra sobre la señal de absorbancia**

Cuando se analizan muestras mediante GFAAS que han sido sometidas a escaso o nulo tratamiento, es especialmente crítica la cantidad de muestra que se introduce en el atomizador ya que influye de modo determinante en la eficacia de las etapas de pirólisis y atomización. Por ejemplo, si se introducen cantidades de muestra muy elevadas, la eliminación de la matriz puede ser ineficiente y podría observarse un aumento de las señales de fondo.

Con el fin de optimizar la cantidad de muestra para llevar a cabo el análisis, se estudió la influencia de la matriz de muestra sobre la señal de absorbancia de Ca. Para ello, se introdujeron en el atomizador volúmenes de muestras de sangre y suspensiones de mitocondrias comprendidos entre 5 y 20  $\mu\text{L}$  y se aplicó el programa de temperaturas optimizado con patrones acuosos. Se obtuvieron buenas correlaciones lineales ( $r > 0.995$ ) entre el valor de absorbancia integrado y la cantidad de muestra, para todos los volúmenes de muestra de sangre ensayados, y para volúmenes de la suspensión de mitocondrias entre 5 y 15  $\mu\text{L}$ . Sin embargo, para volúmenes superiores a 15  $\mu\text{L}$ , se observó en el espectro registrado una señal intensa de absorción inespecífica antes del pico de Ca. Esta señal es probablemente debida a la dispersión de radiación (*scattering*) provocada por la presencia de pequeñas partículas de la matriz de suspensión mitocondrial que permanecen en el atomizador después de la etapa de pirólisis.

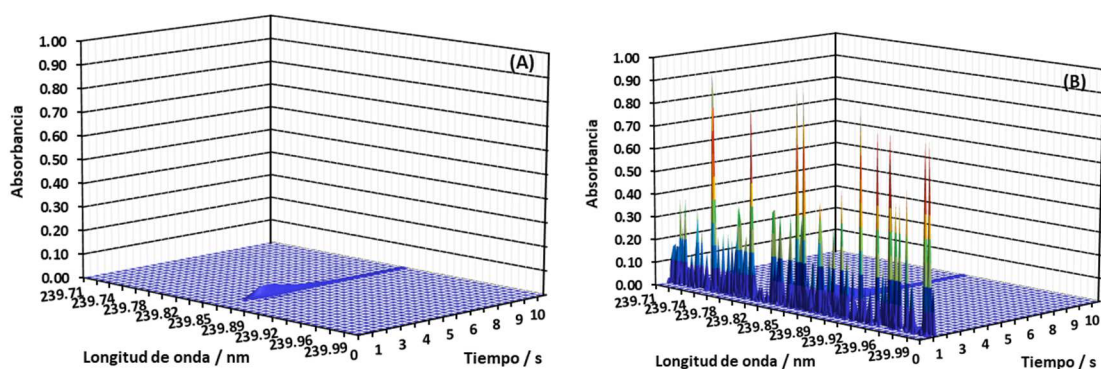
Para evaluar si las distintas matrices de las muestras estudiadas influían en el proceso de atomización de Ca se compararon la forma y las áreas de las señales obtenidas para las muestras con aquellas obtenidas para un patrón de Ca preparado en agua ultrapura y en la disolución tampón MSK. En la **Figura VI.3** se muestran las señales de absorbancia en función del tiempo y las áreas obtenidas cuando se introducen en el atomizador 10  $\mu\text{L}$  de disolución patrón de 2.00  $\text{mg L}^{-1}$  de Ca (20 ng) en agua ultrapura y en el tampón MSK, 5  $\mu\text{L}$  de una muestra de sangre y de una suspensión de mitocondrias.



**Figura VI.3.** Señales transitorias de absorbancia frente al tiempo para 10  $\mu\text{L}$  de un patrón de Ca de 2.00  $\text{mg L}^{-1}$  preparado en agua ultrapura (línea azul), 10  $\mu\text{L}$  de un patrón de Ca de 2.00  $\text{mg L}^{-1}$  preparado en tampón MSK (línea negra), 5  $\mu\text{L}$  de suspensión de mitocondrias (línea verde) y 5  $\mu\text{L}$  de sangre (línea roja).

Como puede apreciarse en la **Figura VI.3**, la forma y los tiempos a los que aparecen los picos de absorción en patrones y muestras son muy similares, lo que sugiere que la matriz de muestra no influye significativamente en la eficacia de atomización. Sin embargo, a pesar de que ambos patrones contienen la misma cantidad de Ca, si comparamos el área obtenida para el patrón de Ca preparado en agua ultrapura ( $A_{\text{int}}= 1.644$  s) con la obtenida para el patrón preparado en la disolución tampón MKS ( $A_{\text{int}}= 1.802$  s) se observa que para este último el área es ligeramente superior.

Con el fin de encontrar el origen de este incremento de área en el patrón de Ca preparado en la disolución tampón MSK, se registraron las señales de absorbancia para la disolución tampón en las proximidades de la línea de Ca. En la **Figura VI.4** se muestran los espectros de absorbancia frente al tiempo y la longitud de onda obtenidos cuando se introdujeron 10  $\mu\text{L}$  y 20  $\mu\text{L}$  de disolución tampón MSK en el atomizador. Como puede verse en la figura, a pesar de no adicionar Ca a la disolución, se detecta un pequeño pico a 239.856 nm, indicando la presencia de impurezas de Ca en los reactivos utilizados para preparar la disolución tampón MSK (**Figura VI.4A**). Por otra parte, en la **Figura VI.4B** se observa que al introducir un volumen de 20  $\mu\text{L}$  del tampón MSK en los primeros segundos del espectro aparece una señal intensa de absorbancia inespecífica. Estas señales son muy similares a las registradas cuando se utilizaron volúmenes de suspensiones de mitocondrias superiores a 15  $\mu\text{L}$ .



**Figura VI.4.** Espectros de absorbancia frente a la longitud de onda y el tiempo obtenidos cuando se introduce un volumen de 10  $\mu\text{L}$  (A) y 20  $\mu\text{L}$  (B) de la disolución tampón MSK en el espectrofotómetro.

A la vista de los resultados obtenidos y teniendo en cuenta la cantidad de muestra de la que se dispone, para el análisis de las suspensiones de mitocondrias se empleó un volumen de 5  $\mu\text{L}$ , y un volumen de 20  $\mu\text{L}$  para llevar a cabo el análisis de las muestras de sangre. Por otro lado, para medir los patrones de Ca preparados en la disolución tampón MSK se usaron volúmenes inferiores a 15  $\mu\text{L}$  mientras que, para medir los patrones preparados en agua ultrapura se puede emplear cualquier volumen entre 5 y 20  $\mu\text{L}$ . Usando estos volúmenes, no se observaron señales de absorbancia inespecífica a causa de la dispersión de radiación, ni se encontraron residuos carbonosos en la plataforma de grafito tras llevar a cabo el análisis de las muestras.

### VI.4.4. Calibración del método

Como se ha visto en la **Figura VI.3**, la similitud en la forma de los picos de las señales de absorbancia para las disoluciones patrón y las muestras sugiere que, empleando las temperaturas optimizadas con patrones acuosos, el comportamiento térmico y la liberación de Ca es esencialmente idéntica en los medios ensayados, indicando que el proceso de atomización no se ve afectado por la matriz de la muestra. De acuerdo con estos resultados, la calibración podría llevarse a cabo empleando patrones acuosos, lo que simplifica el método.

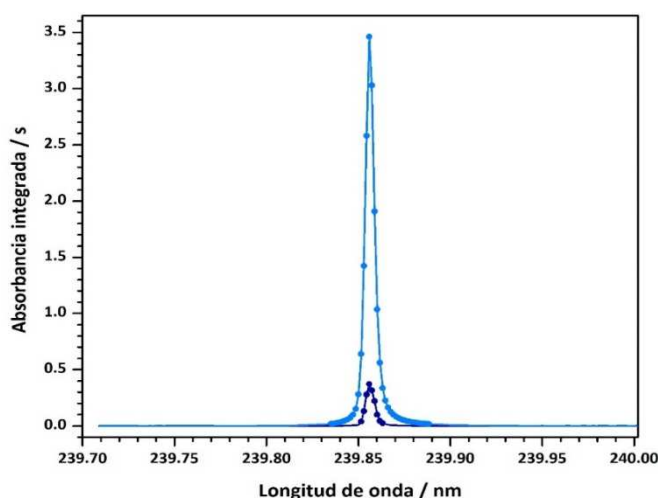
Con el fin de confirmar este supuesto, se compararon las curvas de calibrado obtenidas usando patrones preparados en agua ultrapura y en disolución tampón MSK para un intervalo de masas de Ca entre 0 y 2.00  $\text{mg L}^{-1}$  (0-40 ng inyectados). Las pendientes de las curvas de calibrado obtenidas son comparables, con valores de  $1.72 \pm 0.04 \text{ s L mg}^{-1}$  ( $0.086 \pm 0.002 \text{ s ng}^{-1}$ ) para la calibración con patrones preparados en agua ultrapura, y de  $1.84 \pm 0.08 \text{ s L mg}^{-1}$  ( $0.092 \pm 0.004 \text{ s ng}^{-1}$ ) para el calibrado con patrones preparados en la disolución tampón MSK. Se encontraron diferencias significativas entre los valores de las ordenadas en el origen de ambas rectas de calibrado, con un valor próximo a cero para el calibrado en agua ultrapura y un valor bastante apreciable empleando los patrones preparados en disolución tampón MSK. Este hecho es debido a las impurezas de Ca observadas en los reactivos utilizados para preparar el tampón MSK (ver **Figura VI.4A**).



Con el fin de corregir la señal debida a la presencia de Ca en los reactivos empleados para la preparación de las suspensiones de mitocondrias, se empleó la disolución tampón MSK como blanco para la determinación de Ca en estas muestras, restándose el valor de la absorbancia integrada de este blanco al valor de absorbancia integrada de las muestras. De este modo, se puede cuantificar adecuadamente la cantidad de Ca presente en las suspensiones de mitocondrias empleando patrones preparados en agua ultrapura.

#### VI.4.5. Ajuste de la sensibilidad y expansión del intervalo de respuesta lineal

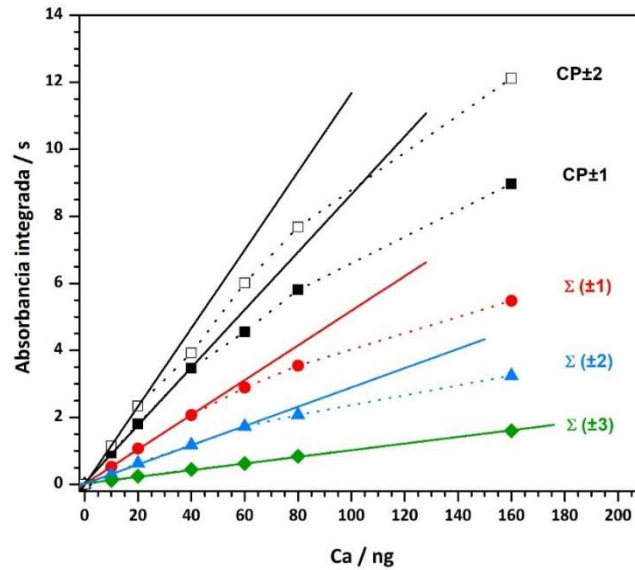
Como se ha comentado en el *Capítulo IV* (Apartado IV.3.5, página 62), en HR-CS AAS la sensibilidad del método puede aumentarse o disminuirse libremente por el analista variando tanto el número total de píxeles empleados para la cuantificación de la señal de absorbancia como la distancia de estos respecto al píxel central (CP) de la línea. En la **Figura VI.5** se muestra el perfil de absorbancia para la línea de Ca a 239.856 nm cuando se emplean patrones de 0.5 mg L<sup>-1</sup> (10 ng) y 8.0 mg L<sup>-1</sup> (160 ng). Como se puede ver en la figura, el entorno espectral registrado para esta línea es aproximadamente 0.3 nm ( $\pm 0.15$  nm alrededor de CP), y el perfil de absorbancia para el patrón de Ca de 0.50 mg L<sup>-1</sup> (10 ng) está prácticamente cubierto por 9-10 píxeles (aproximadamente 13.5-15.0 pm), incrementándose hasta 33-37 píxeles (aproximadamente 49.5-55.5 pm) para el patrón de 8.0 mg L<sup>-1</sup> (160 ng).



**Figura VI.5.** Perfil de absorbancia integrados en el tiempo frente a la longitud de onda para un patrón de Ca de 0.50 mg L<sup>-1</sup> (10 ng) (línea azul oscuro) y 8.0 mg L<sup>-1</sup> (160 ng) (línea azul claro). Los puntos indican los píxeles que definen el perfil de absorción atómica de estas disoluciones. Volumen de inyección: 20  $\mu$ L.

Se estudiaron las sensibilidades, los LOD y LOQ, y los límites superiores de linealidad (ULLR), empleando 1 (CP), 3 (CP±1) y 5 (CP±2) píxeles para la cuantificación de las señales. Al aumentar el número de píxeles de 1 (CP) a 5 (CP±2) se observó que la pendiente de la recta de calibrado aumentaba significativamente, pasando de 0.637 s L mg<sup>-1</sup> (0.0318 s ng<sup>-1</sup>) a 2.34 s L mg<sup>-1</sup> (0.117 s ng<sup>-1</sup>), respectivamente. Por otra parte, al incrementarse el número de píxeles empleados para la cuantificación de las señales el ULLR se redujo significativamente pasando de 3.25 mg L<sup>-1</sup> (81 μM o 65 ng de Ca) cuando se empleó 1 píxel (CP), a 1.25 mg L<sup>-1</sup> (31 μM o 25 ng de Ca) cuando se emplearon 5 píxeles (CP±2). El mejor LOD (0.020 mg L<sup>-1</sup> o 0.39 ng de Ca) se obtuvo empleando 3 píxeles (CP±1), deteriorándose ligeramente cuando se empleó 1 píxel (CP) (0.023 mg L<sup>-1</sup> o 0.45 ng de Ca) o 5 píxeles (CP±2) (0.022 mg L<sup>-1</sup> o 0.43 ng de Ca) para la cuantificación de las señales. Con el fin de obtener un LOD óptimo y una sensibilidad e intervalo de linealidad adecuados, se usaron 3 píxeles (CP±1) para la evaluación de las señales. Empleando estas condiciones, se obtuvo un LOD de 0.020 mg L<sup>-1</sup> (0.5 μM o 0.39 ng de Ca) con una sensibilidad de 1.72 s L mg<sup>-1</sup> (0.086 s ng<sup>-1</sup>) y un ULLR de 2.6 mg L<sup>-1</sup> (65 μM o 52 ng Ca). Estas condiciones de medida son adecuadas para cubrir el intervalo de concentraciones de la mayoría de las muestras analizadas.

Como se ha mencionado en la introducción, el contenido de Ca en las muestras biológicas puede oscilar hasta el orden del milimolar, por lo que, con el fin de desarrollar una metodología analítica versátil, que pueda ser empleada para analizar muestras biológicas con un mayor contenido de Ca, sin necesidad de realizar medidas o diluciones adicionales de las muestras, se evaluó la posibilidad de ampliar el ULLR utilizando la absorbancia de los píxeles laterales del perfil de la línea para la cuantificación de Ca. La **Figura VI.6** muestra las distintas curvas de calibrado obtenidas usando 5 (CP±2) y 3 (CP±1) píxeles, así como cuando se emplea únicamente la suma de las absorbancias de 2 píxeles a ambos extremos de CP ( $\Sigma (\pm 1)$ ,  $\Sigma (\pm 2)$  y  $\Sigma (\pm 3)$ ) para la cuantificación de las señales.



**Figura VI.6.** Curvas de calibrado obtenidas cuando se emplea la suma de las absorbancias integradas de los píxeles 99, 100, 101, 102 y 103 (CP±2), 100, 101 y 102 (CP±1), 100 y 102 ( $\Sigma(\pm 1)$ ), 99 y 103 ( $\Sigma(\pm 2)$ ) y 98 y 104 ( $\Sigma(\pm 3)$ ). Volumen de inyección: 20  $\mu$ L.

Como puede observarse, a medida que se eliminan un mayor número de píxeles centrales y se eligen los píxeles más alejados al CP (101) para llevar a cabo la cuantificación de las señales, la sensibilidad disminuye y el ULLR aumenta de manera significativa. El ULLR se amplió de 2.6  $\text{mg L}^{-1}$  (65  $\mu\text{M}$  o 52 ng Ca) utilizando los píxeles 100, 101 y 102 (CP±1) a más de 8.0  $\text{mg L}^{-1}$  (0.20 mM o 160 ng de Ca) usando únicamente los píxeles 98 y 104 ( $\Sigma(\pm 3)$ ). De este modo, es posible llevar a cabo el análisis de muestras con concentraciones de Ca comprendidas entre 0.066  $\text{mg L}^{-1}$  (1.6  $\mu\text{M}$  o 1.3 ng Ca) y 8.0  $\text{mg L}^{-1}$  (0.20 mM o 160 ng Ca) sin tener que cambiar las condiciones de medida o llevar a cabo medidas adicionales, simplemente reprocesando a posteriori los datos registrados en las condiciones de medida iniciales (CP±1). Esta posibilidad de ajustar la sensibilidad y la linealidad a posteriori, sin tener que volver a medir las muestras y patrones, es una ventaja muy interesante, especialmente para métodos de análisis de micro-muestras, debido a la disponibilidad limitada de las mismas, tal como las suspensiones mitocondriales. Esta posibilidad también es una ventaja cuando se requiere por ejemplo información sobre la distribución espacial de un analito ya que generalmente cada muestra solamente se puede analizar una vez.

### VI.4.6. Evaluación de los parámetros analíticos

Una vez establecidas las condiciones óptimas para la determinación de Ca se evaluaron los parámetros analíticos del método. El ULLR, el LOD y el LOQ se calcularon como se indica en el *Capítulo III* (Apartado III.3.2, página 48). Para la determinación del LOD y LOQ, el valor del blanco se determinó de acuerdo con el concepto de "masa cero", como la señal obtenida cuando la plataforma de muestra vacía se somete al programa de temperatura completo previamente establecido. La concentración ( $C_0$ ) o masa característica ( $m_0$ ), definida como la cantidad de analito que produce una señal de absorbancia integrada de 0.0044 s, se calcularon tras interpolar dicho valor de absorbancia en la correspondiente curva de calibrado. En la **Tabla VI.2** se recogen los valores obtenidos para estos parámetros.

**Tabla VI.2.** Parámetros analíticos para la determinación de Ca mediante HR-CS GFAAS

PARAMETROS	
Sensibilidad	1.72±0.04 s L mg <sup>-1</sup> (0.086±0.002 s ng <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>
r	0.9996
LOD	0.020 mg L <sup>-1</sup> (0.39 ng) <sup>a</sup>
LOQ	0.066 mg L <sup>-1</sup> (1.3 ng) <sup>a</sup>
Límite superior del intervalo lineal	2.6 mg L <sup>-1</sup> (52 ng) <sup>a</sup>
C <sub>0</sub> y m <sub>0</sub>	0.003 mg L <sup>-1</sup> (0.051 ng) <sup>a</sup>
RSD (n=3)	< 4%

<sup>a</sup> Entre paréntesis, valores expresados como masa de Ca para un volumen de inyección de 20 µL

La precisión, expresada como desviación estándar relativa (RSD), se estimó en términos de repetitividad midiendo por triplicado la señal de absorbancia integrada de patrones de Ca de diferentes concentraciones preparados en agua ultrapura. Los valores de RSD encontrados fueron en todos los casos menores al 4%.

Finalmente se evaluó la vida útil de los tubos y plataformas de muestra de grafito. Se estimó que cada tubo y plataforma puede usarse aproximadamente durante un máximo de 150 ciclos de medida sin deterioro del rendimiento analítico. La vida útil de las plataformas y tubos de grafito en esta aplicación es especialmente corta si la comparamos con la duración estándar de estos componentes. Esto es debido a las altas temperaturas, 2600 °C y 2700 °C y los largos tiempos 10 s y 9 s, que se requieren en las

etapas de atomización y limpieza, respectivamente, para obtener señales de absorbancia adecuadas para la cuantificación de Ca y evitar el *efecto memoria* entre replicas.

## VI.5. APLICACIÓN DEL MÉTODO AL ANÁLISIS DE MUESTRAS

### - Suspensiones de mitocondrias:

La metodología desarrollada en este capítulo se aplicó para llevar a cabo el análisis de ocho muestras de suspensiones de mitocondrias hepáticas de ratones. En la **Tabla VI.3** se muestran las concentraciones de Ca, expresadas en miligramos por litro y en nanomoles de Ca por miligramo de proteína, encontradas en estas muestras.

**Tabla VI.3.** Concentraciones (media  $\pm$  desviación estándar) de Ca obtenidas en las suspensiones de mitocondrias (n=3). Volumen de muestra empleado: 5  $\mu$ L.

Muestra	Ca (mg L <sup>-1</sup> )	Ca (nmol mg <sup>-1</sup> )
SM1	3.1 $\pm$ 0.1	4.5 $\pm$ 0.1
SM2	4.64 $\pm$ 0.04	6.97 $\pm$ 0.06
SM3	4.5 $\pm$ 0.2	7.1 $\pm$ 0.3
SM4	2.8 $\pm$ 0.1	2.63 $\pm$ 0.09
SM5	2.68 $\pm$ 0.06	2.51 $\pm$ 0.06
SM6	4.3 $\pm$ 0.2	3.9 $\pm$ 0.2
SM7	2.5 $\pm$ 0.1	2.29 $\pm$ 0.09
SM8	2.2 $\pm$ 0.1	2.1 $\pm$ 0.1

El contenido de Ca en estas suspensiones varía entre 2.2 mg L<sup>-1</sup> y 4.6 mg L<sup>-1</sup> (11 ng y 23 ng, expresado como masa de Ca). Otros autores han encontrado concentraciones similares de Ca en muestras de mitocondrias de ratón [26]. Para evaluar la validez del método propuesto varias de estas muestras se fortificaron por triplicado empleando diferentes niveles de concentración (**Tabla VI.4**). Se obtuvieron recuperaciones adecuadas entre el 92 y 96% para las muestras de mitocondrias fortificadas, confirmándose que el método desarrollado es válido para la determinación de Ca en este tipo de muestras.

**Tabla VI.4.** Concentraciones (media  $\pm$  desviación estándar) de Ca y porcentajes de recuperación obtenidos en el análisis de las suspensiones fortificadas de mitocondrias (n=3). Volumen de muestra empleado: 5  $\mu$ L

Muestra	Añadido (mg L <sup>-1</sup> )	Encontrado (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)
SM2	0.0	4.64 $\pm$ 0.04	-
	2.0	6.4 $\pm$ 0.1	96
	4.0	8.1 $\pm$ 0.3	94
SM3	0.0	4.5 $\pm$ 0.2	-
	2.0	6.22 $\pm$ 0.04	96
	4.0	8.1 $\pm$ 0.1	96
SM6	0.0	4.3 $\pm$ 0.2	-
	2.0	6.1 $\pm$ 0.2	96
	4.0	7.6 $\pm$ 0.4	92

- **Muestras de sangre:**

Las muestras de sangre obtenidas de tres voluntarios se analizaron por triplicado tras diluirse en agua ultrapura tal como se indica en el *Apartado VI.3.1*. Las concentraciones de Ca encontradas para todas las muestras fueron superiores al límite de linealidad del método empleando 3 píxeles (CP $\pm$ 1) para la cuantificación de la señal de absorbancia integrada, por lo que la determinación de Ca en estas muestras se llevó a cabo empleando los píxeles laterales del perfil de la línea. De este modo, tal como hemos visto en el Apartado VI.4.5 se pudo expandir el intervalo de respuesta lineal y llevar a cabo una adecuada cuantificación de Ca sin necesidad de efectuar nuevas diluciones y medidas de las muestras. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla VI.5**.

**Tabla VI.5.** Concentraciones (media  $\pm$  desviación estándar) de Ca obtenidas en las muestras de sangre (n=3). Volumen de muestra empleado: 20  $\mu$ L

Muestra	Ca (mg L <sup>-1</sup> )
S1	83 $\pm$ 4
S2	106 $\pm$ 7
S3	101 $\pm$ 1

Como puede verse en la tabla, las concentraciones de Ca obtenidas varían entre 83 y 106 mg L<sup>-1</sup>. Estos valores se encuentran dentro de los niveles habituales para este elemento en muestras de sangre (8.5-10.5 mg dL<sup>-1</sup> o 85-105 mg L<sup>-1</sup>). Finalmente, las muestras de sangre se fortificaron por triplicado con diferentes concentraciones de Ca para obtener los valores de recuperación (**Tabla VI.6**). Se obtuvieron valores de recuperación adecuados entre el 95% y 107%, confirmándose la validez del método desarrollado para la cuantificación de Ca.

**Tabla VI.6.** Concentraciones (media ± desviación estándar) de Ca y porcentajes de recuperación obtenidos en las muestras fortificadas de sangre (n=3). Volumen de muestra empleado: 20 µL.

Muestra	Añadido (mg L <sup>-1</sup> )	Encontrado (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)
S1	0	83±4	-
	20	103±3	100
	60	136±7	95
S2	0	106±7	-
	20	122±4	97
	60	178±8	107

## VI.6. CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un método analítico rápido y simple que permite llevar a cabo la determinación de Ca en micro-muestras biológicas. A partir de los resultados obtenidos en los estudios realizados, se extraen las siguientes conclusiones:

- Gracias al empleo de una línea secundaria de Ca (239.856 nm, sensibilidad 1%) y al uso de los píxeles laterales del perfil de la línea de análisis se pudo llevar a cabo la determinación de Ca en muestras con concentraciones de este elemento entre 0.066 y 8.0 mg L<sup>-1</sup> sin necesidad de llevar a cabo nuevas diluciones y medidas de las muestras.
- Empleando las condiciones de medida optimizadas (programa de temperatura y cantidad de muestra) se pudo llevar a cabo la determinación de Ca en muestras de suspensiones de mitocondrias y de sangre empleando patrones preparados en agua ultrapura.
- El análisis se realizó en unos pocos minutos (1-2 min) y empleando cantidades de muestra muy pequeñas (5-20 µL).

## VI.7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. Brini, D. Ottolini, T. Cali, E. Carafoli, *Calcium in health and disease*, en *Interrelations between essential metal ions and human diseases*, A. Sigel, H. Sigel, R.K.O.Sigel (eds.), Metal Ions in Life Sciences 13 Springer; 2013. pp 81-137.
- [2] B.A. Dilena, L. Larsson, S. Ohman, *Calcium*, en *Handbook on Metals in Clinical and Analytical Chemistry*, H.G. Seiler, A. Sigel, H. Sigel (eds.), Marcel Dekker, Inc.; 1994. pp 299-310.
- [3] S. Forsen, J. Kordel, *Calcium in biological systems*, en *Bioinorganic Chemistry*, I. Bertini, H.B. Gray, S.J. Lippard, J.S. Valentine (eds.), University Science Books; 1994. pp 107-166.
- [4] L. Zeneli, N. Daci, H. Pacarizi, M. Daci-Ajvazi, *Interaction between cadmium and calcium in human blood at the smokers*, Am. J. Pharm. & Toxicol. 5 (2010) 48-51.
- [5] H.I. Afridi, T.G. Kazi, N. Kazi, M.K. Jamali, M.B. Arain, N. Jalbani, R.A. Sarfaraz, A. Shah, G.A. Kandhro, A.Q. Shah, J.A. Baig, *Potassium, calcium magnesium and sodium levels in biological samples of hypertensive and nonhypertensive diabetes mellitus patients*, Biol. Trace Elem. Res. 124 (2008) 206-224.
- [6] J.M. Harrington, D.J. Young, A.S. Essader, S.J. Summer, K.E. Levine, *Analysis of human serum and whole blood for mineral content by ICP-MS and ICP-OES: development of a mineralomics method*, Biol. Trace Elem. Res. 160 (2014) 132-142.
- [7] G. Forte, B. Bocca, O. Senofonte, F. Petrucci, L. Brusa, P. Stanzione, S. Zannino, N. Violante, A. Alimonti, G. Sancesario, *Trace and major elements in whole blood, serum, cerebrospinal fluid and urine of patients with Parkinson's disease*, J. Neural. Transm. 111 (2004) 1031-1040.
- [8] A. Khuder, M.A. Bakir, J. Karjou, M.K. Sawan, *XRF and TXRF techniques for multi-element determination of trace elements in whole blood and human hair samples*, J. Radioanal. Nucl. Chem. 273 (2007) 435-442.



- [9] M.M. Redigolo, R.O. Aguiar, C.B. Zamboni, I.M. Sato, *Determination of reference interval values for inorganic elements in whole blood samples of humans and laboratory animals by X-ray fluorescence spectrometry*, J. Radioanal. Nucl. Chem. 297 (2013) 463-467.
- [10] R. Rajendran, R. Minqin, J.A. Ronald, B.K. Rutt, B. Halliwell, F. Watt, *Does iron inhibit calcification during atherosclerosis?*, Free Radic. Biol. Med. 25 (2012) 1675-1679.
- [11] B.A.W. Verhoef, P.M. Frederik, P.H.H. Bomans, G.J. van der Vusse, P.H.A. Mutsaers, E.C.P. de Lepper, M.J.A. de Voigt, *PIXE microanalysis of trace elements of the normoxic, ischemic and reperfused rat heart*, Nucl. Inst. & Meth. B. 104 (1995) 311-316.
- [12] M.W. Bourassa, L.M. Miller, *Metal imaging in neurodegenerative diseases*. Metallomics 4 (2012) 721-738.
- [13] E. Malucelli, M. Fratini, A. Notargiacomo, A. Gianoncelli, L. Merolle, A. Sargenti, C. Cappadone, G. Farruggia, S. Lagomarsino, S. Iotti, *Where is it and how much? Mapping and quantifying elements in single cells*, Analyst 141 (2016) 5221-5235.
- [14] S.J. Rehse, *Biomedical Applications of LIBS*, en *Laser-Induced breakdown spectroscopy*, S. Musazzi, U. Perini (eds.), Springer; 2014. pp. 457-488.
- [15] S.V. De Azevedo, F.R. Moreira, R.C. Campos, *Direct determination of tin in whole blood and urine by GF AAS*, Clin. Biochem. 46 (2013) 123-127.
- [16] M. Wójciak-Kosior, W. Szwerca, M. Strzemski, Z. Wichłacz, J. Sawicki, R. Kocjan, M. Latałski, I. Sowa, *Optimization of high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for direct analysis of selected trace elements in whole blood samples*, Talanta 165 (2017) 351-356.
- [17] L. Rello, A.C. Lapeña, M. Aramendía, M.A. Belarra, M. Resano, *A dried urine spot test to simultaneously monitor Mo and Ti levels using solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry*, Spectrochim. Acta B 81 (2013) 11-19.

- [18] J. Briceño, M.A. Belarra, K.A.C. Schamphelaere, S. Vanblaere, R.R. Janssen, F. Vanhaecke, M. Resano, *Direct determination of Zn in individual Daphnia magna specimens by means of solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry*, J. Anal. At. Spectrom. 25 (2010) 503-510.
- [19] M. Resano, A.C. Lapeña, M.A. Belarra, *Potential of solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry to monitor the Ag body burden in individual Daphnia magna specimens exposed to Ag nanoparticles*, Anal. Methods 5 (2013) 1130-1139.
- [20] M. Resano, E. Mozas, C. Crespo, J. Briceño, J.C. Menoyo, M.A. Belarra, *Solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry to monitor the biodistribution of gold nanoparticles in mice tissue after intravenous administration*, J. Anal. At. Spectrom. 25 (2010) 1864-1873.
- [21] I. Amigo, J. Traba, M.M. González-Barroso, C.B. Rueda, M. Fernández, E. Rial, A. Sánchez, J. Satrustegui, A. del Arco, *Glucagon regulation of oxidative phosphorylation requires an increase in matrix adenine nucleotide content through Ca<sup>2+</sup> activation of the mitochondrial ATP-Mg/Pi Carrier S<sub>Ca</sub>MC-3*, J. Biol. Chem. 288 (2013) 7791-7802.
- [22] H. Minami, Q. Zhang, S. Inoue, I. Atsuya, *Determination of ultra-trace levels of calcium in steel graphite furnace atomic absorption spectrometry*, Anal. Sci. 13 (1997) 199-203.
- [23] L.A. Powell, R.L. Tease, *Determination of calcium, magnesium, strontium, and silicon in brines by graphite furnace atomic absorption spectrometry*, Anal. Chem. 54 (1982) 2154-2158.
- [24] G.C. Brandao, G.D. Matos, S.L.C. Ferreira, *Slurry sampling and high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry using secondary lines for the determination of Ca and Mg in dairy products*, Microchem. J. 98 (2011) 231-233.

- [25] S.R. de Oliveira, J.L. Raposo, J.A.G. Neto, *Fast sequential multi-element determination of Ca, Mg, K, Cu, Fe, Mn and Zn for foliar diagnosis using high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry: feasibility of secondary lines, side pixel registration and least-squares background correction*, Spectrochim. Acta B 64 (2009) 593-596.
- [26] A. Martinez-Serrano, P. Blanco, J. Satrústegui, *Calcium binding to the cytosol and calcium extrusion mechanisms in intact synaptosomes and their alterations with aging*, J. Biol. Chem. 267 (1992) 4672-4679.



## **CAPÍTULO VII / CHAPTER VII:**

Caracterización del tamaño de nanopartículas de oro mediante GFAAS

Characterization of gold nanoparticle size by GFAAS



## VII.1. INTRODUCTION

In this chapter, it is presented the work carried out during my research stay at *Ulm University (UULM, Germany)* in the *Ultratrace Analysis Research Group*, under the supervision of Prof. Dr. Kerstin Leopold. This research group has extensive experience in the development of new and improved methods for the determination of trace elements and nanoparticles in real samples.

### - *Metallic nanoparticles. Methods for determination and size characterization:*

Metallic and metal oxide nanoparticles (NPs) such as gold, silver, platinum, and titanium dioxide are widely applied in different areas due to their unique catalytic, magnetic and optical properties that are derived from their small size and large surface area. These NPs have been incorporated in many commercial products such as cosmetics, clothes, food, as well as in technological and medical devices. Gold nanoparticles (AuNPs) are extensively used in biomedical fields, finding multiple applications in biomolecular detection, photothermal therapy, clinical diagnosis, and as anticancer drug and targeted drug delivery systems [1-5].

The increasing production and use of NPs have aroused the concern of the scientific community, international agencies and governments for the potential adverse effects of these materials on the environment and human health [6, 7]. Some properties of metallic NPs are different to those observed for bulk materials. These differences are mainly due to the small size and high surface reactivity of NPs that make them potentially toxic. In fact, some *in vitro* studies have shown cytotoxic, genotoxic and neurotoxic effects of metallic NPs on biological organisms [8]. Accordingly, the development of new analytical methods to provide rapid, simple, and cost-effective information about NPs size and metal concentration is a topic of increasing interest in the toxicology and environmental fields.

Multiple techniques can be used to detect, characterize and determine metal content of NPs [6, 9]. Among them, Scanning Electron Microscopy (SEM), Transmission Electron Microscopy (TEM) and Atomic Force Microscopy (AFM) are among the most commonly used techniques for NPs size, shape, and morphological characterization.

Although these techniques permit the detection of NPs sizes even smaller than 1 nm, they do not provide precise results on metal content, are very time-consuming when investigating real-world samples with low-level concentrations and are not commonly available in most analytical laboratories.

UV–visible spectroscopy can be used to determine both the size and the metal concentration of NPs in monodisperse aqueous suspensions [10, 11]. This technique is commonly available in analytical laboratories; however, its relatively low sensitivity is not adequate to fulfil the requirements of detectability in some studies. For the measurement of NPs size distribution and total metal content at the same time, analytical methodologies based on chromatographic separation such as Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation (AF4), Micellar Electrokinetic Chromatography (MEKC) or Hydrodynamic Chromatography (HDC) coupled to element-specific detection systems like Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) can also be employed [12-15]. Furthermore, ICP-MS working in the so-called “single particle mode” (spICP-MS) has gained an increasing interest in the last few years to quantify the amount and size distribution of metal NPs suspensions. Indeed, and due to the high detection power of this technique, it is currently considered one of the most promising techniques for the quantification and sizing of metal NPs suspensions in a straightforward way [13-18]. However, the possibilities of spICP-MS for size detection is still limited to sizes ranging from 10 nm to 20 nm for monoisotopic elements and the capability for lower sizes detection can be highly affected by the concentration of the ionic metal present in the samples [16, 19]. Moreover, the most important limitation of this technique is the necessity of carrying out sample treatments to dissolve the matrix sample. Sample treatments such as enzymatic or other digestion procedures could lead to changes in the particle sizes that can influence on the results. Indeed, in an interlaboratory study carried out about AgNPs size determination in chicken meat employing spICP-MS the different sizes obtained in the study were mainly associated with the large influence of the sample treatment on the size of these particles [20].

GFAAS is an excellent technique for the quantification of elements at very low concentration levels and recently it has been proposed as an efficient analytical tool for



the measurement of metallic NPs size. In 2012, Gagné *et al.* [21] reported a fast screening method for the discrimination of AgNPs from Ag ions in biological samples employing GFAAS. In that pioneering study, the authors demonstrated that the energy required to take an element as NP to the atomic state and, therefore the atomization temperature, is greater than the energy needed when the same element is as a metal ion. Moreover, an increase in the atomization temperature was observed as the particle size increases. Based on this fact, the authors proposed to use the absorbance ratios at two atomization temperatures ( $A_{2200^{\circ}\text{C}} / A_{1700^{\circ}\text{C}}$ ) as a parameter to discriminate AgNPs of from Ag (I).

Thereafter, the research group of Prof. Dr. Kerstin Leopold reported two new methods for the discrimination of AgNPs from Ag ions in parsley and different food samples such as apple, pepper, cheese, onion, pasta, maize and wheat flour employing SS-HR-CS GFAAS [22, 23]. In these studies, the authors confirmed that the atomization kinetics for Ag (I) and AgNPs are different. They also observed that the components of the sample have a significant influence on the thermal behaviour of Ag species. Some matrix components, such as proteins and amino acids, form strong bonds with Ag ions. Thus, the temperature for Ag (I) atomization can be higher in samples with high content of these components than to atomize Ag (I) in standard solutions. As a result, more thermal energy and therefore more time was required to atomize Ag (I) in samples with high content of these components than to atomize AgNPs. Taking into account these findings, the authors proposed the use of two new time-related parameters “atomization delay” ( $t_{\text{ad}}$ ) and “atomization rate” ( $k_{\text{at}}$ ) to discriminate AgNPs from Ag (I). The  $t_{\text{ad}}$  is defined as the time from the starting of the atomization step to the maximum of the absorbance signal is reached. This parameter is related to the amount of thermal energy required to atomize most of the atoms present in the graphite furnace. Thus, this time should increase with increasing NP size. The  $k_{\text{at}}$  is the slope value of the polynomial fitted curve from the first inflexion point to the maximum of the absorbance signal. This parameter is related with the number of atoms that are atomized per second in the atomization step. Moreover, the authors found that both parameters ( $t_{\text{ad}}$  and  $k_{\text{at}}$ ) could be employed to differentiate between Ag ions and AgNPs of different sizes.

The evaluation of  $t_{ad}$  and  $k_{at}$  has been applied to distinguish Au ions from AuNPs with different sizes. Resano *et al.* [24] applied HR-CS GFAAS to discriminate between Au (III) and AuNPs. In that work, the authors obtained different time signal profiles for Au (III) and AuNPs when the measurements were carried out in the absence of chemical modifiers, and using a slow atomization heating rate ( $150\text{ }^{\circ}\text{C s}^{-1}$ ). This fact permits to detect in a quick and easy way the presence of AuNPs. In addition, the authors concluded that the time of appearance of the peak maximum ( $t_{ad}$ ) was the best parameter to discriminate between different particle sizes. For this signal parameter, the authors obtained two ranges of linearity, the first one with a higher slope from Au ions to AuNPs of 20 nm, and the second one with a smaller slope for AuNPs between 20 and 100 nm. Leopold *et al.* investigated the behaviour of Au (III) solutions and AuNPs suspensions of different sizes, using also HR-CS GFAAS [25] and applying the previously established parameters  $t_{ad}$  and  $k_{at}$ . They found a linear correlation between the natural logarithms of AuNPs size and these parameters, so both parameters can be employed to carry out size discrimination. These authors also found an increase of  $t_{ad}$  values when Au (III) concentration was increased. This behaviour was attributed to the formation of Au aggregates with increasing sizes as Au (III) concentration increases.

Other authors have recently carried out further studies on AuNPs and AgNPs using GFAAS as the measurement technique. Gruszka *et al.* [26], using an instrument equipped with a silver hollow cathode lamp, have studied the influence of different stabilizing agents and atomization conditions to discriminate Ag (I) and AgNPs of different sizes in fabrics (wet wipes, T-shirts) containing silver based finishing agents. The most significant differences in time signal profiles for different Ag species were obtained using sodium citrate as stabilizing agent and  $975^{\circ}\text{C}$  as atomization temperature. Under these measurement conditions, a linear increase of  $t_{ad}$  values was observed when the NP size increases. In addition, a significant dependence of  $t_{ad}$  with Ag concentration was observed for Ag (I) and the smallest AgNPs sizes. Panyabut *et al.* [27], using also a GFAAS instrument equipped with gold and silver hollow cathode lamps, examined different atomization conditions for suspensions of AuNPs and AgNPs to enhance the differences in  $t_{ad}$  values for NPs with different sizes. In this work, it was also found a linear

correlation between the NP size and  $t_{ad}$  demonstrating the potential of this parameter to provide size information. Moreover, these authors studied the atomization behaviour of NPs and they found a linear correlation between the absorbance value and the activation energy ( $E_a$ ) and, at a fixed atomization temperature, they also found a relationship between  $E_a$  and NP size.

A better understanding of the atomization mechanisms of NPs in GFAAS is of great interest in order to improve the capability of this technique as analytical tool to determine NPs content and size distribution. In a recent publication [28], Anja Brandt and Kerstin Leopold investigated the atomization mechanism of AuNPs using a HR-CS GFAAS instrument. For that purpose, the authors examined the influence of concentrations of Au (III) and AuNPs on the  $t_{ad}$  values, and introduced new evaluation parameters for the characterization of the absorbance signals: the full width at half maximum of the peak (FWHM); the asymmetry factor of the peak (AF), and the appearance time ( $t_{AP}$ ). The results of this study seems to indicate that the mechanism of Au release are different in Au (III) solution and AuNPs suspensions but further investigations are required to determine the exact release order of AuNPs with different sizes.

As discussed in the previous paragraphs, all the published studies seem to indicate the potential of GFAAS as a tool to differentiate metal ion from NPs, but additional studies are required to establish adequate measurement strategies and parameters to distinguish between NPs with different sizes.

## VII.2. OBJECTIVE

The research activities carried out during my stay in the Prof. Dr. Kerstin Leopold's group were based on the previous findings for the differentiation of metal species by GFAAS using various parameters derived from the signals obtained under given experimental conditions.

The **objective** of my work was to deepen in the study of the differences in the processes of atomization of Au (III) and AuNPs of different sizes, using a prototype of an AAS instrument that allows the control and accurate monitoring of the temperature applied during the atomization step in GFAAS. Using this experimental approach, we aim to obtain data to establish the parameters that, under given measurement conditions, best correlate the differences of the signals measured for different gold species.

To achieve this goal, various tasks were carried out:

- Study of the influence of the characteristics of the graphite furnace employed on the reproducibility of the parameters  $k_{at}$  and  $t_{ad}$ .
- Evaluation of a new parameter, the temperature at signal maximum ( $T_{max}$ ) to differentiate Au species.
- Calculation of the activation energies ( $E_a$ ) values of Au (III) and AuNPs with different sizes in order to get information on the atomization mechanism of these Au species.

## VII.3. EXPERIMENTAL

### VII.3.1. Preparation of Au (III) solutions and AuNPs suspensions

All suspensions and solutions were prepared using ultrapure water obtained from a Milli-Q system (Millipore, Billerica, USA). The glassware and plastic containers were cleaned with *aqua regia* for 24 h, and then they were abundantly rinsed with ultrapure water before use.

- **Au (III) standard solutions:** These solutions were daily prepared by adequate dilution in ultrapure water of a 1000 mg L<sup>-1</sup> Au commercially available standard solution (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) to achieve a final concentration of 5 µg L<sup>-1</sup> of Au.
- **AuNPs suspensions:** Commercially available citrate-stabilized AuNPs suspensions of 5, 40 and 100 nm (BBI Solutions, Cardiff, UK) were used for all investigations. Before using, two aliquots of each suspension were dissolved in *aqua regia* to determine Au concentration by GFAAS under the standard measurement conditions (see **Table VII.1**, page 172). Au concentration in these solutions was: 53.5±0.3 mg L<sup>-1</sup>, 46.8±0.5 mg L<sup>-1</sup> and 45.0±0.6 mg L<sup>-1</sup>, for 5, 40 and 100 nm suspensions, respectively. The working AuNPs suspensions of 5 µg L<sup>-1</sup> were daily prepared by diluting the adequate volume of each stock suspension in ultrapure water. Before dilution, the stock suspensions were homogenized in a vortex for 30 s.

### VII.3.2. GFAAS instrument and measurement procedure

GFAAS experiments were carried out using a NovAA 800 spectrometer (Analytik Jena, Jena, Germany) equipped with a transversely heated graphite furnace atomizer unit, a deuterium background correction system and an auto sampler for liquid sampling. This spectrometer is a prototype equipped with an in-oven temperature sensor that allows knowing the actual temperature in the graphite tube between 1100 and 2300 °C. The instrument and software (Aspect LS version 1.6.0.RC2) were adapted in order to read-out the in-tube temperatures. Thus, temperatures and absorbance signal data can be simultaneously recorded. A gold hollow cathode lamp from Analytik

Jena (Jena, Germany) operating at 5.0 mA was employed as radiation source. The most sensitivity atomic line of Au at 242.8 nm and a spectral bandwidth of 0.8 nm were used for all measurements. The “cookbook” temperature program proposed by the instrument’s supplier (**Table VII.1**), and seven temperature programs with different atomization heating rates and total measurement times (**Table VII.2**) were used to perform the measurements of Au(III) solutions and AuNPs suspensions.

**Table VII.1.** Analytik Jena “cookbook” standard temperature program.

Step	Temperature (°C)	Heating rate (°C s <sup>-1</sup> )	Hold (s)	Total time (s)
Drying 1	80	6	20	28.3
Drying 2	90	3	20	23.3
Drying 3	110	5	10	14.0
Pyrolysis	800	300	30	32.3
Atomization	2000	1000	3	4.2
Cleaning	2550	500	4	2.0

**Table VII.2.** Temperature programs employed for the study of the Au (III) solutions and AuNPs suspensions.

Step	Temperature (°C)	Heating rate (°C s <sup>-1</sup> )	Hold (s)	Total time (s)
Drying 1	80	6	20	28.3
Drying 2	90	3	20	23.3
Drying 3	110	5	10	14.0
Pyrolysis	200	50	20	21.8
Atomization	2500	Variable: 50, 100, 200, 350, 500, 750, 1000	0	Variable: 46, 23, 11.5, 6.6, 4.6, 3.1, 2.3
Cleaning	2550	500	4	2.0

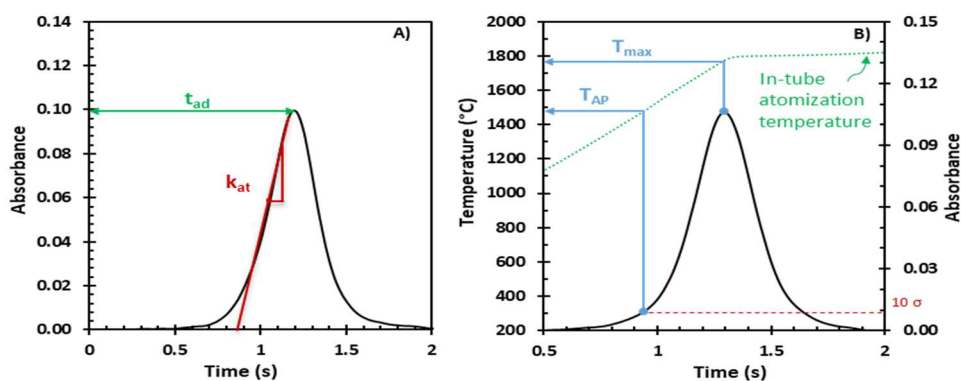
Argon with a purity of 99.996% (MTI, Neu-Ulm, Germany) was employed as purge and protective gas in the drying, pyrolysis and cleaning steps at a flow rate of 2.0 L min<sup>-1</sup>. The Argon flow was stopped in the atomization step. For each measurement 20 µL of Au (III) solution or AuNPs suspension were automatically introduced into the graphite tube by the autosampler. To ensure homogeneity, AuNPs suspensions were thoroughly shaken by manual agitation prior to place them in the autosampler cups. For all experiments, pyrolytic graphite-coated tubes with integrated platforms (Analytik Jena, Jena, Germany) were used.

### VII.3.3. Parameters evaluated from the experimental absorbance signals

The following parameters obtained from the absorbance signals were evaluated:

- **Atomization rate ( $k_{at}$ ):** slope at the first inflection point of the polynomial fitted curve of the first section of the absorbance signal profile ( $s^{-1}$ ).
- **Atomization delay ( $t_{ad}$ ):** time from the starting point of the atomization step to the maximum peak height absorbance (s).
- **Difference in atomization delay ( $\Delta t_{ad}$ ):** time difference between the maximum peak heights of two different Au forms (s).
- **Temperature at signal maximum ( $T_{max}$ ):** temperature required to atomize most of the atoms in the discrete sample introduced into the furnace ( $^{\circ}C$ ). This is the temperature value measured at the time corresponding to the maximum peak height. These temperature data were obtained from the sensor temperature-time registered profiles of the graphite tube.
- **Appearance temperature ( $T_{AP}$ ):** temperature value measured when the absorbance signal reached the signal to noise ratio 10:1. This is the temperature required to atomize an analyte amount similar to the limit of quantification.
- **Difference in temperature at signal maximum ( $\Delta T_{max}$ ):** temperature difference between the maximum peak heights of two different Au forms ( $^{\circ}C$ ).

For a better understanding, some of these parameters are illustrated in **Figure VII.1**. All data evaluation for signal interpretation was carried out using OriginPro 8.5 and Excel data software.

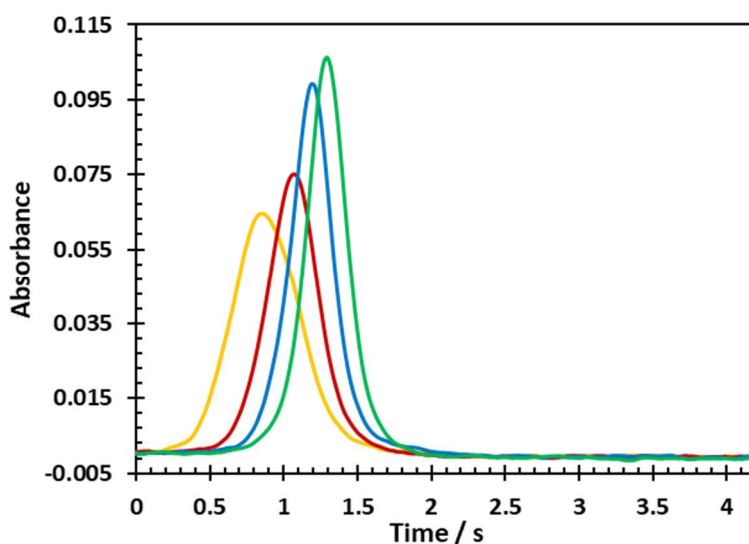


**Figure VII.1.** Illustration of the parameters evaluated. **(A)** Atomization rate ( $k_{at}$ ) and Atomization delay ( $t_{ad}$ ); **(B)** Temperature at signal maximum ( $T_{max}$ ) and Appearance temperature ( $T_{AP}$ ).

## VI.4. RESULTS AND DISCUSSION

### VII.4.1. Preliminary studies

As discussed in the introduction, the GFAAS methods for the discrimination of metal ions from NPs are based mainly on the differences on the thermal energy that seem to be required to atomize ions and NPs of different sizes. In order to corroborate this fact, preliminary studies on the atomization behaviour of Au (III) and AuNPs were carried out employing AuNPs suspensions of 5, 40, and 100 nm, and Au (III) solutions of  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  using the GFAAS “cookbook” standard temperature program described in **Table VII.1**. **Figure VII.2** shows the absorbance-time peak profiles for Au (III) and the AuNPs suspensions using these measurement conditions.



**Figure VII.2.** Absorbance-time signal profiles for Au (III) (yellow line), and AuNPs suspensions of 5 nm (red wine line), 40 nm (blue line), and 100 nm (green line) using the temperature program in Table VII.1. Au concentration:  $5 \mu\text{g L}^{-1}$

As can be seen in this figure, the absorbance peak for Au (III) ions appears first, followed by those for AuNPs of 5 nm, 40 nm, and 100 nm. These results are in agreement with those obtained by other authors in previous studies [24-28] and demonstrate the capability of GFAAS to distinguish between Au (III) and AuNPs with different sizes.



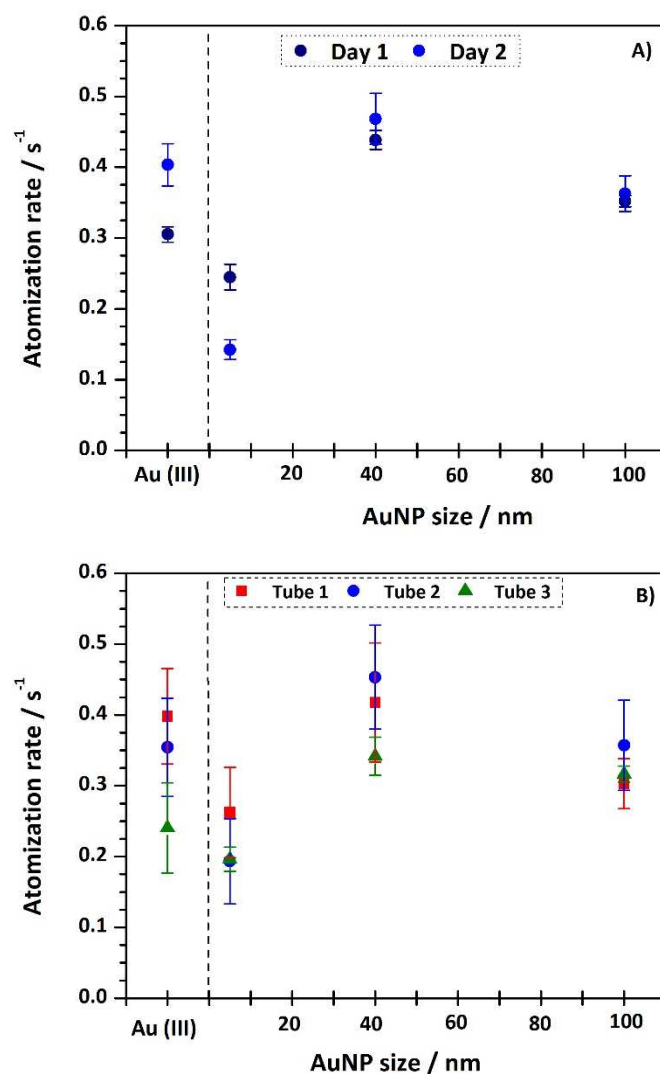
## VII.4.2. Evaluation of parameters derived from the absorbance signal for AuNPs size discrimination

As it was indicated in the introduction, several parameters defined from the absorbance signals, such as  $k_{at}$  and  $t_{ad}$ , have been proposed in the literature to discriminate between ions and NPs of a metal, and estimate the size of these NPs [22-28]. In this section, the effectiveness and robustness of three parameters ( $k_{at}$ ,  $t_{ad}$  and  $T_{max}$ ) to discriminate AuNPs sizes were evaluated.

To obtain the values of the signal parameters, Au (III) solutions and AuNPs suspensions of 5, 40, and 100 nm, were measured employing the “cookbook” temperature program (see **Table VII.1**). The precision of these parameters was evaluated by replicate measurements ( $n=2$ ) of the different solutions and suspensions employing the same graphite tube on two different days, as well as by using three different graphite tubes on two different days.

### VII.4.2.1. Evaluation of the atomization rate ( $k_{at}$ )

The  $k_{at}$  values for Au (III) solutions and AuNPs suspensions were obtained fitting the first section of absorbance peak profiles to a polynomial curve. The  $k_{at}$  values were calculated as the slope at the first inflection point of the fitted curve (see the **example in Figure VII.1a**). The  $k_{at}$  values obtained for the different Au forms are shown in **Figure VII.3**. As can be seen in this figure,  $k_{at}$  values do not seem to follow a clear tendency with the AuNP size. It was observed an increase of  $k_{at}$  values for AuNPs sizes from 5 to 40 nm, and a slight decrease for AuNP sizes from 40 to 100 nm. Moreover, the  $k_{at}$  values for Au (III) were even higher than those for AuNPs of 5 nm. Taking into account the high variability observed for this parameter, up to 10 % for intra-day replicate measurements using the same graphite tube, and up to 25 % for inter-day measurements employing different graphite tubes, it can be considered that the trend of  $k_{at}$  with the Au form is not clear. A similar behaviour of  $k_{at}$  values for Au (III) and AuNPs was also observed by Resano *et al.* [24].

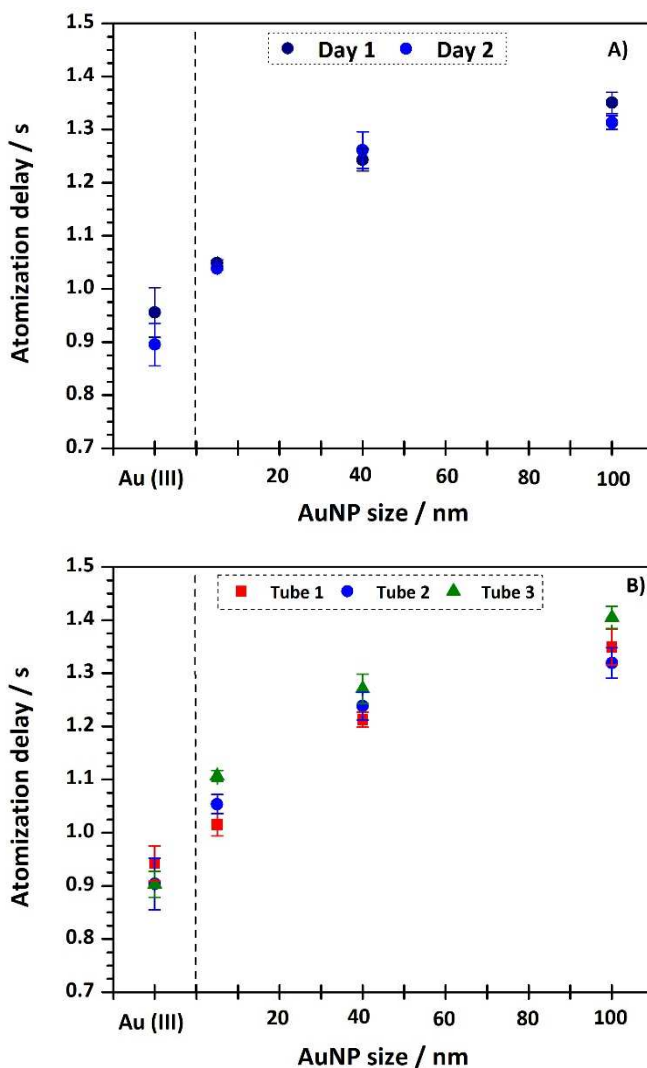


**Figure VII.3.** Atomization rates ( $k_{at}$ ) for Au (III) solutions and AuNPs suspensions of 5, 40 and 100 nm. **(A)** Employing the same graphite tube on two different days (inter-day measurements). Error bars represent standard deviation of 2 replicates; **(B)** Using three different graphite tubes on two different days (intra-day measurements). Error bars represent standard deviation of 2 days replicate measurements ( $n=4$ ). Au concentration:  $5 \mu g L^{-1}$ .

According to these results, we can conclude that this parameter does not seem adequate to discriminate between Au ions and AuNPs and/or for sizing AuNPs.

#### VII.4.2.2. Evaluation of the atomization delay ( $t_{ad}$ )

The atomization delay ( $t_{ad}$ ) values for the Au forms studied in this section are shown in **Figure VII.4**. As can be seen in this figure and from the absorbance profiles shown in **Figure VII.2**,  $t_{ad}$  increases as the AuNP size increases.



**Figure VII.4.** Atomization delay ( $t_{ad}$ ) for Au (III) solutions and AuNPs suspensions of 5, 40 and 100 nm. **(A)** Employing the same graphite tube on two different days (inter-day measurements). Error bars represent standard deviation of 2 replicates; **(B)** Using three different graphite tubes on two different days (intra-day measurements). Error bars represent standard deviation of 2 days replicate measurements ( $n=4$ ). Au concentration:  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ .

This increase was more pronounced for AuNPs sizes between 5 and 40 nm than for sizes higher than 40 nm. The same behaviour of  $t_{ad}$  values was observed for all measurements carried out in different days and/or using different graphite tubes. These facts prove the dependence of this parameter with the NP size.

The relative standard deviations (RSD, %) of the  $t_{ad}$  values, for intra-day replicate measurements ( $n=2$ ) using the same graphite tube, ranged from 0.2 to 2.0% for AuNPs and from 2.5 to 4.0 % for Au (III). The inter-day reproducibility using the

same graphite tube ranged from 0.9 to 2.5 % for AuNPs and from 2.7 to 5.0 % for Au (III). The variability for inter-day measurements using different graphite tubes was in the range of 3.0 and 4.0% for both Au forms. In all the studies, the lowest precision of  $t_{ad}$  values was obtained for Au (III) solutions. However and despite this, it was possible to discriminate between Au (III) and AuNPs of 5 nm in all the reproducibility conditions. These results indicate that  $t_{ad}$  can be a suitable parameter to discriminate Au forms.

As can be appreciated in **Figure VII.4**, there is not a linear correlation between  $t_{ad}$  and the AuNPs size in all the studied range (5 to 100 nm). However, as was previously reported by Leopold *et al.* [25, 28] a linear correlation between  $t_{ad}$  and the natural logarithms of AuNP size was found. The size calibration curves obtained from measurements carried out in two different days and employing three different graphite tubes are presented in **Table VII.3**.

**Table VII.3.** Correlation equations between AuNPs sizes and atomization delay time ( $t_{ad}$ ). Data from measurements carried out in two different day and employing the same or different graphite tubes (n=2; N=6). Au concentration: 5  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

TUBE	Day 1		Day 2	
	Correlation equation <sup>a</sup>	$r^2$	Correlation equation <sup>a</sup>	$r^2$
1	$y=(0.12\pm 0.01)*\ln(x) + (0.80\pm 0.05)$	0.9865	$y=(0.098\pm 0.005)*\ln(x) + (0.88\pm 0.02)$	0.9976
2	$y=(0.10\pm 0.01)*\ln(x) + (0.89\pm 0.02)$	0.9969	$y=(0.094\pm 0.01)*\ln(x) + (0.89\pm 0.04)$	0.9845
3	$y=(0.10\pm 0.01)*\ln(x) + (0.93\pm 0.02)$	0.9880	$y=(0.088\pm 0.02)*\ln(x) + (0.96\pm 0.07)$	0.9502

<sup>a</sup>  $y = t_{ad}(s)$  and  $x = \text{NP size (nm)}$

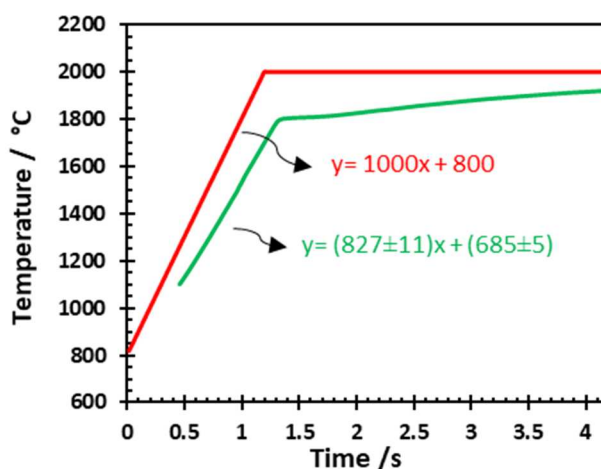
As can be seen in **Table VII.3**, the slopes were very similar and regression coefficients ( $r^2$ ) higher than 0.987 for measurements carried out in the same day using different tubes are obtained. However, for inter-day measurements carried out with the same tube it seems that the slope values show a slightly decreasing trend and worst correlation coefficients in successive measurements. These results suggest that  $t_{ad}$  values can be affected by the condition of the tube and number of measurement cycles

carried out. The variations in the slope values observed in inter-day measurements using the same tube could be related with alterations of the graphite surface and/or a slight deviation in the heating temperature applied by the atomization system during the measurements.

According to the results obtained in this study, we can conclude that  $t_{ad}$  can be an adequate parameter to discriminate AuNPs sizes. However, due to the possible factors that influence the measurement variability, a daily calibration is necessary when NPs size discrimination approach is used to characterize unknown samples.

#### VII.4.2.3. Evaluation of the temperature at the signal maximum ( $T_{max}$ )

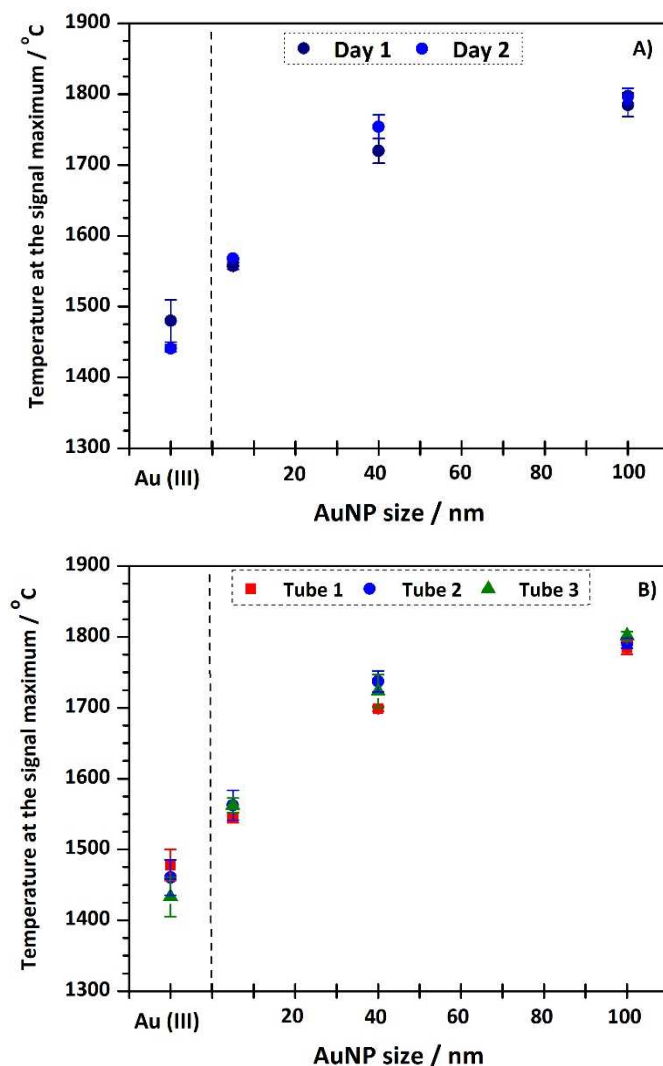
As it was indicated in the experimental section VII.3, the spectrometer used to carry out the different experiments allows recording the actual temperature that occurs in the graphite tube simultaneously to the absorbance signals. Thus, after processing these data it is possible to know the actual temperature curve for each individual absorbance measurements. In **Figure VII.5** it is compared the theoretical atomization temperature curve (according to the settings) with an example of the actual in-tube atomization temperature curve obtained when the GFAAS "cookbook" standard temperature program was applied (**Table VII.1**). As can be seen in **Figure VII.5**, the actual temperature inside the atomization system seems to be about 100 °C lower than the set temperature, and the experimental heating rate is also lower than the theoretical one.



**Figure VII.5.** Theoretical atomization temperature curve (red line) and actual in-tube temperature curve (green line) obtained using the GFAAS "cookbook" temperature program described in Table VII.1.

To evaluate if the variations of the  $t_{ad}$  values in inter-day measurements observed in the previous sections could be related to slight variations in temperatures applied into graphite tubes, the  $T_{max}$  parameter (temperature at the signal maximum) was evaluated from the signal profiles for Au (III) and AuNPs. The  $T_{max}$  values were calculated by interpolating the corresponding  $t_{ad}$  value in the heating rate equation obtained for each measurement. The heating rate equation was obtained from temperature data recorded in the measurement as a time function (see the example in Figure VII.1b).

The  $T_{max}$  values were evaluated for the inter-day measurements carried out employing the same graphite tube and for the intra-day measurements using three different graphite tubes. Figure VII.6 shows the calculated  $T_{max}$  values for each Au form and measurement series. As it was expected, large NPs (100 nm) require higher atomization temperatures than Au ions and the small AuNPs (5-40 nm). Indeed, a quick atomization at  $1457 \pm 23$  °C occurs for Au (III) solutions, while increasing temperatures are required to atomize AuNPs of 5 nm ( $1557 \pm 10$  °C), 40 nm ( $1720 \pm 20$  °C) and 100 nm ( $1792 \pm 9$  °C). These results corroborate the observations reported in previous studies about the higher thermal energies needed to atomize NPs [21]. However, as for  $t_{ad}$  (see Figure VII.3), the  $T_{max}$  values did not linearly increase with the increase in AuNPs size. The behaviour was similar for all the experiments carried out. The RSD values obtained for  $T_{max}$  for intra-day replicate measurements ( $n=2$ ) were below 1.0% for AuNPs (repeatability of  $t_{ad}$  was <2.0%), and below 2.0% for Au (III) (repeatability of  $t_{ad}$  was <4.0%). The reproducibility for inter-day measurements using the same graphite tube ranged from 0.2 to 1.5% for AuNPs, and from 1.5 to 3.0% for Au (III) (inter-day reproducibility of  $t_{ad}$  ranged from 0.9-2.5% to 2.7-5.0% for AuNPs and Au(III), respectively). Using different graphite tubes, the variability of  $T_{max}$  values was in the range of 0.5-1.9% for both Au species (reproducibility of  $t_{ad}$  ranged from 3.0 to 4.0%, in these conditions). As can be seen, better repeatability and reproducibility, with lower RSD values, were obtained for  $T_{max}$  than for  $t_{ad}$ . These results seem to confirm that variations in the temperatures inside the graphite tubes could be related to the slightly higher uncertainties obtained in the  $t_{ad}$  values.



**Figure VII.6.** Temperature at the signal maximum ( $T_{\max}$ ) for Au (III) solutions and AuNPs suspensions of 5, 40 and 100 nm. **(A)** Employing the same graphite tube on two different days (inter-day measurements). Error bars represent standard deviation of 2 replicates; **(B)** Using three different graphite tubes on two different days (intra-day measurements). Error bars represent standard deviation of 2 days replicate measurements ( $n=4$ ). Au concentration:  $5 \mu\text{g L}^{-1}$

In order to evaluate if  $T_{\max}$  could be applied to differentiate NPs of several sizes, the correlation between this parameter and the AuNPs size in the range of 5 to 100 nm was studied. As it was observed for the  $t_{\text{ad}}$  parameter,  $T_{\max}$  values also presented a linear correlation with the natural logarithmic of NP size. According to these results, both parameters  $t_{\text{ad}}$  and  $T_{\max}$  could be used for calibrations purposes to discriminate different AuNPs sizes.

In **Table VII.4** are shown the size calibration curves obtained from measurements carried out in two different days and using three different graphite tubes.

**Table VII.4.** Correlation between AuNPs sizes and atomization temperature at the signal maximum ( $T_{\max}$ ) employing the same graphite tube in two different days (inter-day values), and using three different graphite tubes (intra-day values) ( $n=2$ ;  $N=6$ ). Au concentration:  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ .

TUBE	Day 1		Day 2	
	Correlation equation <sup>a</sup>	$r^2$	Correlation equation <sup>a</sup>	$r^2$
1	$y=(79\pm 6)*\ln(x) + (1410\pm 22)$	0.9937	$y=(79\pm 3)*\ln(x) + (1420\pm 11)$	0.9985
2	$y=(76\pm 2)*\ln(x) + (1436\pm 6)$	0.9995	$y=(79\pm 10)*\ln(x) + (1446\pm 35)$	0.9845
3	$y=(82\pm 6)*\ln(x) + (1426\pm 21)$	0.9945	$y=(77\pm 10)*\ln(x) + (1441\pm 34)$	0.9840

<sup>a</sup> $y= T_{\max}$  (°C) and  $x= \text{NP size (nm)}$

As can be seen in **Table VII.4**, the slopes and interceptions of the logarithmic correlation equations for inter-day measurements using the same graphite tube and employing different tubes (intra-day measurements) are very similar. Moreover, regression coefficients ( $r^2$ ) higher than 0.9840 were achieved in all the studies. Based on these results, it can be concluded that the small variations produced in the in-tube temperatures seem to affect the position of the absorbance peak, and therefore  $t_{\text{ad}}$  values. These variations in the in-tube temperatures could be compensated employing  $T_{\max}$  as the size evaluation parameter. Thus, it seems that by using  $T_{\max}$  instead of  $t_{\text{ad}}$  more reproducible calibration slopes for AuNPs sizing can be achieved, even for inter-day measurements. Using  $T_{\max}$  as evaluation parameter the number of calibration and recalibration procedures can be reduced and consequently, the time and cost of the analysis.



### VII.4.3. Evaluation of the temperature program conditions

To develop a GFAAS method to discriminate Au forms, the optimal temperature program for heating the graphite furnace should provide the highest difference between the signal-parameters of Au (III) and AuNPs. The pyrolysis temperature, the atomization temperature, and the atomization heating rate are considered the experimental conditions that have the most influence on  $t_{ad}$  values [22-27].

In this section, different temperature programs were evaluated to select the most appropriate program for the discrimination of Au (III) and AuNPs. In all these programs, the application of a constant temperature in the pyrolysis and atomization steps is avoided. They consist in the application of a continuous temperature ramp from a very low value, near to the drying temperature, to a final temperature high enough to atomize all the particles. Different temperature programs with variable heating rates from 50 to 1000 °C s<sup>-1</sup> were evaluated. All the tested programs include three drying steps and a final cleaning step. In addition, one pyrolysis step with a very low temperature (200 °C) was employed. In the atomization step, a final atomization temperature of 2500 °C was applied. To increase the temperature from 200°C to 2500 °C, heating rates of 50, 100, 200, 350, 500, 750 and 1000 °C s<sup>-1</sup> were assayed. Thus, different measurement times (46, 23, 11.5, 6.6, 4.6, 3.1 and 2.3 s, respectively) were required to register the entire atomization step for the different heating rate programs. The temperature programs evaluated in this section are shown in **Table VII.2** (Section VII.3.2, page 172).

In order to select the optimal temperature program  $t_{ad}$  and  $T_{max}$  values were calculated from the absorbance signals obtained for AuNPs suspensions of 5, 40, and 100 nm, and Au (III) solutions of 5 µg L<sup>-1</sup> using the different assayed temperature programs. To compare the results obtained using the different heating rates the  $t_{ad}$  values were adjusted to a common scale by dividing the  $t_{ad}$  value by the corresponding total measurement time. From these normalized  $t_{ad}$  and the calculated  $T_{max}$  values, the logarithmic correlations with the AuNPs size were obtained for the different atomization heating rates. The correlation equations are shown in **Table VII.5**. For comparison, the equations obtained for the standard temperature program are also included in this table.

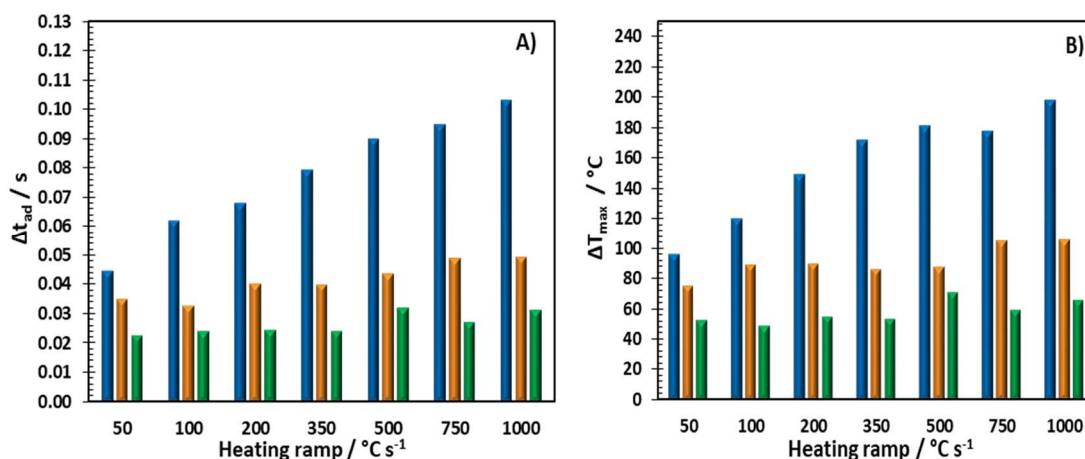
**Table VII.5.** Logarithmic correlations between AuNP sizes and normalized atomization delay ( $t_{ad}$ ) or atomization temperature at the signal maximum ( $T_{max}$ ) for different atomization heating rates ( $n=2$ ;  $N=6$ ). Au concentration:  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Heating rate ( $^{\circ}\text{C s}^{-1}$ )	Normalized $t_{ad}$		$T_{max}$	
	Correlation equation <sup>a</sup>	$r^2$	Correlation equation <sup>b</sup>	$r^2$
50	$y=(0.019\pm 0.002)*\ln(x) + (0.481\pm 0.006)$	0.9906	$y=(56\pm 7)*\ln(x) + (1153\pm 20)$	0.9856
100	$y=(0.018\pm 0.003)*\ln(x) + (0.520\pm 0.009)$	0.9819	$y=(55\pm 4)*\ln(x) + (1214\pm 9)$	0.9969
200	$y=(0.021\pm 0.002)*\ln(x) + (0.589\pm 0.006)$	0.9936	$y=(57\pm 5)*\ln(x) + (1303\pm 14)$	0.9932
350	$y=(0.021\pm 0.002)*\ln(x) + (0.648\pm 0.006)$	0.9939	$y=(55\pm 5)*\ln(x) + (1409\pm 14)$	0.9929
500	$y=(0.024\pm 0.003)*\ln(x) + (0.703\pm 0.011)$	0.9828	$y=(62\pm 6)*\ln(x) + (1486\pm 17)$	0.9919
750	$y=(0.025\pm 0.002)*\ln(x) + (0.741\pm 0.005)$	0.9968	$y=(65\pm 4)*\ln(x) + (1605\pm 12)$	0.9964
1000	$y=(0.026\pm 0.002)*\ln(x) + (0.848\pm 0.009)$	0.9914	$y=(67\pm 6)*\ln(x) + (1752\pm 17)$	0.9925
COOKBOOK	$y=(0.017\pm 0.003)*\ln(x) + (0.223\pm 0.011)$	0.9654	$y=(73\pm 8)*\ln(x) + (1496\pm 23)$	0.9884

<sup>a</sup> $y$ = Normalized  $t_{ad}$  and  $x$ = NP size (nm); <sup>b</sup> $y$ =  $T_{max}$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) and  $x$ = NP size (nm)

As can be seen in **Table VII.5**, the slopes for both parameters slightly increase as the atomization heating rate increases. However, the difference between these slopes are statistically not significant (Student's t-test for a 95% confidence level). In contrast, a sharp increase in the interceptions of these equations was observed with the increase the atomization heating rates. This fact could indicate that changes in the atomization heating rates can significantly affect the energy provided to atomize AuNPs. This observation will be discussed in the next section.

The influence of atomization heating rate on the normalized  $\Delta t_{ad}$  and/or  $\Delta T_{max}$  was also evaluated. In **Figure VII.7** are shown the calculated  $\Delta t_{ad}$  and  $\Delta T_{max}$  values between Au (III) and AuNPs of 5 nm; AuNPs of 5 and 40 nm; and AuNPs of 40 and 100 nm, employing the different temperature programs.

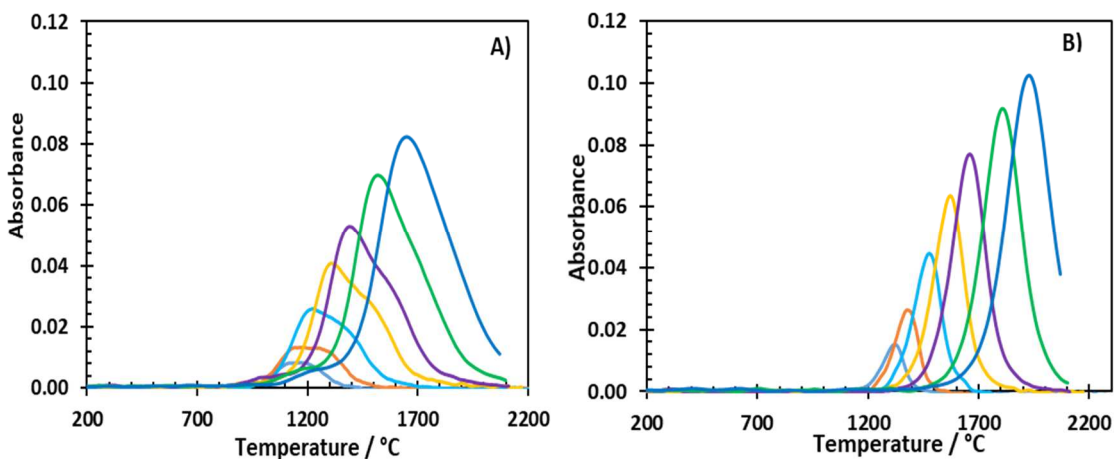


**Figure VII.7.** Comparison of the normalized  $\Delta t_{ad}$  (A) and  $\Delta T_{max}$  (B) between Au (III) and AuNPs of 5 nm (blue), AuNPs of 5 and 40 nm (orange), and between AuNPs of 40 and 100 nm AuNP (green) employing atomization heating rates of 50 °C s<sup>-1</sup>, 100 °C s<sup>-1</sup>, 200 °C s<sup>-1</sup>, 350 °C s<sup>-1</sup>, 500 °C s<sup>-1</sup>, 750 °C s<sup>-1</sup> and 1000 °C s<sup>-1</sup>. Au concentration: 5  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

As can be observed in **Figure VII.7**, the normalized  $\Delta t_{ad}$  values and  $\Delta T_{max}$  values for Au (III) and 5 nm AuNPs increase as the atomization heating rate increases. On the contrary and as it was expected, the normalized  $\Delta t_{ad}$  and  $\Delta T_{max}$  between the different AuNPs were not significantly affected by changes of the atomization heating rates. From these results, it can be concluded that all the evaluated temperature programs provided the same sensitivity to carry out the discrimination of AuNPs with different sizes. However, it seems that the best separation between Au ions and AuNPs could be achieved using fast atomization ramps.

#### VII.4.4. Study of the atomization mechanism of Au (III) and AuNPs

To study the influence of the atomization heating rates on the mechanism of atoms desorption for the different Au forms, the temperature-resolved absorbance signal profiles of AuNPs suspensions of 5, 40, and 100 nm, and Au (III) solutions with the same Au concentration (5  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) were plotted. The temperature-resolved absorbance signals were obtained from the absorbance-time profile and the actual atomization temperature calculated by interpolating the time in the corresponding heating rate equation registered with the in-tube temperature sensor. In **Figure VII.8** are presented the absorbance-temperature profiles for Au (III) and AuNPs of 40 nm employing the evaluated heating rates.



**Figure VII.8.** Absorbance-temperature signal profiles for atomization heating rate of  $50\text{ °C s}^{-1}$  (—),  $100\text{ °C s}^{-1}$  (—),  $200\text{ °C s}^{-1}$  (—),  $350\text{ °C s}^{-1}$  (—),  $500\text{ °C s}^{-1}$  (—),  $750\text{ °C s}^{-1}$  (—) and  $1000\text{ °C s}^{-1}$  (—). (A) Au (III) solutions; (B) AuNP suspensions of 40 nm. Au concentration:  $5\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ .

As can be seen in **Figure VII.8**, the peak heights decrease when the heating rates applied diminish. However, the integrated absorbance values obtained from the absorbance-time peaks are very similar (relative standard deviation about 15 %) for all the assayed heating rates except for the atomization heating rate of  $1000\text{ °C s}^{-1}$  for which the absorbance peaks were not completely registered. These results indicate that there was no loss of Au or incomplete atomization of Au using the different temperature programs. In addition, as it was observed in the previous section, the absorbance signals registered for the same Au forms shift towards higher  $T_{\text{max}}$  values as heating rate increased. This fact indicates that the energies required for the formation of atoms from these species and/or a kinetic factor that is involved in the atomization process is affected by the atomization conditions.

It can also be appreciated in **Figure VII.8B** that the absorbance signals for AuNPs of 40 nm show symmetrical monomodal peak profiles, and the peak shapes were the same for all the evaluated atomization heating rates. Similar shapes were also observed for AuNPs of 5 and 100 nm. However, the absorbance peaks for Au (III) show less symmetrical profiles and the signals present small shoulders (**Figure VII.8A**). Moreover, the absorbance profiles of Au (III) were different under different atomization heating rates.

The shape of the absorbance peak largely depends on the type of interactions and the distribution of the metal on the graphite surface. Therefore, the interpretation of the characteristics of these signals can provide information on the atoms desorption mechanisms in GFAAS [28, 29]. The different shapes observed for the absorbance signals of Au (III) and AuNPs suggest that there are differences in the vaporization and atomization processes of these species. Several studies in the literature deal with Au vaporization and atomization mechanisms in GFAAS [29-31]. These studies demonstrated that Au has a very weak interaction with graphite, so after the evaporation of the solvent this metal tends to form small aggregates or microdroplets on the graphite surface from which Au is vaporized and atomized. The shape, size and number of aggregates depend on the measurement conditions. For example, for low Au concentrations and long pyrolysis steps, the aggregates are expected to be smaller and more dispersed than when high masses of Au are introduced in the atomization system [30]. Under those experimental conditions, Au atomization is commonly produced from dispersed atoms on the graphite surface. Moreover, it has been also pointed out that these metal aggregates or droplets can move on the graphite surface at temperatures close to 300 °C. In this way, the number, shape, and size of the aggregates of Au can change depending on the temperature program employed for the measurements. Indeed, Brandt and Leopold [28] observed that when the tube temperature was quickly increased from 150 °C (drying step) to 2000 °C (atomization step), the migration of Au atoms, and thus the formation of aggregates, was considerably reduced and the atomization mainly took place from dispersed atoms.

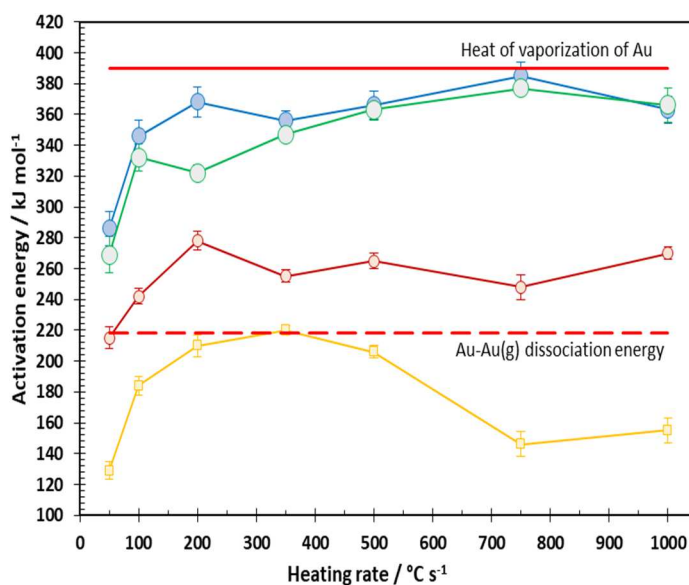
Taking into account that the size of the Au aggregates after the pyrolysis step should be the same for all the temperature programs evaluated, the differences observed in the Au (III) absorbance peaks for the different programs (**see Figure VII.8a**) suggest that variations on the heating rate could have an effect on the mobility of Au and thus on the size and number aggregates formed on the graphite surface. Moreover, the deformations of the absorbance profiles observed seem to indicate that Au agglomerates of more than one size could be formed on the graphite tube and/or more than one vaporization mechanism could be involved at the same time in the atomization process of Au, i.e. from dispersed particles and small aggregates. However, the peak

shapes of AuNPs did not change when different atomization heating rates were employed (see **Figure VII.8b**). This fact could indicate that when the sample introduced into the graphite tube is formed by a colloidal suspension of particles with a defined size, the initial size of these nanoclusters remains unchanged after the evaporation of the solvent, and until the whole nanoparticle is vaporized. These results are typically observed for a first-release vaporization process.

Different particle shapes and sizes will lead to different release mechanisms for Au (III) and AuNPs. In order to obtain additional information to investigate the atomization mechanism of Au (III) and AuNPs, the activation energies ( $E_a$ ) for the different heating rate programs were calculated. Different methods to calculate  $E_a$  from the absorbance signal profiles can be found in the literature [32]. In the present study, the  $E_a$  values have been calculated using the method proposed by Smets [33]. Thus, for each heating rate program the natural logarithm of the absorbance values registered from the appearance temperature ( $T_{AP}$ ) to the temperature at signal maximum ( $T_{max}$ ) were plotted versus the inverse of the actual in-tube temperature obtained for each point. Following the **Equation VII. 1**, where  $A_T$  is the absorbance,  $E_a$  the activation energy,  $R$  the universal gas constant, and  $T$  the temperature, the  $E_a$  was obtained from the slope of this plot.

$$\ln A_T = -\frac{E_a}{RT} + \text{Constant} \quad (\text{Equation VII.1})$$

In **Figure VII.9** are represented the  $E_a$  values calculated for Au (III) and AuNPs employing the different temperature programs. In general, higher  $E_a$  values were obtained for AuNPs of 40 and 100 nm than for the AuNP of 5 nm. Moreover, these energies were also higher than those observed for Au (III). However, no significant differences were found for the  $E_a$  values of AuNPs of 40 and 100 nm.



**Figure VII.9.** Activation energies ( $E_a$ ) (mean  $\pm$  standard deviation,  $n=2$ ) calculated for Au (III) (yellow line), and AuNPs suspensions of 5 nm (red wine line), 40 nm (blue line), and 100 nm (green line) employing the temperature program showed in Table VI.2 and variable atomization heating rates of 50  $^{\circ}\text{C s}^{-1}$ , 100  $^{\circ}\text{C s}^{-1}$ , 200  $^{\circ}\text{C s}^{-1}$ , 350  $^{\circ}\text{C s}^{-1}$ , 500  $^{\circ}\text{C s}^{-1}$ , 750  $^{\circ}\text{C s}^{-1}$  and 1000  $^{\circ}\text{C s}^{-1}$ . Au concentration: 5  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

As previously indicated, Au exhibits weak interactions with graphite and therefore Au-Au interactions are usually more important in the released vaporization mechanism of Au. In these cases, the  $E_a$  values can be correlated to the heat of vaporization of Au ( $\Delta H_{1250\text{K}} = 390 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) and the bond dissociation energy of Au-Au<sub>(g)</sub> ( $218 \pm 6 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) [34]. As can be seen in **Figure VII.9**, the  $E_a$  values obtained for the different AuNPs sizes range within to these energies, while the  $E_a$  values for Au (III) are below Au-Au<sub>(g)</sub> dissociation energy. In this case, the low  $E_a$  values found for Au (III) seem to indicate that Au atoms were produced by the desorption of small and dispersed particles on the graphite surface. On the other hand, the  $E_a$  values obtained for AuNPs in these experiments were similar to those observed by others authors when high masses of Au (III) solutions were atomized [29-31]. This fact could indicate that the atomization behaviour of large AuNPs could be similar to that observed for big Au agglomerations. However, these  $E_a$  values differ from those obtained by Panyabut *et al.* [27]. In that study, the authors reported lower  $E_a$  values for the same type of AuNPs than the calculated in the present section. Moreover, they obtained a linear correlation for  $E_a$  and the size of the NPs. However, these authors applied a different approximation for the calculation of  $E_a$  and a standard type of temperature program in their studies. Under

that temperature conditions they also obtained a linear correlation between  $t_{ad}$  and the NP size, unlike the relationships found in the present work (see section VII.4.2).

It can also be appreciated in **Figure VII.9** that in general the calculated  $E_a$  values for the different AuNPs slightly increase as the atomization heating rates is increased from 50 to 150  $^{\circ}\text{C} \text{ s}^{-1}$ , while these values do not significantly change for atomization heating rates among 200 and 1000  $^{\circ}\text{C} \text{ s}^{-1}$ . The calculated  $E_a$  values for Au (III) also increased as the atomization heating rate were increased from 50 to 150  $^{\circ}\text{C} \text{ s}^{-1}$ , remaining stable between 150 and 350  $^{\circ}\text{C} \text{ s}^{-1}$ . However, these values dropped for heating rates between 500 and 750  $^{\circ}\text{C} \text{ s}^{-1}$  and were practically constant for higher heating rates. These results seem to indicate that the size of the NP after the evaporation of the solvent is not significantly altered using temperature programs with different heating rates, remaining their sizes practically unaltered until the whole particle has enough energy to be vaporized and atomized. However, the differences in the  $E_a$  values observed for Au (III) employing the different heating rate programs seems to confirm the high effect of the temperature program on the mobility of Au aggregates. The high variability of  $E_a$  values observed for Au (III) employing the different heating rate programs are in good agreement with the observations made by other authors about the dependency of Au (III) energies with the atomization conditions [29-31]. The differences in the  $E_a$  for the different heating rate programs could be explained by changes in the size of these particles in the atomization step. Indeed, if the size of these particles increases, the gold-graphite interactions become weaker, increasing also the  $E_a$  values.

At the concentration and under the conditions employed in these studies, Au (III) and AuNPs seem to present a first-order release/vaporization process. However, further investigations, such as studies employing different amounts of Au using the different atomization programs employed in this work are required to establish a clearer conclusion about the vaporization and atomization mechanism of AuNPs.



## VII.5. CONCLUSIONS

From the studies carried out in this chapters, it is can be concluded that:

- Both  $t_{ad}$  and  $T_{max}$  could be employed to discriminate AuNPs size. However, the variations observed in the  $t_{ad}$  values due to the slightly changes on the in-tube temperatures can be compensated using  $T_{max}$ , therefore better results were obtained using this parameter to differentiate between AuNPs sizes.
- The best separation between Au (III) and AuNP of 5 nm was achieved using a heating rate of  $1000\text{ }^{\circ}\text{C s}^{-1}$ . However, the same separation among AuNPs of different sizes was found for all the evaluated heating rate programs.
- Different shapes and  $E_a$  were obtained for Au (III) and AuNPs. It was observed that the shape of the absorbance profiles and the  $E_a$  values of Au ions are affected by the temperature program conditions, since these conditions could produce changes in the distribution of Au aggregates on the graphite surface. However, the conditions of the atomization temperature program do not significantly influence on the shape and  $E_a$  values of AuNPs. This fact indicates that the vaporization of these particles probably takes place from dispersed Au nanoclusters of a defined size.

## VII.6. REFERENCES

- [1] T. L. Doane, C. Burda, *The unique role of nanoparticles in nanomedicine: imaging, drug delivery and therapy*, Chem. Soc. Rev., 2012, 41, 2885-2911.
- [2] R. R. Arvizo, S. Bhattacharyya, R. A. Kudgus, K. Giri, R. Bhattacharya, P. Mukherjee, *Intrinsic therapeutic applications of noble metal nanoparticles: past, present and future* Chem. Soc. Rev. 41 (2012) 2943-2970.
- [3] M. E. Vance, T. Kuiken, E. P. Vejerano, S. P. McGinnis, M. F. Hochella, D. Rejeski, M. S. Hull, *Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory*, Beilstein J.Nanotechnol. 6 (2015) 1769-1780.
- [4] E.C. Dreaden, A.M. Alkilany, X. Huang, C.J. Murphy, M.A. El-Sayed, *The golden age: gold nanoparticles for biomedicine*, Chem. Soc. Rev. 41 (2012) 2740-2779.
- [5] M.-C. Daniel, D. Astruc, *Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology*, Chem. Rev. 104 (2004) 293-346.
- [6] Y. Ju-Nam, J.R. Lead, *Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications* Sci. Total Environ. 400 (2008) 396-414.
- [7] A. Nel, *Toxic potential of materials at the nanolevel*, Science 311 (2006) 622-627.
- [8] I. Pujalté, I. Passagne, B. Brouillaud, M. Tréguer, E. Durand, C. Ohayon-Courtès, B. L'Azou, *Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells*, Part. Fibre Toxicol. 8 (2011) 1-16.
- [9] L. Yu, A. Andriola, *Quantitative gold nanoparticle analysis methods: A review*, Talanta 82 (2010) 869-875.
- [10] W. Haiss, N. T. K. Thanh, J. Aveyard, D. G. Fernig, *Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra* Anal. Chem. 79 (2007) 4215-4221.

- [11] T. Teranishi, M. Miyake, *Size Control of Palladium Nanoparticles and Their Crystal Structures*, Chem. Mater. 10 (1998) 594-600.
- [12] T. K. Mudalige, H. Qu, G. Sánchez-Pomales, P. N. Sisco, S. W. Linder, *Simple Functionalization Strategies for Enhancing Nanoparticle Separation and Recovery with Asymmetric Flow Field Flow Fractionation* Anal. Chem. 85 (2015) 1764-1772.
- [13] B. Franze, C. Engelhard, *Fast Separation, Characterization, and Speciation of Gold and Silver Nanoparticles and Their Ionic Counterparts with Micellar Electrokinetic Chromatography Coupled to ICP-MS*, Anal. Chem. 86 (2014) 5713-5720.
- [14] D. J. Lewis, *Hydrodynamic chromatography – inductively coupled plasma mass spectrometry, with post-column injection capability for simultaneous determination of nanoparticle size, mass concentration and particle number concentration (HDC-PCi-ICP-MS)*, Analyst 140 (2015) 1624-1628.
- [15] D.M. Mitrano, A. Barber, A. Bednar, P. Westerhoff, Ch.P. Higgins and J.F. Ranville, *Silver nanoparticle characterization using single particle ICP-MS (SP-ICP-MS) and asymmetrical flow field flow fractionation ICP-MS (AF4-ICP-MS)* J. Anal. At. Spectrom. 27 (2012) 1131-1142.
- [16] A. R. M. Bustos, M. R. Winchester, *Single-particle-ICP-MS advances*, Anal. Bioanal. Chem. 408 (2016) 5051-5052.
- [17] A.R. Donovan, C.D. Adams, Y. Ma, C. Stephan, T. Eichholz, H. Shi, *Single particle ICP-MS characterization of titanium dioxide, silver, and gold nanoparticles during drinking water treatment*, Chemosphere 144 (2016) 148-153.
- [18] J. Liu, K.E. Murphy, R.I. MacCuspie, M.R. Winchester, *Capabilities of single particle inductively coupled plasma mass spectrometry for the size measurement of nanoparticles: a case study on gold nanoparticles*, Anal. Chem. 86 (2014) 3405-3414.
- [19] S. Lee, X. Bi, R. B. Reed, J. F. Ranville, P. Herckes, P. Westerhoff, *Nanoparticle Size Detection Limits by Single Particle ICP-MS for 40 Elements*, Environ. Sci. Technol. 48 (2014) 10291-10300.

- [20] S. Weigel, R. Peters, K. Loeschner, R. Grombe, T. P. J. Linsinger, *Results of an interlaboratory method performance study for the size determination and quantification of silver nanoparticles in chicken meat by single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry (sp-ICP-MS)*, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 4839-4848.
- [21] F. Gagné, P. Turcotte, C. Gagnon, *Screening test of silver nanoparticles in biological samples by graphite furnace-atomic absorption spectrometry*, *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (2012) 2067-2072.
- [22] N. S. Feichtmeier, K. Leopold, *Detection of silver nanoparticles in parsley by solid sampling high-resolution–continuum source atomic absorption spectrometry*, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 3887-3894.
- [23] N. S. Feichtmeier, N. Ruchter, S. Zimmermann, B. Sures, K. Leopold, *A direct solid-sampling analysis method for the detection of silver nanoparticles in biological matrices*, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 295-305.
- [24] M. Resano, E. Garcia-Ruiz, R. Garde, *High-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for the monitoring of Au nanoparticles*, *J. Anal. At. Spectrom.* 31 (2016) 2233-2241.
- [25] K. Leopold, A. Brandt, H. Tarren, *Sizing gold nanoparticles using graphite furnace atomic absorption spectrometry*, *J. Anal. At. Spectrom.* 32 (2017) 723-730.
- [26] J. Gruszka, E. Zambrzycka-Szelewa, J. S. Kulpa, B. Godlewska-Zytkiewicz, *Discrimination between ionic silver and silver nanoparticles in consumer products using graphite furnace atomic absorption spectrometry*, *J. Anal. At. Spectrom.* 33 (2018) 2133-2142.
- [27] T. Panyabut, N. Sirirat, A. Siripinyanond, *Use of electrothermal atomic absorption spectrometry for size profiling of gold and silver nanoparticles*, *Anal. Chim. Acta* 1000 (2018) 75-84.

- [28] A. Brandt, K. Leopold, *Investigation of the atomization mechanism of gold nanoparticles in graphite furnace atomic absorption spectrometry*, Spectrochim. Acta Part B 150 (2018) 26-32.
- [29] J. McNally, J.A. Holcombe, *Existence of microdroplets and dispersed atoms on the graphite surface in electrothermal atomizers*, Anal. Chem. 59 (1987) 1105-1112.
- [30] R. W. Fonseca, J. McNally, J. A. Holcombe, *Mechanisms of vaporization for silver and gold using electrothermal atomization*, Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc. 48 (1993) 79-89.
- [31] S. Lynch, R. E. Sturgeont, V. T. Luong, *Comparison of the energetics of desorption of solution and vapour phase deposited analytes in graphite furnace atomic absorption spectrometry*, J. Anal. At. Spectrom. 5 (1990) 311-319.
- [32] W. Frech, N. G. Zhou, E. Lundberg, *A critical study of some methods used to investigate atom formation processes in GFAAS*, Spectrochim. Acta Part B 37 (1982) 691-702.
- [33] B. Smets, *Atom formation and dissipation in electrothermal atomization*, Spectrochim. Acta Part B 35 (1980) 33-42.
- [34] W. M. Haynes (Ed.), *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 96th Edition (internet version 2016), CRC Press/Taylor and Francis, Boca Raton, FL.



## **CAPÍTULO VIII / CHAPTER VIII:**

Conclusiones generales / General conclusions





## CONCLUSIONES GENERALES

A lo largo de esta Tesis, se han desarrollado nuevas metodologías analíticas para la determinación de metales y metaloides, así como para el estudio y caracterización de nanopartículas metálicas utilizando algunas de las prestaciones que ofrecen los instrumentos de AAS de última generación.

Las **capacidades de la instrumentación HR-CS AAS para la determinación de metales y metaloides en muestras ambientales, clínicas y alimentarias** se exploran en los *Capítulos IV, V y VI*. De los resultados y conclusiones obtenidos en estos capítulos se pueden extraer las siguientes conclusiones generales:

- Se ha logrado llevar a cabo la determinación secuencial rápida mediante **HR-CS FAAS** de elementos mayoritarios y minoritarios en la misma alícuota de muestra sin necesidad de emplear diluciones diferentes o adicionales. Para ello, se han empleado dos de las prestaciones de esta nueva instrumentación:
  - La posibilidad de seleccionar líneas de absorción principales y/o secundarias para cada elemento con el fin de ajustar la sensibilidad de la medida al contenido de analito esperado en los diferentes tipos de muestras.
  - La posibilidad de cuantificar las señales de absorbancia eligiendo los píxeles más convenientes (ya sean los píxeles centrales o sólo los píxeles laterales de la línea) del detector en función de la sensibilidad deseada.
- El uso del modo discontinuo de introducción de muestra en **HR-CS FAAS** ha permitido:
  - La introducción de pequeños volúmenes en el sistema de atomización sin un deterioro significativo de los parámetros analíticos del método (sensibilidad, LOD, LOQ, y precisión) en comparación con el modo convencional de introducción continua de muestra.
  - Reducir significativamente el consumo de muestra, lo que supone una gran ventaja cuando se debe determinar un número elevado de elementos en la misma alícuota de muestra.

- Como ventaja adicional, se han reducido algunos efectos indeseables como la frecuente obstrucción de la llama y/o del sistema de nebulización debido a la introducción de grandes cantidades de componentes de la muestra como azúcar, aceite y sales.
- Se han desarrollado metodologías sencillas y rápidas empleando **HR-CS FAAS** para la determinación de elementos en muestras de diversa complejidad (bebidas, suplementos dietéticos y emulsiones agua-aceite-agua) con importantes ventajas en el procedimiento:
  - Tratamiento mínimo de muestra ( una simple dilución).
  - Cuantificación de los analitos mediante calibración con patrón externo empleando patrones acuosos.
- Se ha desarrollado un método para la determinación directa de elementos mayoritarios (Ca) en muestras de baja disponibilidad (suspensiones de mitocondrias) mediante **HR-CS GFAAS**:
  - La posibilidad de visualizar un estrecho entorno espectral alrededor de la línea de análisis ha permitido seleccionar una línea de absorción situada en una región espectral libre de interferencias.
  - Debido a la alta concentración de Ca en las muestras, se ha empleado una línea secundaria y los pixeles laterales de la línea de absorción para la cuantificación, disminuyendo así la sensibilidad y ampliando el intervalo lineal de trabajo

El potencial de la **GFAAS** para discriminar entre iones metálicos y nanopartículas (NPs) utilizando un prototipo de espectrofotómetro que permite controlar y registrar la temperatura exacta en la etapa de atomización se ha abordado en el *Capítulo VII*:

- Gracias a la capacidad de registrar simultáneamente las señales de absorbancia y las temperaturas reales en el tubo de grafito, fue posible introducir un nuevo parámetro ( $T_{max}$ ) para discriminar entre distintos tamaños de AuNPs.

- Diferentes parámetros derivados de los perfiles de las señales de absorbancia ( $t_{ad}$  o  $T_{max}$ ) se pueden emplear para discriminar entre Au (III) y AuNPs de diferentes tamaños.
- Gracias al control exacto de la temperatura se han podido calcular las energías de activación para Au (III) y AuNPs, y obtener información sobre el mecanismo de atomización de estas especies.
- La mejor comprensión del comportamiento de las NPs en GFAAS podría ayudar a mejorar las capacidades de esta técnica para determinar el contenido y el tamaño de las NPs



## GENERAL CONCLUSIONS

Along this thesis, some of the novel features of last generation AAS instruments have been employed to develop new analytical methodologies to determine metal and metalloid, as well as for the study and characterization of metallic nanoparticles.

The **capabilities of HR-CS AAS instruments for the determination of metals and metalloids in environmental, clinical and food samples** have been extensively explored in *Chapters IV, V, and VI*. From the results and conclusions obtained in these chapters, it is possible to extract the following general conclusions:

- Rapid sequential **HR-CS FAAS** determination of major and minor elements in the same aliquot of sample, without the need of employing different or additional dilutions has been achieved by exploiting two possibilities of this instrumentation:
  - Adequate selection of main and/or secondary lines for each element to adjust the sensitivity to that required to analyse different type of samples.
  - Quantification of the signals choosing the most convenient pixel (either the central pixels or only the side pixels of the absorption lines) of the detector.
- The use of the discontinuous sampling mode in **HR-CS FAAS** has made possible:
  - The introduction of small volumes in the flame atomization system without a significant deterioration of the figures of merit (sensitivity, LOD, LOQ, and precision) compared to those obtained using a conventional continuous sample introduction mode.
  - A significant reduction of sample consumption, which is a great advantage when a high number of elements must be determined in the same aliquot of sample.
  - As an additional benefit, undesirable effects such the regular obstruction of the flame and/or the nebulization system due to the introduction of high amounts of sample components such as sugar, oil and salts are minimized.

- Simple and fast **HR-CS FAAS** methodologies to determinate elements in complex matrices (beverages, dietary supplements, water-in-oil-in water emulsions) have been developed with important procedural advantages:
  - Minimum sample treatment (a simple dilution).
  - Quantification of the analytes by external calibration procedure with aqueous standards.
- Direct analysis of major elements (Ca) in low availability samples (mitochondrial suspensions) has been performed by a micro-sampling **HR-CS GFAAS** method:
  - The simultaneous monitoring of a narrow spectral region around the analytical line made possible the selection of an absorption line located at a spectral region free of interferences
  - Due to the high concentration of Ca in the samples, an instrumental strategy to decrease the sensitivity and expand the linear working range was accomplished using a secondary absorption line and the side pixel registration approach.

The potential of **GFAAS** to discriminate between metal ions and metal nanoparticles (NPs) has been explored in *Chapter VII*, using a **prototype instrument** that allows the exact control of the temperature in the measurement process:

- Due to the capability for simultaneously recording the absorbance signals and the actual temperatures in the graphite tube, it was possible to introduce a new signal parameter ( $T_{max}$ ) to discriminate the size of AuNPs.
- Different parameters derived from the signal absorbance profiles ( $t_{ad}$  or  $T_{max}$ ) can be employed for discrimination of Au (III) and AuNPs of different sizes.
- The exact control of temperature permits to calculate the activation energy of Au (III) and AuNPs and get information about their atomization mechanism.
- The Best understanding of the NPs behaviour in GFAAS could improve the capabilities of this technique to determine NPs contents and sizes

**ANEXO / ANNEX:**  
Publicaciones / Publications





The results presented in this Thesis memory have so far led to the publication of the following articles:

- **ARTICLE 1:** *Fast sequential multi-element determination of major and minor elements in environmental samples and drinking waters by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry.*

**B. Gómez-Nieto**, M<sup>a</sup> Jesús Gismera, M<sup>a</sup> T. Sevilla, J. R. Procopio.

Analytica Chimica Acta 854 (2015) 13-19

Journal impact factor: 4.71

Subject categories (Journal ranking): Chemistry, Analytical (8/75, Q1)

- **ARTICLE 2:** *Determination of essential elements in beverages, herbal infusions and dietary supplements using a new straightforward sequential approach based on flame atomic absorption spectrometry.*

**B. Gómez-Nieto**, M<sup>a</sup> Jesús Gismera, M<sup>a</sup> T. Sevilla, J. R. Procopio

Food Chemistry 219 (2017) 69-75

Journal impact factor: 4.052

Subject categories (Journal ranking): Chemistry, Applied (7/42, Q1)

- **ARTICLE 3:** *Straightforward silicon determination in water-in-oil-in-water emulsions used for silicon supplementations in food by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry.*

**B. Gómez-Nieto**, M<sup>a</sup> Jesús Gismera, M<sup>a</sup> T. Sevilla, S. Cofrades, M. Freire, J. R. Procopio

Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy 148 (2018) 44-50

Journal impact factor: 3.241

Subject categories (Journal ranking): Spectroscopy (7/42, Q1)

- **ARTICLE 4:** *Micro-sampling method based on high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for calcium determination in blood and mitochondrial suspensions.*

**B. Gómez-Nieto**, M<sup>a</sup> Jesús Gismera, M<sup>a</sup> T. Sevilla, J. Satútegui, J. R. Procopio

Talanta 170 (2017) 15-21

Journal impact factor: 4.035

Subject categories (Journal ranking): Chemistry, Analytical (9/72, Q1)





