

Facultade de Ciencias

Grao en Química

Memoria do Traballo de Fin de Grao

Metodoloxía analítica para a determinación de plomo en mostrás ambientais

Metodoloxía analítica para a determinación de chumbo en mostrás ambientais

Analytical methodology for the determination of lead in environmental samples



Ana Isabel Rodríguez Cendal

Curso: 2019 - 2020.

Convocatoria: setembro

Directoras: Rosa María Soto Ferreiro

Alatzne Carlosena Zubieta

Acrónimos y abreviaturas

- AAS: Atomic Absorption Spectrometry
- AECOSAN: Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición
- COVID-19: Coronavirus Disease 2019
- CRM: Certified Reference Material
- CV: Coeficiente de Variación
- DE: Desviación Estándar
- DER: Desviación Estándar Relativa
- ECHA: European Chemicals Agency
- EFSA: European Food Safety Authority
- EMMA: Energy-dispersive Miniprobe Multielement Analyzer
- ETAAS: Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry
- FAAS: Flame Atomic Absorption Spectrometry
- FI-ETAAS: Flow Injection - Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry
- FRM: Federal Reference Method
- HG-AAS: Hydride Generation - Atomic Absorption Spectrometry
- HG-GFAAS: Hydride Generation - Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry
- ICP-AES: Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry
- ICP-MS: Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry
- ICP-QMS: Inductively Coupled Plasma - Quadrupole-based Mass Spectrometry
- LOD: Limit of Detection
- LOQ: Limit of Quantitation
- MAD: Microwave Assisted Digestion
- NAAQS: National Ambient Air Quality Standards
- QANAP: Química Analítica Aplicada
- RAC: Risk Assessment Committee
- SDS: Sodium Dodecyl Sulfate
- SEAC: Socioeconomic Assessment Committee
- TFG: Trabajo de Fin de Grado
- UDC: Universidade da Coruña
- UE: Unión Europea
- USEPA: United States Environmental Protection Agency
- US-ETAAS: Ultrasonic Stirring - Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry

- USS: Ultrasonic Slurry Sampling
- XRF: X-Ray Fluorescence

ÍNDICE

Resumen	1
1. Introducción	5
1.1. Metales en el medioambiente.....	5
1.2. El plomo	8
1.2.1.Legislación y salud humana.....	9
1.3. Bioindicadores de contaminación metálica	12
1.3.1.Microalgas marinas.....	12
1.3.2.Nidos de avispas velutinas	13
1.4. Determinación de metales en matrices orgánicas.....	14
1.4.1.Tratamiento de la muestra	14
1.4.2.Técnicas instrumentales	18
2. Antecedentes y Objetivos.....	23
3. Procedimiento experimental.....	24
3.1. Aparatos y reactivos	24
3.2. Descripción de las muestras.....	25
3.2.1.Microalga marina <i>Isochrysis</i> T-ISO	25
3.2.2.Nidos de avispas velutinas	26
3.3. Pretratamiento de las muestras	27
3.3.1.Microalga marina <i>Isochrysis</i> T-ISO	27
3.3.2.Nidos de avispas velutinas	28
3.4. Procedimiento de análisis mediante US-ETAAS.....	28
4. Resultados y discusión	30
4.1. Ensayos previos	30
4.1.1.Microalga marina <i>Isochrysis</i> T-ISO	30
4.1.2.Nidos de avispas velutinas	31
4.2. Estudio de las condiciones de la preparación de la suspensión	32
4.2.1.Cantidad de la muestra.....	33
4.2.2.Concentración de tensoactivo Tritón X-100	33
4.2.3.Concentración de ácido nítrico.....	34
4.3. Programa de temperaturas del horno de grafito	36
4.3.1.Microalga marina <i>Isochrysis</i> T-ISO	37
4.3.2.Nidos de avispas velutinas	42
4.4. Validación del método analítico	44
4.5. Análisis de muestras	50

5. Conclusiones.....	53
6. Bibliografía	57
7. ANEXO: Cronograma de las actividades realizadas.....	64

Resumen

En el presente Trabajo de Fin de Grado se desarrollaron sendos métodos analíticos para la determinación de plomo en la microalga *Isochrysis galbana* y en nidos de avispas velutinas o asiáticas, respectivamente. Ambos procedimientos se basan en la preparación de suspensiones a partir de las muestras pulverizadas y su posterior análisis utilizando agitación ultrasónica acoplada a la espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica (US-ETAAS). Para cada tipo de matriz, se aplicó un tratamiento previo para adecuarlas al análisis. Las microalgas se sometieron a una etapa de lavado a fin de eliminar el contenido salino del medio de cultivo. Los nidos de avispa se pulverizaron en presencia de nitrógeno líquido para favorecer la trituración de las fibras vegetales de dicho material y obtener un polvo fino. Además, para este tipo de muestras fue necesaria una etapa posterior de calcinación a fin de eliminar la materia orgánica y concentrar el contenido del analito. Las suspensiones se prepararon directamente en el cubilete del automuestreador (1 mL) y se estudió el contenido óptimo de HNO₃ y de Tritón® X-100 para obtener suspensiones homogéneas y estables. Se estudiaron las condiciones de la medida por ETAAS, y en el caso de las microalgas fue necesario el empleo de paladio como modificador químico. Cada método establecido presenta buenas características analíticas y una sensibilidad adecuada para la determinación de Pb en las muestras estudiadas. La precisión alcanzada fue satisfactoria, dentro del criterio de aceptación (DER < 10 %), y la exactitud aceptable, con recuperaciones entre el 116,6 % y 75,2 % para un material vegetal con contenido de plomo certificado y orientativo, respectivamente.

Palabras clave: *microalga Isochrysis galbana, nidos de avispas velutinas o asiáticas, plomo, suspensiones, agitación ultrasónica acoplada a la espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica (US-ETAAS).*

Resumo

Neste Traballo de Fin de Grao desenvolvéronse sendos métodos analíticos para a determinación do chumbo na microalga *Isochrysis galbana* e en niños de avespas velutinas ou asiáticas, respectivamente. Ambos procedementos baséanse na preparación de suspensións das mostras pulverizadas e a súa análise posterior mediante axitación por ultrasóns xunto coa espectrometría de absorción atómica de atomización electrotérmica (US-ETAAS). Para cada tipo de matriz, aplícase un tratamento previo para adaptalas á análise. As microalgas foron sometidas a un proceso de lavado para eliminar o contido salino do medio de cultivo. Os niños de avéspera pulverizáronse en presenza de nitróxeno líquido para favorecer a trituración das fibras vexetais de dito material e obter un po fino. Ademais, para este tipo de mostras foi necesaria unha etapa de calcinación posterior para eliminar a materia orgánica e concentrar o contido de analito. As suspensións preparáronse directamente no cubilete do automuestrador (1 ml) e estudouse o contido óptimo de HNO₃ e Tritón® X-100 para obter suspensións homoxéneas e estables. Estudáronse as condicións da medición por ETAAS e no caso das microalgas foi necesario empregar o paladio como modificador químico. Cada método establecido presenta boas características analíticas e unha sensibilidade adecuada para a determinación de Pb nas mostras estudadas. A precisión acadada foi satisfactoria, dentro dos criterios de aceptación (DER < 10 %), e a exactitude aceptable, con recuperacións entre o 116,6 % e o 75,2 % para un material vexetal con contido en plomo certificado e indicativo, respectivamente.

Palabras chave: microalga *Isochrysis galbana*, niños de avespas velutinas ou asiáticas, chumbo, suspensións, axitación por ultrasóns con espectrometría de absorción atómica de atomización electrotérmica (US-ETAAS).

Abstract

In this Final Degree Project, two analytical methods were developed for the determination of lead in the microalga *Isochrysis galbana* and in nests of velutine or asian wasps, respectively. Both procedures are based on the preparation of slurries from the pulverized samples and their subsequent analysis using ultrasonic stirring coupled with electrothermal atomic absorption spectrometry (US-ETAAS). For each type of matrix, a previous treatment was applied to adapt them to the analysis. The microalgae were subjected to a washing step in order to eliminate the saline content of the cultivation medium. The wasp nests were pulverized in the presence of liquid nitrogen to favor the crushing of the plant fibers of the material to obtain a fine powder. In addition, for this type of samples a subsequent calcination stage was necessary in order to eliminate the organic matter and to concentrate the content of the analyte. The slurries were prepared directly in the autosampler cup (1 mL) and the optimal content of HNO₃ and Triton® X-100 was studied to obtain homogeneous and stable suspensions. The measurement conditions by ETAAS were studied, and in the case of microalgae it was necessary to use palladium as a chemical modifier. Each established method presents good analytical characteristics and an adequate sensitivity for the determination of Pb in the studied samples. The precision achieved was satisfactory, within the acceptance criteria (DER < 10 %), and the accuracy was acceptable, with recoveries between 116.6 % and 75.2 % for a plant material with certified and indicative lead content, respectively.

Keywords: *Isochrysis galbana* microalgae, velutine or asian wasp nests, lead, slurries, ultrasonic stirring coupled with electrothermal atomic absorption spectrometry (US-ETAAS).

1. Introducción

1.1. Metales en el medioambiente

A lo largo de la historia la utilización de los metales en la industria ha ido en aumento. Esto se debe a que aportan diferentes propiedades muy útiles al material al que se le añaden, como son la resistencia, la conductividad térmica y eléctrica o las propiedades biocidas. El uso de estos materiales produce una liberación continua de estos elementos y un aumento en la contaminación de muchas zonas ambientales. Dichos metales no solo proceden de fuentes antrópicas, sino que también de fuentes naturales (**Tabla I**). Se pueden encontrar tanto en ríos y océanos y a su vez pueden ser transportados a zonas lejanas de la fuente de emisión a través de la atmósfera (**Figura I**).



Figura I. Esquema que ilustra el movimiento de los metales pesados en el medio ambiente.

En la naturaleza los metales están presentes de diferentes maneras; como vapores, rocas, sales, arena y disueltos como iones en aguas (**Tabla I**). El principal problema es que persisten en el medio ambiente mucho tiempo ya que no pueden ser destruidos ni degradados (Kaplan, 2013). Algunos de ellos son esenciales para la vida de varios organismos, pero muchos otros son tóxicos en concentraciones muy bajas, como es el caso del cadmio, el mercurio y el plomo (Chouvelon et al., 2017).

Tabla I. Fuentes naturales y antrópicas de algunos metales contaminantes prioritarios
(Adriano, 2001).

Metal pesado	Fuente natural	Fuente antrópica
Plomo	Galena (PbS).	Minería y fundición, industria del hierro y acero, refinerías, industrias de la pintura, gases de escape de los automóviles, fontanería de plomo, baterías, lodos de depuradoras, plaguicidas.
Cadmio	Carbonatos y sulfuros de cinc y cobre.	Minería y fundición, manufactura metálica, industria del plástico, microelectrónica, baterías, fertilizantes fosfatados, lodos de las depuradoras.
Cromo	Cromita (FeCr_2O_4), Óxido de cromo (III) (Cr_2O_3).	Manufactura metálica, industria de plástico, tratamiento de madera, refinerías, industria pirometalúrgica, partículas residuales de minerales.
Cobre	Metal libre (Cu^0), Sulfuro de cobre (CuS_2), Calcopirita (CuFeS_2), drenaje de minas.	Minería y fundiciones, manufactura metálica, industria microelectrónica, tratamiento de madera, industria pirometalúrgica, estiércol de cerdos, plaguicidas, residuos.
Antimonio	Estibnita (Sb_2S_3), fuentes geotérmicas, drenaje de minas.	Fundiciones, industria microelectrónica y pirometalúrgica.
Níquel	Minerales ferromagnesianos, sulfuros ferrosos, Pentladita ((Ni, Fe) $_9$ S $_8$)), Óxido de níquel (NiO_2), Hidróxido de níquel ($\text{Ni}(\text{OH})_2$).	Industria del hierro y acero, minería y fundición, manufactura metálica, industria microelectrónica, manufactura de baterías.

En el **medio acuático** las primeras afectadas por la contaminación son las algas. Los efectos tóxicos que se producen en dichos organismos son la inhibición de la fotosíntesis y de la división celular, así como la reducción de la actividad enzimática y de la síntesis de compuestos orgánicos (Dongmei et al., 2016). A su vez las algas y microalgas forman parte de la cadena alimenticia marina y por lo tanto esos metales persisten en el ecosistema llegando a crustáceos, peces y, finalmente, a nosotros los seres humanos.

Desde el punto de vista medioambiental se buscan formas de minimizar el impacto de dichos metales utilizando diferentes métodos. De manera convencional los metales se eliminaban utilizando precipitación y reducción química, evaporación, intercambios iónicos, etc. Actualmente se estudia la posibilidad de incorporar procesos de biosorción ya que además de ser baratos son medioambientalmente sostenibles. Son varios los organismos válidos para este trabajo, entre ellos encontramos las bacterias, levaduras, hongos y también las algas (Ghoneim et al., 2014).

Los **suelos** son el compartimento ambiental más afectado, ya que más del 90% de los productos contaminantes se depositan en ellos repercutiendo en la hidrosfera, atmósfera y biosfera de la zona donde se encuentran. Esto a su vez provoca una alteración en el ecosistema que afecta a todos los organismos que viven en él (Orroño, 2002).

La contaminación del **aire** también ha sido foco de preocupación en varias zonas europeas los últimos años. La reducción de niveles de emisión de metales en la industria y la prohibición de añadir plomo a la gasolina fueron algunas de las medidas que se tomaron para solventar este problema (Querol, 2008). Sin embargo, la industria sigue creciendo y estos metales tienen un efecto residual que puede durar hasta veinte años (Medici et al., 2008). El monitoreo de la contaminación atmosférica puede llevarse a cabo usando diferentes métodos, entre ellos se encuentran el uso de filtros (Herrera-Muillo, 2010) y la utilización de bioindicadores. Dentro de estos últimos, el musgo es uno de los más usados y estudiados (Medici et al., 2008), y también los claveles, al igual que los líquenes, tienen una composición y fisiología válida para esta tarea. Entre las ventajas que proporciona su uso se encuentran su bajo coste y su longevidad. Así, estos vegetales pueden estar expuestos a compuestos tóxicos durante largos periodos de tiempo y se adaptan a muchas zonas ambientales (Ghirardi et al., 2010).

1.2. El plomo

El plomo es uno de los metales no esenciales bioacumulables que más abundan en la corteza terrestre, debido a su uso en una gran variedad de materiales como, por ejemplo: gasolina, pinturas y barnices, armas, municiones, etc.

Su toxicidad fue descrita como plumbismo hace más de 2000 años por un poeta griego y se ha estudiado de manera continuada hasta la actualidad. En la Revolución Industrial las intoxicaciones por dicho metal fueron un problema muy grande ya que la mayoría de los operarios de diferentes fábricas trabajaban con plomo. Actualmente la principal preocupación reside en la ingesta de alimentos que presentan este elemento.

La intoxicación por plomo inorgánico puede producir gran número de enfermedades, siendo la deficiencia en el desarrollo neuronal de los niños una de las más estudiadas. La exposición a este metal en la infancia o durante el embarazo y lactancia del bebé, puede producir problemas como la hiperactividad, dificultades en la comprensión lectora y complicaciones a la hora de comunicarse y socializar. En los adultos los problemas están más relacionados con casos de aumento de colesterol, aumento de la presión arterial, anorexia, irritabilidad, etc. En concreto, en el caso de los hombres, si la exposición es crónica pueden presentarse problemas también en el proceso de la espermatogénesis y una reducción de la libido (**Figura II**) (Pájaro Castro et al., 2013).

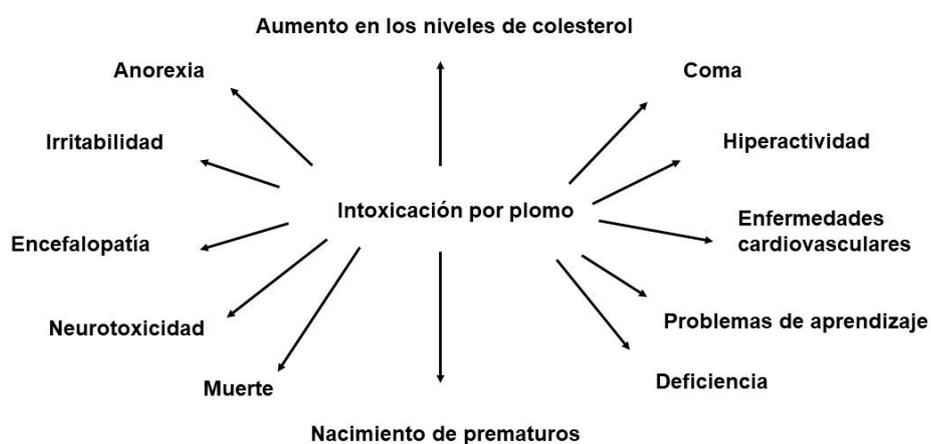


Figura II. Principales efectos sobre la salud causados por el plomo (Pájaro Castro et al., 2013).

Las principales vías de contaminación son, la primera, por vía ambiental ya que muchas de las zonas agrícolas se encuentran próximas a zonas como carreteras y autopistas; y, la segunda, por la gran capacidad de solubilización del metal en ácidos débiles orgánicos e inorgánicos (Rubio et al., 2004).

1.2.1. Legislación y salud humana

Históricamente se han establecido diferentes medidas legislativas con el fin de reducir el contenido de plomo en pinturas, latas, tuberías y gasolinas, para finalmente eliminar su uso. No obstante, sigue siendo necesario el control y seguimiento de la presencia de este metal en matrices ambientales y en alimentos debido a su persistencia y acumulación en las mismas.

En Europa, el plomo ha sido incluido desde el año 1999 en las Directivas europeas relativas a la calidad del aire ambiente. Actualmente está en vigor la Directiva 2008/50/CE del Parlamento Europeo y del Consejo del 21 de mayo de 2008 relativa a la calidad del aire ambiente y a una atmósfera más limpia en Europa, junto con la protección de la salud humana. En ella se establece como valor límite para el plomo en aire ambiente $0,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Este valor ya estaba vigente desde el 2005 y debía cumplirse antes del 1 de enero de 2010 en las inmediaciones de fuentes industriales específicas, situadas en lugares contaminados por la actividad industrial desarrollada a lo largo de decenios (Unión europea Directiva, 2008).

En 2018, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) disminuyó los Estándares de Calidad del Aire Ambiental (NAAQS) permitidos de $1,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ a $0,15 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Este cambio obligó a desarrollar un nuevo método de referencia federal (FRM) para determinar el plomo en muestras de aire. La espectroscopia de absorción atómica con atomización de llama (FAAS) se cambió por la espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) que demostró ser una técnica válida para la determinación de Pb a límites más bajos de cuantificación y con una mayor precisión inter e intralaboratorio (Harrington et al., 2014).

La Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas (ECHA) estudia los riesgos relacionados con la caza y pesca desde 2015 hasta la actualidad como fuentes de contaminación por plomo. Esta organización ha realizado propuestas con la aprobación tanto del Comité de Evaluación de Riesgos (RAC) como del de Análisis

Socioeconómico (SEAC). Actualmente están recopilando datos para respaldar las investigaciones propuestas y se calcula que aproximadamente la práctica de ambas, a través de la munición empleada en la caza y los aparejos de pesca, produce al año entre 21000 y 27000 toneladas de este metal tan perjudicial.

Respecto a la munición, la mayoría de los perdigones de plomo utilizados en caza no acaban en la presa sino que se liberan al medio ambiente. Las aves, pensando que es comida, ingieren restos de estas balas perdidas. Una vez dentro del animal se descomponen y el plomo se absorbe. Se calcula que al año mueren un millón de aves acuáticas debido a esta causa. Mediante intoxicación secundaria también repercute a las especies carroñeras y depredadoras de estos animales.

Para solucionar dicho problema se estudia la posibilidad de utilizar tanto balas de acero como de wolframio y bismuto. Su efectividad es similar pero tienen un coste mayor, aunque no prohibitivo.

Otra fuente de contaminación son los pesos pesqueros que liberan entre 2000 y 6000 toneladas de plomo adicionales al mar (ECHA, 2020). En este caso no hay estudios que demuestren que el consumo de pescado capturado con utensilios de plomo pueda ser una vía de intoxicación humana, pero si se ha confirmado que la contaminación por plomo afecta a algas marinas y plantas halófilas. Es por ello que recientemente la UE ha emitido la Recomendación 2018/464 donde dichos vegetales y los productos hechos a base de ellos se harán pasar por un control de la presencia de varios metales pesados (As, Cd, I, Pb, Hg) en los años 2018, 2019 y 2020 (Unión Europea Recomendación, 2018).

Por su parte la EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) estudió la exposición a este metal que recibían en la vida cotidiana los adultos y niños. Las conclusiones obtenidas fueron que la exposición media en los pequeños era mayor que la de los adultos y que, a su vez, en el caso de los menores esta exposición se relacionaba con la aparición de efectos tóxicos. Con estos estudios confirmaron que el plomo repercutía en mayor medida en la población infantil (Ministerio de Sanidad y AECOSAN, 2015). En 2015 se publicó el Reglamento Europeo 2015/1005 donde, entre otros aspectos, se modificaron y añadieron nuevos límites en la alimentación y medicación relacionada con los niños (Unión Europea Reglamento, 2015).

A su vez, la ya citada Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) realizó estudios donde también se demostraron los efectos negativos que producía este metal sobre todo en la población infantil. En este caso se estableció un valor de ingesta máxima diaria de plomo de 3 µg/día, para niños y 12,5 µg/día, para adultos (Frank et al., 2019).

La Unión Europea ha establecido el Reglamento 1881/2006 donde constan los límites máximos de plomo en varios alimentos. Dentro de los que más consumimos y que están más expuestos al metal encontramos los cereales, los vegetales y el agua potable (Unión Europea Reglamento, 2006) (**Tabla II**).

Tabla II. *Contenidos máximos permitidos de plomo en alimentos. Fuente: Reglamento n°1881/2006 de la Unión Europea.*

Producto alimenticio	Contenido máximo (mg/kg peso fresco)
Leche cruda, tratada térmicamente y para fabricación de productos lácteos	0,020
Carne de pescado	0,30
Crustáceos, excluida la carne oscura del cangrejo, así como el tórax de la langosta y de crustáceos similares de gran tamaño.	0,50
Moluscos bivalvos	1,5
Cereales, legumbres y legumbres secas	0,20
Frutas, excluidas las bayas y las frutas pequeñas.	0,10
Bayas y frutas pequeñas	0,20
Vinos, sidras, peradas y vinos de frutas	0,20
Grasas y aceites, incluida la grasa láctica	0,10

1.3. Bioindicadores de contaminación metálica

Los bioindicadores son organismos o comunidades de ellos que pueden responder a la contaminación ambiental mediante alteraciones en su fisiología o a través de su capacidad para acumular contaminantes. Pueden ser especies vegetales, hongos o animales, y deben cumplir una serie de requisitos para su empleo, como es su dispersión, abundancia, sedentarismo y tolerancia a los agentes contaminantes (Parmar et al., 2016).

En el presente TFG se consideran como matrices ambientales de interés la microalga marina *Isochrysis galbana* y los nidos de avispas velutinas como bioindicadores de contaminación metálica.

1.3.1. Microalgas marinas

Las microalgas son organismos unicelulares eucariotas fotosintéticos que miden entre 2 - 200 μm y que pueden crecer de manera heterotrófica o autotrófica. Tienen la gran capacidad de producir biomasa a partir de la energía solar (son 4 veces más eficientes que las plantas) y de fijar el CO_2 . Estos organismos son la base de la cadena trófica y están presentes en todo tipo de ecosistemas como pueden ser ríos, mares, lagos, suelos, etc. El hecho de que se puedan encontrar en una gran variedad de localizaciones y su gran versatilidad hace que sean una gran posibilidad de negocio para muchas empresas de diferentes ámbitos. Su uso en cosmética, en la industria farmacéutica y en la acuicultura son varios ejemplos de las muchas finalidades que pueden tener estos organismos (Grupo cooperativo cajamar, 2015).

En este Trabajo de Fin de Grado se estudia en concreto la microalga *Isochrysis galbana* (clon T-ISO) a la cual se le llamará a lo largo de presente trabajo *Isochrysis T-ISO*. Este organismo unicelular eucariota forma parte del género haptófitos y tiene un color entre marrón y dorado. Su forma es ovalada y suele medir entre 4 - 6 μm de diámetro. Consta de dos flagelos que le proporcionan su movimiento helicoidal característico. Su tasa de crecimiento es rápida y tiene una amplia tolerancia fisicoquímica.

En acuicultura es utilizada como alimento debido a sus altos valores nutritivos. Su gran cantidad de ácidos grasos hacen que sea un gran aporte alimentario para larvas,

moluscos y crustáceos. Su gran sensibilidad a sustancias como los metales hace que también se estudie la posibilidad de incorporarlo en los protocolos internacionales para pruebas de toxicidad (Tato y Beiras, 2019).

1.3.2. Nidos de avispas velutinas

Las avispas velutinas o asiáticas comienzan su ciclo vital con la creación en primavera de un nido primario hecho únicamente por una avispa reina. Es una fase decisiva para la subsistencia de la colonia ya que si muere la reina no nacerán las avispas trabajadoras encargadas de realizar el nido secundario (**Figura III**). A partir de otoño este refugio alcanza su mayor tamaño y la cantidad de individuos ronda los 6000. Los nidos esféricos y muy voluminosos pueden llegar a medir de 60 a 90 cm de altura y de 40 a 70 cm de diámetro. En su interior pueden tener hasta 15000 celdillas y su exterior puede estar protegido por 5 o 6 capas de celulosa (Gobierno de España, 2015).

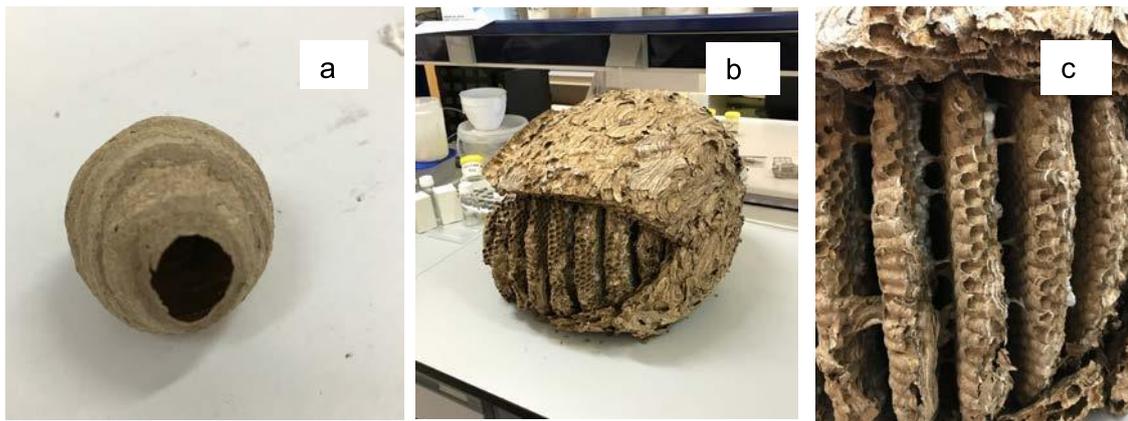


Figura III. Tipos de nidos: (a) nido primario; (b) nido secundario; (c) detalle de la estructura interna del nido secundario.

Las avispas se centran en la reproducción y en la expansión del nido hasta el invierno, cuando los machos y las trabajadoras mueren. Las larvas de reinas potenciales se mantienen vivas hasta primavera cuando las que estén fertilizadas iniciarán su propia colonia en otro lugar, creando otro nido primario y cerrando un ciclo que se desarrolla a lo largo de un año.

En los últimos años se ha estudiado la posibilidad de utilizar a diferentes tipos de insectos como posibles bioindicadores. En varios trabajos como los de de Souza et al. (2010) y Urbini et al. (2006) hablan del uso del grupo de las avispas sociales como

posible especie para el biomonitorio. En concreto, Urbini et al. (2006) plantea la posibilidad de utilizar la masa fecal de las larvas (que se alimentan de insectos hervíboros) para analizar la contaminación de plomo de una zona urbana. Se eligieron las heces larvales ya que acumulan 36 veces más plomo que las adultas. Otros trabajos como el de Zhelyazkova (2012) estudian el mismo fenómeno pero utilizando en este caso abejas melíferas.

Es por ello que existe la posibilidad de que los nidos de avispas velutinas puedan actuar como bioindicadores de metales tóxicos. Estos refugios los construyen los insectos usando fibras vegetales con agua y saliva y a su vez con material muerto o podrido de los árboles de los alrededores. Por lo tanto, el análisis del nido podría proporcionarnos una idea de la contaminación del bioma en el que se encuentra. A su vez la disposición de los nidos en la naturaleza no es la misma siempre ya que las avispas los construyen teniendo en cuenta factores como la temperatura, la humedad, la lluvia, la luz, etc. Es decir, su estudio nos aportaría información de la contaminación no solo de un bioma, sino de varios (Monceau et al., 2014).

1.4. Determinación de metales en matrices orgánicas

En la actualidad son muy diversas las metodologías empleadas para determinar metales en matrices sólidas orgánicas, como son las muestras objeto de este estudio. En la mayoría de ellas es necesario utilizar tratamientos previos para pasar al analito a una disolución, de forma cuantitativa, y poder llevar a cabo su posterior determinación. El análisis directo también se realiza, si bien la disponibilidad y coste de la instrumentación necesaria lo hace más limitado.

1.4.1. Tratamiento de la muestra

El método más utilizado para extraer metales pesados de matrices sólidas orgánicas es la **digestión**. En él se somete la muestra a calentamiento mezclada con ácidos minerales concentrados durante periodos largos y presiones elevadas. Se usan generalmente ácidos fuertes, corrosivos y bastante tóxicos entre los que se encuentran el ácido clorhídrico (HCl), el ácido nítrico (HNO₃) o el ácido sulfúrico (H₂SO₄) (Hernández-Martínez et al., 2016). Comúnmente, para que la descomposición sea total se utilizan oxidantes secundarios como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

Cuando se utiliza energía de microondas el procedimiento se denomina digestión asistida por microondas (MAD), que proporciona tiempos de extracción más cortos al realizar el tratamiento en recipientes cerrados que alcanzan altas presiones y temperaturas.

A continuación se comentan algunos trabajos recogidos en la bibliografía en los que se lleva a cabo la digestión de material orgánico. Así Maduro et al. (2006), realizan la digestión de agujas de abeto, plancton, col blanca, ostras y algas utilizando como oxidantes el HNO_3 y el H_2O_2 . En otro estudio relacionado con la determinación de Cd en microalgas marinas (Ghoneim et al., 2014) se siguió una metodología similar, pero usando HNO_3 y ácido perclórico (HClO_4).

Otros estudios contemplan alternativas más respetuosas con el medio ambiente. En ellos, los ácidos se reemplazan por surfactantes que no son tóxicos, inflamables o volátiles, y por el contrario son biodegradables. Estos surfactantes forman micelas que son capaces de solubilizar especies hidrofóbicas como los metales pesados. Muchos estudios demuestran la eficacia de esta técnica utilizando dodecilsulfato de sodio (SDS), un surfactante aniónico, o Tritón® X-100 y Tritón X®-114, surfactantes no-iónicos (Hernández-Martínez et al., 2016). Una de sus ventajas es que ciertas micelas pueden combinarse produciendo un efecto sinérgico donde las diferentes especies de interés pueden separarse a través de interacciones iónicas.

Otro método usado para el tratamiento de muestras sólidas orgánicas es la **digestión por vía seca**. Se basa en someter a la muestra a un proceso de calcinación, seguido de una puesta en disolución del residuo obtenido (Chaparro G. et al., 2016). La principal ventaja es que no requiere el uso de reactivos tóxicos pero presenta como limitación que se puede volatilizar parte del analito (Bianchini y Eyherabide, 1998).

En las **Tablas III y IV** se esquematizan varios estudios de interés donde se determinan plomo y otros metales en matrices similares a las objeto de estudio en este trabajo.

Tabla III. Metodologías para la determinación de metales en algas y moluscos.

Analito	Matriz	Procedimiento	Parámetros analíticos	Referencia
As, Cd, Cr, Ni, V, Co, Mo, Pb , Sb, Se.	Algas	<p>-Digestión ácida asistida por microondas:</p> <p>4,5 mL HNO₃ + 0,5 mL H₂O₂ 5 min / 200W</p> <p>-Determinación por ICP-MS</p>	<p>Buena exactitud y precisión para los materiales de referencia: CRM 279 Sea lettuce (Ulva lactuca), NCS ZC78006 Tea y NIST1547 Peach leaves.</p> <p>LOD para Pb: 1,74x10⁻³ µg/g.</p>	(Ródenas de la Rocha et al., 2009)
Cd, Cr, Cu, Pb y Zn	Algas y moluscos	<p>-Digestión ácida asistida por microondas:</p> <p>Algas: HNO₃</p> <p>Moluscos: 5 mL de HNO₃ + 2 mL de H₂O₂</p> <p>-Determinación por HG-GFAAS y FAAS</p>	<p>Buena exactitud y precisión para los materiales de referencia: CRM 279 (sea lettuce), CRM 278 (mussel) y CRM 403 (seawater).</p> <p>LOD: 0,06 µg/g para plantas macrófitas y 0,07 µg/g para moluscos.</p>	(Conti & Cecchetti, 2003)
Pb , Cd	Algas bentónicas	<p>-Digestión vía seca:</p> <p>Mufla (400-450 °C, 8h) + 15 mL de HCl 25%</p> <p>-Determinación por ETAAS</p>	<p>Buena exactitud y precisión para CRM 279 (Ulva lactuca).</p>	(Lozano et al., 2003)

Tabla IV. Metodologías para la determinación de metales en material vegetal.

Analito	Matriz	Procedimiento	Parámetros analíticos	Referencia
Pb, Zn y Cu	Líquenes y hojas de manzano y melocotonero	<p>-Digestión ácida en recipiente cerrado:</p> <p>3 ml de HNO₃ + 3 ml de H₂O₂ + 2 ml de H₂O + 0,8 ml de HF 210 °C / 350 psi</p> <p>-Determinación por EMMA-XRF e ICP-AES</p>	<p>Procedimiento robusto y fiable.</p> <p>Recuperaciones para los CRMs NIST 1515 (Apple Leaves), NIST 1547 (Peach Leaves) y CRM 482 (Lichens) 4RR: 97,9%, 86,7% y 68,8%.</p>	(Dolgopolova et al., 2004)
Ca, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Rb, Ag, Cd, Ba, Tl, Th y U	Turba y material vegetal	<p>-Digestión ácida por microondas en un autoclave de alta presión:</p> <p>3 ml HNO₃ + 0,1 ml HBF₄ 20 – 240 °C / 76 min / 110 bar</p> <p>-Determinación por ICP-QMS</p>	<p>La presencia HF o HBF₄ aumenta la eficiencia de la digestión debido a la formación de fluoruro que libera todos los elementos de la matriz (incluyendo los del silicato).</p>	(Krachler et al., 2002)
V, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Cd, Pb, Th, U y 14 tierras raras	Sedimento y hojas de melocotonero	<p>-Digestión ácida asitida por microondas:</p> <p>Hojas de melocotonero: 5ml HNO₃ 60% 230°C / 35min / 75 bar / 1000W</p> <p>Sedimento: 1ml HF 48% + 5ml HNO₃ 60% 230°C / 45min / 75 bar / 1000W</p> <p>- Preconcentración con fibras quelantes, HNO₃ y NH₄CH₃CO₂.</p> <p>-Determinación por ICP-MS</p>	<p>Buenos resultados analíticos: DER entre 1,1% (Pb) y 7,1% (Ni), y la exactitud (desviaciones porcentuales) entre 0,6% (Pb) y 15% (Mn). CRM: NIST 1547(Peach leaves) y NIES N°2 (pond sediment).</p>	(Lee et al., 2004)

1.4.2. Técnicas instrumentales

En la actualidad existen varias técnicas instrumentales para poder determinar y cuantificar metales en matrices orgánicas. Las técnicas de espectrometría atómica son las más utilizadas y, de forma general, requieren la puesta en disolución de los analitos de interés.

Dentro de ellas, es ampliamente utilizada la espectrometría de absorción atómica (AAS), que nos proporciona un análisis fiable y rápido de elementos metálicos. Una de las limitaciones que presenta es que solo permite la determinación de un elemento cada vez.

Dentro de sus variantes, las más comunes son la atomización en llama (FAAS) y la atomización electrotrémica (ETAAS). La primera es una de las técnicas más utilizadas ya que es fácil de manejar y no es muy costosa, pero tiene como principal inconveniente una sensibilidad limitada para el plomo. Por otro lado, la ETAAS es una técnica muy sensible para el análisis de elementos traza. Su principal limitación se debe a que estos elementos suelen encontrarse en matrices complejas donde pueden aparecer interferencias y por lo tanto pueden ser necesarios procedimientos previos de separación y concentración del analito antes de realizar el análisis (Yebra-Biurrun y Moreno-Cid Barinaga, 2002).

Otra técnica es la espectroscopia de absorción atómica con generación de hidruros (HG-AAS) que se utiliza para elementos que forman especies volátiles a partir de una reacción de reducción, que son introducidas en el atomizador mediante una corriente de gas inerte. Entre las ventajas de HG-AAS encontramos un mejor límite de detección comparado con el FAAS, mayor rapidez en la medida comparado con ETAAS y menor número de interferencias debido a la separación completa del analito de la matriz (Sibakoti, 2011).

En algunos casos se combina la ETAAS con la inyección en flujo (FI-ETAAS) pudiendo mejorar así la sensibilidad, la selectividad y la exactitud, y aumentar el rango analítico, por existir menor número de interferencias al trabajar con tiempos cortos de reacción, destacando su rapidez, simplicidad y economía (Herbello Hermelo, 2007).

La espectrometría de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-

AES) y la espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) son otras dos técnicas que tienen como ventajas frente a las técnicas de absorción la posibilidad de determinar simultáneamente varios elementos, y su menor número de interferencias como consecuencia de las altas temperaturas que se alcanzan en el plasma empleado. Sin embargo, son equipos más caros, con mayor coste de operación y con menor precisión que la AAS (Gomis Yagües, 2008).

El análisis directo de muestras sólidas también se emplea, aunque en menor medida. En este tipo de análisis no se realiza tratamiento previo de las muestras, salvo en algunos casos la pulverización.

Una de las técnicas de análisis directo con un uso creciente en la actualidad es la espectrometría de fluorescencia de rayos-X (XRF). Se caracteriza por ser una técnica multielemental no destructiva y rápida que analiza las muestras de forma simultánea y con un amplio rango lineal de trabajo. Como ya se ha mencionado, una de las ventajas más importantes de la XRF es que el análisis puede realizarse de manera directa en sólidos, lo cual evita tener que disolver o descomponer las muestras. Entre las limitaciones encontramos la dificultad de realizar este análisis en muestras líquidas y su insuficiente sensibilidad para elementos traza como son el Cd y el Pb. Así como también suele presentar una menor precisión y exactitud en los resultados y la instrumentación no suele estar disponible en muchos de los laboratorios (Margui et al., 2011).

Otro tipo de análisis directo consiste en preparar suspensiones a partir de la muestra sólida. Para ello solo es necesario pulverizar la muestra y dispersar una pequeña cantidad de esta en un diluyente, normalmente agua ultrapura con un bajo contenido de ácido (ácido nítrico, clorhídrico, etc.). La preparación de suspensiones tiene la ventaja de que pueden ser introducidas de forma directa en muchas técnicas de espectrometría atómica, aunque en algunas de dichas técnicas son necesarios dispositivos o accesorios especiales para realizar dicha tarea. No es el caso de la espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS), en la que se pueden analizar las suspensiones utilizando los automuestreadores y atomizadores convencionales, de ahí el gran potencial que presenta el acoplamiento del análisis de suspensiones con ETAAS. Otra ventaja a la hora de analizar suspensiones con dicha técnica es que la suspensión, al prepararse directamente en los cubiletos del automuestreador del espectrofotómetro, necesita una menor cantidad de muestra y reactivos empleados, y por lo tanto la generación de residuos también

disminuye. Además, de forma muy habitual se acopla al equipo una sonda de ultrasonidos para agitar la suspensión de forma automática y así mantener la homogeneidad de esta durante el análisis.

Muchos trabajos relacionados con el análisis directo de muestras sólidas utilizan esta técnica por sus indudables ventajas y sus buenos resultados, comparables a los métodos tradicionales. Savio et al. (2010) determinan Pb en sedimentos, lodos y suelos utilizando esta técnica, al igual que Pazos-Capeáns et al. (2004) que determina Cr en sedimentos de la ría de Arousa. En el caso del trabajo realizado por Sánchez-Moreno et al. (2010) se determina Cu, Ni, Cd, Pb en hojas de ciprés, roble y pino. El grupo de Química Analítica Aplicada (QANAP) ha desarrollado con éxito métodos basados en esta metodología para la determinación de Co, Cr, Mo, Ni, V (Felipe-Sotelo et al., 2004a 2004b, 2005) y Sb (Cal-Prieto et al., 2000, 2006) en muestras ambientales, como son suelos, sedimentos, particulado atmosférico, carbón, etc. Así como también han desarrollado métodos directos combinando la técnica de generación de hidruros y ETAAS para determinar trazas de Sb en sedimentos (Cal-Prieto et al., 2005).

A continuación se resumen los principales aspectos de la espectroscopia de absorción atómica con atomización electrotérmica, por ser la técnica empleada en el presente TFG.

Espectroscopia de Absorción Atómica con Atomización Electrotérmica

La espectroscopia de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS) es una técnica que tiene como ventaja su gran sensibilidad en muestras de volúmenes muy pequeños. Como todos los instrumentos de absorción atómica, consta de una fuente de radiación, un atomizador, un selector de longitud de onda, un detector y un procesador de señal y lectura.

En los atomizadores electrotérmicos primero se evapora la muestra a una temperatura baja y más tarde se incrementa hasta llegar a un valor determinado donde se calcina la matriz. Una vez que se obtiene la ceniza, se aumenta la corriente a varios cientos de amperes, que hacen que la temperatura sea de 2000-3000 °C y ocurra la atomización. Este proceso ocurre en un periodo de milisegundos a segundos y el vapor que se disipa por encima de la superficie del atomizador se mide de manera inmediata.

La atomización sucede en un tubo de grafito cilíndrico que tiene un orificio central para la introducción de la muestra. El tubo intercambiable se coloca entre un par de contactos también de grafito (**Figura IV**) y se recubre de una carcasa de metal por donde fluye una corriente de agua que se utiliza como refrigerante. Por el tubo se hacen pasar dos corrientes de gas inerte. La externa evita la calcinación del tubo al no dejar pasar el aire de fuera, y la interna, además de arrastrar el aire que contiene dentro el tubo, se encarga de eliminar los vapores generados por la matriz durante las etapas de calentamiento. Muchas veces el tubo está recubierto de carbono pirolítico con la finalidad de que se sellen los poros del grafito y por lo tanto sea menor la difusión del analito y de la matriz durante la atomización.

Dentro de este tubo se encuentra la plataforma de L'vov, también hecha de grafito, donde se deposita la muestra que más tarde se evapora y calcina. Su principal función es conseguir una temperatura constante en el tubo, lo cual mejora la reproducibilidad de las señales que se obtienen.

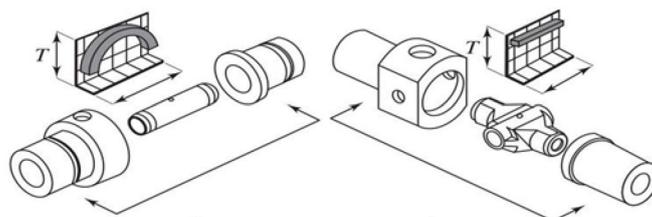


Figura IV. Diferentes diseños de atomizador de grafito (Skoog et al., 2008).

A la hora de medir las señales utilizando esta técnica podemos encontrar interferencias de dos tipos: las espectrales y las químicas. Las primeras, denominadas absorción de fondo, son las que se producen debido a que las líneas de absorción del analito están muy próximas o coinciden con la absorción que producen especies moleculares que están en el interior del tubo en el momento de la atomización. Se corrigen utilizando los correctores de fondo (dispositivos que están incluidos en los instrumentos y que miden la absorción de fondo y la total proporcionando la absorción corregida correspondiente únicamente al analito). Por su parte, las interferencias químicas se producen durante la atomización por la formación de compuestos químicos con el analito que provocan cambios en las propiedades de absorción del mismo. Se corrigen añadiendo modificadores químicos que son sustancias que estabilizan térmicamente al analito evitando su volatilización o aumentan la volatilidad de los componentes de la matriz para poder eliminarlos de forma eficiente (Skoog et al., 2008).

2. Antecedentes y Objetivos

El grupo de investigación de Química Analítica Aplicada (QANAP) cuenta con una amplia experiencia en el estudio de la calidad ambiental del aire y del medio marino mediante el análisis de bioindicadores adecuados e incluso colaborando en el desarrollo de un sistema patentado que se basa en musgo clonado para el monitoreo de contaminantes atmosféricos (Capozzi et al., 2017). Para estos estudios se han desarrollado metodologías de análisis directo de matrices complejas para la determinación de metales siguiendo los principios de la Química Verde. Así, se han establecido métodos empleando la técnica del análisis directo de suspensiones mediante espectroscopia de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS) para determinar diversos metales en matrices ambientales como suelos, sedimentos y particulado atmosférico, tal como se indicó en la introducción de esta memoria.

Basándonos en todo ello, en este trabajo de fin grado se plantea extender esta metodología a la determinación de plomo en otras matrices ambientales como son la microalga marina *Isochrysis galbana* (clon T-ISO) y los nidos de avispa velutina.

Para alcanzar este objetivo será necesario:

- Establecer el pretratamiento adecuado de cada tipo de matriz a analizar.
- Establecer las condiciones de preparación de la suspensión en cada caso.
- Establecer las condiciones instrumentales óptimas para la determinación de plomo en las suspensiones agitadas ultrasónicamente mediante espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica (US-ETAAS).
- Determinar y evaluar las características analíticas de la metodología propuesta para su validación.

3. Procedimiento experimental

3.1. Aparatos y reactivos

En este trabajo se utilizaron los aparatos listados a continuación:

- Balanza electrónica AND modelo ER-180A, de precisión 0,00001 g.
- Centrífuga Eppendorf modelo 5804.
- Espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer modelo 4100 equipado con cámara de grafito modelo HGA-700, sistema corrector de fondo de Deuterio, inyector automático AS-70 y una sonda de agitación ultrasónica modelo USS-100.
- Lámpara de cátodo hueco de plomo (Perkin Elmer).
- Micropipetas automáticas (Eppendorf) con puntas desechables (10-100 μL , 20-200 μL , 100-1000 μL).
- Picadora de uso doméstico.
- Tubos de grafito pirolítico provistos de plataforma de L'Vov (Perkin Elmer).

A su vez para realizar los análisis se utilizaron los siguientes reactivos:

- Ácido clorhídrico 36,5% para análisis de trazas (J.T. Baker).
- Ácido nítrico 65% para análisis de trazas (J.T. Baker).
- Dihidrógenofostato amónico, 99,999 % pureza (Aldrich). A partir del cual se prepara una disolución de trabajo al 2 % (m/v).
- Disolución patrón de 1000 mg/L de Pb (Panreac). A partir de esta disolución madre se prepara una disolución de 10 mg/L y de esta, la disolución de trabajo de 100 $\mu\text{g/L}$.
- Formiato de amonio, $\geq 99,995\%$ para análisis de metales traza (Sigma-Aldrich). A partir del cual se prepara una disolución de trabajo al 1 % (m/v).
- Materiales de Referencia para los nidos: Peach leaves GBW 08501 y material vegetal ejercicio interlaboratorio Interlab VL (93-690).
- Nitrógeno líquido
- Paladio en polvo, 99,999 % pureza (Aldrich). A partir del reactivo comercial se preparó una disolución de 1000 $\mu\text{g/L}$.
- Tritón® X-100 Sigma Ultra (Sigma-Aldrich).

Los materiales usados en el proyecto fueron los siguientes:

- Cubiletes del automuestreador de polietileno (capacidad 1,5 mL).
- Espátulas de plástico.
- Filtros de celulosa, tamaño de poro 0,45 μm ; diámetro 47 mm (Millipore).

- Mortero de ágata.
- Placas Petri.
- Vasos de precipitados, capacidad 0,5 L.

Todo el material utilizado se lava con agua y jabón, enjuagándolo tres veces con agua ultrapura y sumergiéndolo en ácido nítrico al 10 % (v/v) durante 24 h. Transcurrido ese periodo de tiempo se vuelve a enjuagar con abundante agua ultrapura y se deja secar.

3.2. Descripción de las muestras

Como se ha indicado anteriormente, las muestras objeto de estudio en el presente trabajo son la microalga marina *Isochrysis* T-ISO y los nidos de avispa velutinas o asiáticas, que se describen a continuación.

3.2.1. Microalga marina *Isochrysis* T-ISO

Las microalgas marinas *Isochrysis* T-ISO fueron proporcionadas por el grupo de investigación Estudio y Aplicaciones de las Microalgas de la Universidade da Coruña. Después de 3-4 semanas de crecimiento, todo el contenido del matraz (**Figura V**) se somete al tratamiento previo que se describe en el apartado 3.3.1.



Figura V. Cultivo de microalga *Isochrysis* T-ISO.

3.2.2. Nidos de avispas velutinas

En el caso de los nidos de avispa se dispone de doce muestras cedidas por la profesora M^{ra} José Servia del Departamento de Biología de la UDC. La recogida del material se llevó a cabo en la zona de Oleiros, en concreto en los puntos que se muestran en el mapa (**Figura VI**).



Figura VI. Mapa de los puntos de muestreo de los nidos de avispas asiáticas.

El aspecto de las muestras es diferente entre sí, así como la cantidad de muestra disponible de cada una de ellas. A causa de esto, se lleva a cabo una selección previa del material para poder disponer de muestras representativas para el análisis. Se tienen en cuenta las diferentes partes de la estructura y el aspecto del nido así como la cantidad de cada muestra. En los casos en los que hay suficiente cantidad de material de las diferentes partes, se toma una porción de la parte externa del nido y otra de la parte interna (panal). En los casos en los que esto no sucede, se utiliza la totalidad de la muestra independientemente de la parte a la que corresponda (**Figura VII**).

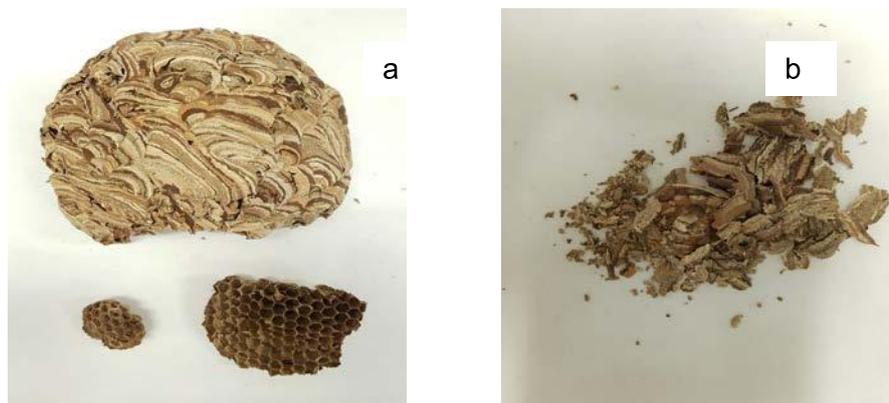


Figura VII. Muestras de nidos de avispas velutinas: (a) Parte exterior e interior de la muestra n° 11 y (b) Muestra n° 4 sin partes diferenciadas.

3.3. Pretratamiento de las muestras

En este apartado se describen los tratamientos previos a los que se sometieron las muestras de la microalga *Isochrysis* T-ISO y los nidos de avispas asiáticas para llevar a cabo la determinación de plomo en las mismas.

3.3.1. Microalga marina *Isochrysis* T-ISO

Las muestras de microalgas se someten en primer lugar a un proceso de lavado, adaptado del trabajo de Paredes (1995). Para ello se llenan 6 tubos de la centrifuga con alícuotas de 25 mL del cultivo de microalga y se centrifugan durante 8 min (2500 rpm). El sobrenadante se decanta y se añaden otros 25 mL de cultivo de microalga y se repite el proceso. Después de decantar nuevamente el sobrenadante se añaden a cada tubo, sobre las microalgas, 10 mL de formiato de amonio al 1 % (m/v). Se agita manualmente para favorecer que la sal entre en contacto con el líquido de lavado. Se centrifugan y se decanta aproximadamente la mitad del sobrenadante. El contenido de los seis tubos se combina en uno solo, que finalmente se centrifuga y se decanta todo el sobrenadante. La microalga depositada se separa y se seca en estufa a 60 °C durante 48 h. Una vez seca se disgrega con ayuda de un mortero de ágata.

3.3.2. Nidos de avispas velutinas

Las muestras de nidos se secan en la estufa a 60 °C durante 72 horas. A continuación se trituran para reducir su tamaño de partícula. Se someten a una primera trituración con una picadora de uso doméstico en presencia de nitrógeno líquido y posteriormente se molturan en un mortero de ágata, también en presencia de nitrógeno líquido.

Parte de las muestras molturadas se someten a calcinación utilizando el programa de la **Tabla V** (Sluiter et al., 2008).

Tabla V. Programa de calcinación para las muestras de nidos.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo o rampa
1	105	12 min
2	250	10 °C/min, 30 min
3	575	20 °C/min, 180 min
4	105	Hasta que se retiren de la mufla

3.4. Procedimiento de análisis mediante US-ETAAS

La determinación de plomo en las muestras se lleva a cabo de forma directa analizando suspensiones preparadas en los cubiletes de polietileno del automuestreador del horno de grafito, el cual tiene acoplado un sistema automático de agitación ultrasónica (US-ETAAS).

Las suspensiones se preparan pesando una masa de muestra seca en el rango de 20 mg a 40 mg para las microalgas y de 5 mg a 10 mg para las cenizas de los nidos, directamente en los cubiletes. A continuación se añade 1 mL de la disolución acuosa de HNO₃ y Tritón® X-100, con una concentración del 1,5 % (v/v) y 0,6 % (m/v), respectivamente, para las muestras de microalgas y del 1 % (v/v) y 0,1 % (m/v) para las muestras de nidos de avispa.

En todos los casos, el cubilete se coloca en el carrusel del automuestreador y se somete a agitación con sonda de ultrasonidos durante 10 s con una potencia de 40 W.

Inmediatamente después de finalizar la agitación, se inyectan 2 - 4 μL de la suspensión en el atomizador y el volumen necesario de diluyente, en este caso HNO_3 0,5 % (v/v), para completar el volumen total a 20 μL .

Se emplean tubos de grafito pirolítico con plataforma de L'Vov y el programa de temperaturas del horno optimizado para cada una de las matrices (**Tabla VI**). La determinación de Pb en microalgas requirió la adición en el atomizador de 4 μL de una disolución de Pd de 1000 mg/L, como modificador químico. Todos los análisis se hacen por triplicado usando un corrector de fondo de deuterio que compensa la absorción molecular debida a la matriz. Las señales se registran (en área y altura de pico atómico) a la longitud de onda característica del Pb, 283,2 nm (anchura de banda espectral 0,7 nm). Las disoluciones patrón para construir las curvas de calibrado y las de adiciones estándar se preparan de forma automática con el muestreador del equipo, a partir de una disolución patrón de Pb de 100 $\mu\text{g/L}$.

Tabla VI. Programa del horno de grafito para la determinación de Pb en suspensiones por ETAAS.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo rampa (s)	Tiempo calentamiento (s)	Flujo Ar (mL/min)
Secado 1	100	1	5	300
Secado 2	130	30	5	300
Pirólisis	1100/400*	20	20	300
Atomización	1500/1800*	0	3	0
Limpieza	2500	1	3	300

* Microalga/Nido

4. Resultados y discusión

En este apartado se presentan los resultados alcanzados en el presente trabajo, su interpretación y discusión para con ellos poder elaborar las conclusiones del estudio.

4.1. Ensayos previos

Antes de comenzar a realizar los análisis, se llevaron a cabo una serie de pruebas con la finalidad de encontrar el mejor método para el tratamiento previo de las muestras. Debido a las diferencias que existían entre las matrices orgánicas a estudiar, los ensayos que se practicaron con cada una de ellas fueron diferentes.

4.1.1. Microalga marina *Isochrysis* T-ISO

Para las muestras de microalgas marinas *Isochrysis* T-ISO se realizaron ensayos previos para evaluar una etapa previa de lavado. Se analizaron muestras sin lavar y lavadas con agua ultrapura. Tal como se observa en la **Figura VIII**, para las muestras sin lavar se registró una señal atómica aproximadamente el 50 % menor que para las muestras lavadas, así como con una mayor señal de absorción molecular. Esto se debe al alto contenido de sal que presentan, el cual además puede provocar interferencias en la etapa de medida instrumental.

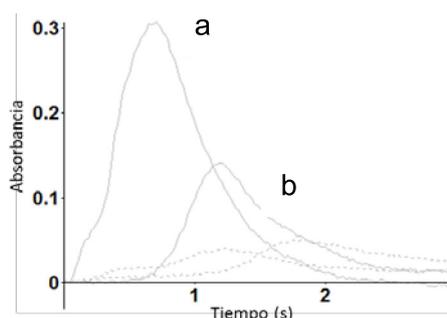


Figura VIII. Señales registradas al determinar Pb en muestras de microalga: (a) lavada y (b) sin lavar (línea continua: señal atómica, línea de puntos: absorción de fondo).

Se determinó la pérdida de masa al lavar con agua ultrapura tres alícuotas de microalgas, obteniendo un valor medio del $(57,7 \pm 4,3)$ %. En la **Figura IX** se observan los cristales de sal, cloruro de sodio, en la superficie de la muestra de microalgas no lavada, después de su filtración y secado.

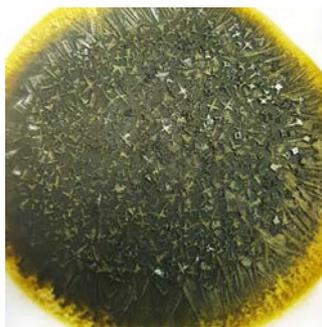


Figura IX. Cristales de cloruro de sodio en la superficie de una muestra filtrada y seca de microalgas *Isochrysis T-ISO* no lavada.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la necesidad de un lavado previo, por lo que a continuación se compara el uso de agua ultrapura y formiato de sodio al 1 %, como líquidos de lavado, empleando el procedimiento descrito en el apartado 3.3.1. Este último reactivo se selecciona, de acuerdo con la bibliografía consultada (Zhu y Lee, 1997) frente a otras opciones, como el cloruro de sodio o el bicarbonato de amonio. Al realizar el lavado con formiato de sodio (1%) se registró una pérdida de masa ($34,2\% \pm 0,1\%$) considerablemente menor que el obtenido con agua ultrapura. Además, el uso de este reactivo de lavado proporciona una mayor precisión (0,3 % con respecto a 7,4 %, expresados como DER). El motivo de estos resultados parece ser debido a que el agua puede romper la pared celular de las microalgas, lo que incrementa la pérdida de masa y puede alterar el contenido de plomo de la muestra. Sin embargo, esto no ocurre con el formiato de sodio ya que proporciona una presión osmótica similar a la del agua de mar (Zhu y Lee, 1997).

Una vez seleccionado el formiato de sodio (1 %) como líquido de lavado, se estudia el número de lavados que son necesarios. Para ello se utilizaron varias porciones de microalgas donde unas se lavaron una vez y otras dos veces. En ninguno de los casos se observaron depósitos de sal, y se comprobó que no había diferencias significativas en la pérdida de masa después del segundo lavado por lo que se concluyó que solo es necesario lavar una vez las muestras de microalgas con formiato de amonio al 1 %.

4.1.2. Nidos de avispas velutinas

Las muestras previamente seleccionadas se someten a un proceso de secado,

determinando la humedad de las mismas. Para ello se extiende cada muestra sobre papel de filtro parafinado y se meten en una estufa a 60 °C durante 24 h. Después se dejan en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente y se pesan en balanza analítica. Se vuelven a introducir en la estufa otras 24 h y se repite el proceso dos veces más (hasta completar 72 h de secado). Se comprueba que se requieren 72 h de secado para alcanzar un peso constante de las muestras, obteniendo un error relativo inferior al 1 % referenciado como aceptable. Por lo que se fija este tiempo para el secado de las muestras de nidos. Se obtiene un valor medio de humedad del 5,6 %.

A continuación se reduce el tamaño de partícula de las muestra secas triturándolas en una picadora de uso doméstico y a continuación se molturan en un mortero de ágata. Se comprobó que en ambos casos fue necesaria la adición de nitrógeno líquido para mantener la muestra congelada durante su trituración y así conseguir una molturación eficaz debido a la dificultad para romper las fibras vegetales del material de los nidos.

Inicialmente se prepararon suspensiones de muestras de nidos así obtenidas directamente en el cubilete del automuestreador, empleando como fase líquida una disolución diluida de HNO₃ y Tritón® X-100. En todos los ensayos previos realizados las señales atómicas registradas, tanto sin como con modificador químico (Pd), fueron despreciables frente a las señales de absorción molecular. Esto es debido al bajo contenido de Pb de las muestras así como al alto contenido orgánico de este tipo de matriz.

Por este motivo se opta por calcinar las muestras a fin de eliminar la materia orgánica de las mismas y concentrar el contenido del analito. Se emplea el programa de temperaturas de calcinación recogido en la **Tabla V** y con las cenizas obtenidas se preparan las suspensiones, las cuales presentan un aspecto homogéneo. Los ensayos previos realizados al analizar estas suspensiones permitieron comprobar que las señales atómicas y de fondo registradas eran adecuadas para el posterior análisis, sin necesidad de emplear modificador químico.

4.2. Estudio de las condiciones de la preparación de la suspensión

El estudio de las condiciones de preparación de la suspensión se realizó con muestras de microalgas. Las variables que se estudiaron son la cantidad de muestra pulverizada para preparar la suspensión y el contenido de tensoactivo, Tritón®X-100, y de ácido

nítrico en la fase líquida.

4.2.1. Cantidad de la muestra

La cantidad de muestra que se utiliza para preparar las suspensiones debe oscilar entre un valor mínimo que proporcione señales atómicas significativas y un valor máximo que permita obtener un pipeteo eficiente y reproducible de la alícuota que se introduce en el atomizador. Los ensayos previos realizados en la preparación de las suspensiones de microalgas permitieron concluir que masas en el intervalo 20 - 40 mg proporcionaban resultados satisfactorios. En el caso de las cenizas de los nidos se reduce este rango entre 5 y 10 mg.

4.2.2. Concentración de tensoactivo Tritón X-100

El análisis directo en forma de suspensiones requiere el empleo de una fase líquida para suspender la muestra sólida, que ha de estar finamente pulverizada. Esta fase líquida suele estar formada por un ácido diluido y otros reactivos auxiliares, como es el caso del tensoactivo Tritón®X-100. Su función es favorecer la humectación de las partículas e incrementar la viscosidad para mejorar la homogeneidad de la suspensión y así obtener mayor precisión en la medida instrumental. En este estudio se considera necesario su empleo. Para evaluar la cantidad de Tritón® X-100 adecuada se fija la concentración de ácido nítrico utilizado como fase líquida en 1 % (v/v), de acuerdo a estudios previos realizados en el grupo de investigación de QANAP al analizar muestras de interés ambiental en forma de suspensiones para la determinación de otros analitos (Sb, Co, Cr, etc.) (M. Felipe-Sotelo, 2005).

Se ensayan cantidades crecientes del tensoactivo: 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 y 0,8 expresadas en % m/v. En la **Figura X** se representan el área y la altura de las señales atómicas obtenidas cuando se analizan por triplicado suspensiones de microalga con las distintas cantidades de tensoactivo ensayadas. La desviación estándar (DE) está representada con una barra de error en cada columna. Se observa que a valores bajos de tensoactivo las absorbancias registradas son ligeramente mayores y con una dispersión mayor. Para contenidos entre 0,2 % y 0,6 % de tensoactivo se registran señales atómicas del Pb muy similares, si bien la desviación estándar relativa (DER) para las señales en área y altura es menor en presencia de 0,6 %. Y en presencia de

un 0,8 % la señal disminuye ligeramente, y aumenta la DER. Por esta razón, se selecciona la concentración del 0,6 % como la óptima para la preparación de las suspensiones.

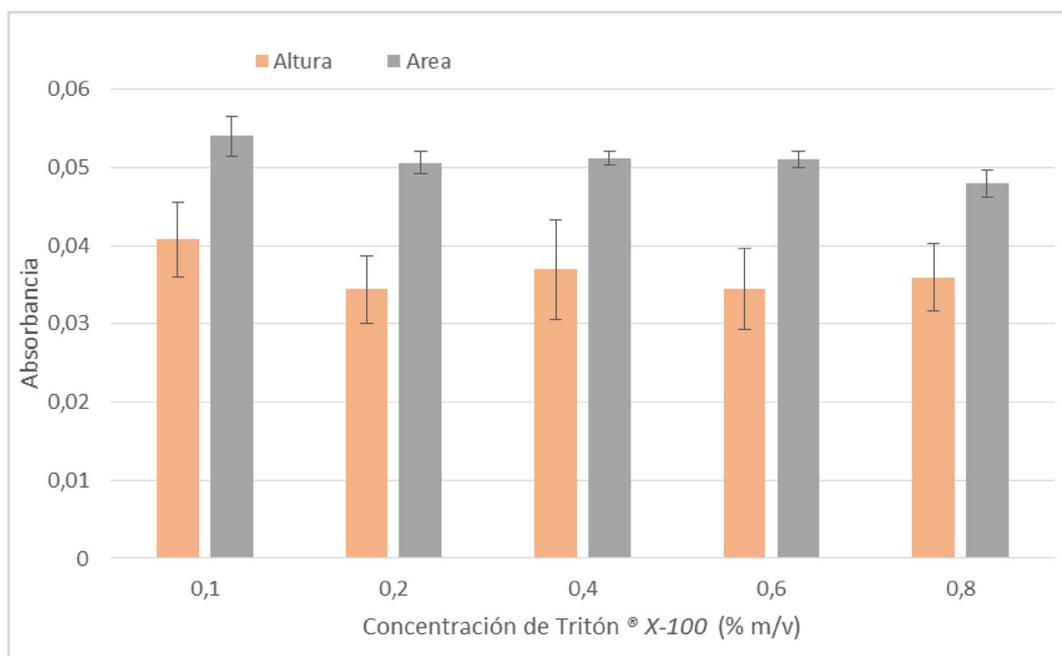


Figura X. Señales registradas para el Pb en la suspensión de microalgas ($n = 3$), en área y altura de pico, en función del contenido de Tritón® X-100 (% m/v).

4.2.3. Concentración de ácido nítrico

El empleo de ácido nítrico en la fase líquida de las suspensiones favorece la extracción del analito a partir de las partículas sólidas lo que mejora la precisión del análisis. Pero la cantidad de ácido utilizada afecta no solo a la precisión de los resultados, sino también a la magnitud de los valores de absorbancia y de señal de fondo obtenidos. Con la concentración de tensoactivo fijada, se estudia la cantidad de HNO_3 en el siguiente rango: 0,1; 0,5; 1,0; 1,5 y 2,0, expresada en % (v/v). En la **Figura XI** se muestran las señales registradas para el Pb y para la absorción del fondo obtenidas al analizar suspensiones de microalgas ($n = 3$) con las distintas cantidades de ácido ensayadas. La precisión en la medida se denota por las barras de error en cada una de las columnas. La señal atómica aumenta ligeramente hasta un contenido de ácido nítrico de 1,5 %, obteniéndose sin embargo una DER más baja para un contenido del 2,0 %. Por otro lado se observa un aumento moderado de la señal de fondo al aumentar la concentración de ácido. Teniendo en cuenta estos resultados se selecciona como concentración óptima de ácido nítrico 1,5 %, a pesar de presentar

una mayor dispersión en la medida que la obtenida con 2 % (DER aceptable de 5,7 % frente a 1,9 %), ya que esta concentración de ácido provoca un aumento considerable de la señal de fondo. Esto se debe a que una mayor concentración de ácido no solo favorece la solubilización del analito sino también la de la matriz, provocando una mayor absorción molecular.

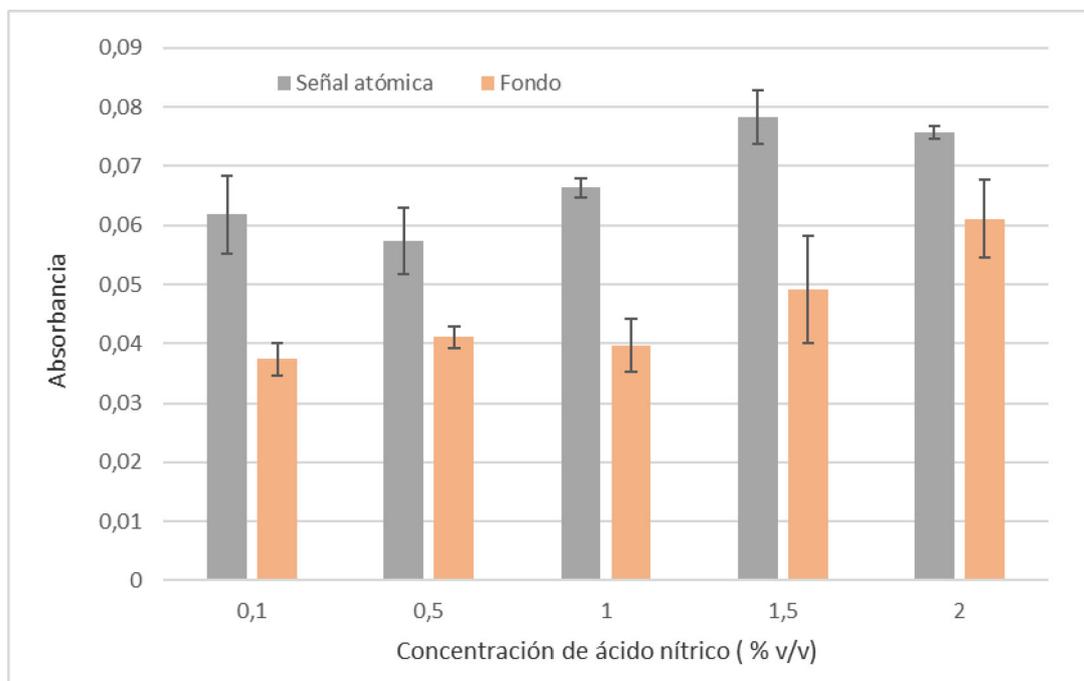


Figura XI. Señales registradas para el Pb y su fondo para la suspensión de microalgas ($n = 3$), en área de pico, en función del contenido de HNO_3 (% v/v).

En la **Figura XII.a** se muestra el perfil atómico y la absorción de fondo registrados al analizar una suspensión de microalgas preparada en las condiciones optimizadas, 0,6 % de Tritón® X-100 y 1,5 % de HNO_3 .

Estos mismos estudios se llevaron a cabo para la preparación de las suspensiones de las cenizas de nidos de avispa. Los resultados mostraron que no había diferencias significativas entre las señales atómicas y de fondo registradas para los contenidos de Tritón® X-100 ensayados, seleccionando el contenido mínimo del 0,1 % (m/v). En el caso del ácido nítrico, el valor óptimo fue del 1 % (v/v). En estas condiciones se obtiene un buen perfil atómico y una insignificante señal de fondo (**Figura XII.b**) gracias a la eliminación previa de la matriz orgánica de la muestra al calcinarla. Por lo cual también se requieren concentraciones menores de ácido y tensoactivo.

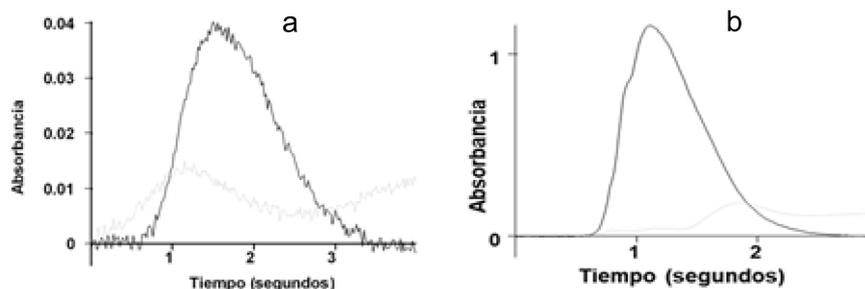


Figura XII. Señales atómica (negro) y de fondo (gris) registradas en las condiciones seleccionadas para una suspensión de: (a) microalgas (1,5 % HNO_3 + 0,6 % Tritón® X-100) y (b) ceniza de nido de avispa (1 % HNO_3 + 0,1 % Tritón® X-100).

4.3. Programa de temperaturas del horno de grafito

Las temperaturas y tiempos del programa de atomización para la determinación de Pb por ETAAS se estudian analizando las suspensiones de microalgas y de las cenizas de los nidos. Para ello se inyectan en el tubo de grafito 4 μL de la suspensión fijando el volumen total de inyección en 20 μL , utilizando HNO_3 0,5% (v/v) como diluyente.

Se estudia también el empleo de dos modificadores químicos ampliamente recogidos en la bibliografía para la determinación de Pb, como son el paladio (Bermejo-Barrera et al., 1996) y el dihidrógenofosfato amónico (Yu et al., 1990). Como la validez de cada modificador depende de la naturaleza de la muestra, los modificadores se estudiaron para asegurar su viabilidad.

La función de este tipo de modificadores es permitir incrementar la temperatura de calcinación al formar especies de plomo estables y de esta forma conseguir que la matriz de la muestra se destruya completamente (Volynskii, 2003). Los modificadores de fosfato amónico forman fácilmente fosfatos no volátiles e insolubles con muchos metales. Además, el modificador introduce un proceso de intercambio de cationes con el amonio para facilitar la eliminación del cloro en la etapa de pirólisis, en la que los cloruros son una de las interferencias de la matriz más comunes que se conocen en esta técnica. En cuanto al paladio, tanto solo como mezclado con otros reactivos, se ha demostrado que proporciona la estabilización térmica de los metales en la etapa de pirólisis siendo considerado como un modificador químico universal. En el estudio realizado por Borges et al. (2014) se comparan las capacidades de los modificadores químicos Pd / Mg, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ y NH_4NO_3 / Pd para analizar Pb en muestras de

fertilizantes y piedra caliza. El modificador Pd / Mg proporciona la sensibilidad más alta y presenta una mejor relación señal/ruido que el formado por la mezcla NH_4NO_3 / Pd. El $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ se descarta debido a las grandes interferencias espectrales. En el caso del trabajo de Török y Žemberyová (2012) comparan el Pd, Pd / $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, Pd / NH_4NO_3 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ y $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ / $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ para la determinación de los metales Cd, Cu y Zn en muestras de comida. Los resultados confirman la aplicabilidad del Pd como modificador para la determinación de Cd, Cu y Zn. En el caso del Cd es preferible la adición de NH_4NO_3 ya que aumenta la robustez del método al disminuir la interferencia de los haluros.

La primera etapa de un programa de temperaturas del horno de grafito es la de secado. En este trabajo, se fijan dos etapas de secado a 100 °C y 130 °C, respectivamente. Este proceso se realiza en dos pasos para que el secado se produzca de manera gradual y uniforme, lo cual se comprueba visualmente. La siguiente etapa es la pirólisis o calcinación, en la que se destruye la mayor parte de la matriz de la muestra mediante su oxidación por calentamiento. En la etapa de atomización se atomiza el analito en ausencia de interferentes y finalmente se incluye una etapa de limpieza para eliminar restos de analito y matriz que hayan quedado en el atomizador. Las condiciones óptimas se seleccionaron considerando la reproducibilidad de las señales atómicas, los perfiles atómicos y las señales de absorción de fondo.

4.3.1. Microalga marina *Isochrysis* T-ISO

En ausencia de modificador químico

Para estudiar la temperatura de calcinación se construye la curva de calcinación, registrando los valores de absorbancia para diferentes temperaturas, entre 200 °C y 1000 °C. Se fija la temperatura de atomización en 1500 °C. Los resultados se muestran en la **Tabla VII** y se representan en la **Figura XIII**. Las señales obtenidas para temperaturas de calcinación menores de 700 °C son más bajas que las obtenidas a partir de ese valor, probablemente debido a que la temperatura de calcinación no es suficientemente alta para eliminar la matriz completamente, y se producen interacciones del Pb con los componentes de la matriz no eliminados que provocan una atomización ineficiente. El valor máximo de señal se obtiene para 700 °C y para temperaturas mayores disminuye significativamente la señal atómica, lo que implica

que parte del Pb se está volatilizando antes de la etapa de atomización. Se selecciona por tanto como temperatura óptima 700 °C.

La curva de atomización se construye en el intervalo de temperaturas de 1100 °C a 2100 °C, fijándose la temperatura de calcinación en 700 °C. En la **Tabla VII** se recogen los resultados obtenidos, con los que se construye la curva de atomización (**Figura XIII**). Se observa que a temperaturas inferiores a 1500 °C no se consigue la completa atomización del Pb y a temperaturas superiores a 1700 °C disminuye la señal registrada en área de pico debido a un estrechamiento excesivo del mismo, lo que empeora la reproducibilidad de la señal. Se escoge por tanto como temperatura de atomización óptima 1600 °C.

Tabla VII. Variación de la absorbancia del Pb en función de las temperaturas de calcinación y de atomización, sin modificador químico.

Etapa de Calcinación									
Temperatura (°C)	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
Absorbancia	0,070	0,081	0,079	0,084	0,090	0,092	0,076	0,040	0,014

Etapa de Atomización								
Temperatura (°C)	1100	1300	1500	1600	1700	1800	1900	2100
Absorbancia	0,034	0,067	0,100	0,103	0,099	0,077	0,064	0,041

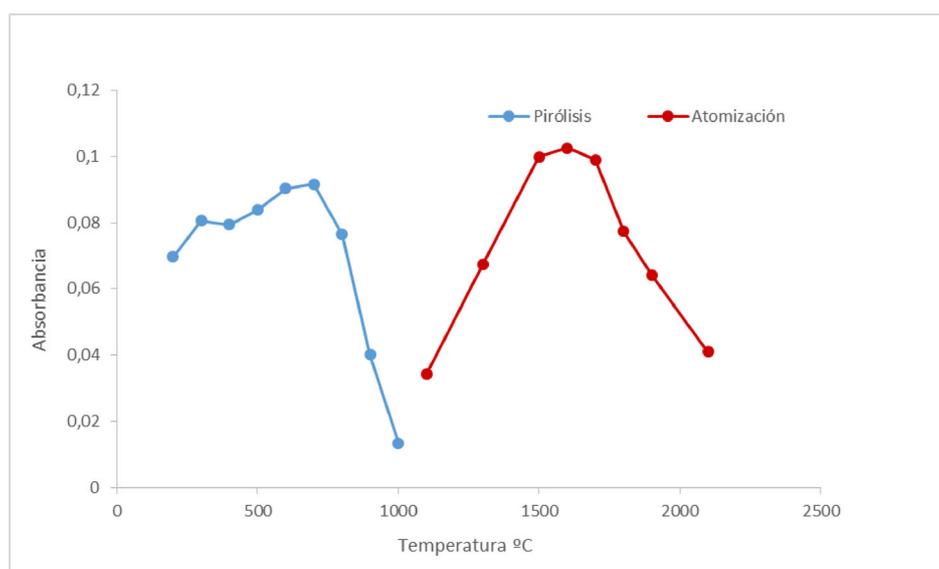


Figura XIII. Curvas de calcinación y atomización para suspensiones de microalgas sin modificador químico.

En presencia de modificador químico

Las señales registradas sin modificador proporcionaron bajas absorbancias atómicas, señales de fondo altas y dispersión en las repeticiones de las medidas. Teniendo en cuenta estos datos se estudió el empleo de dos modificadores: el paladio y el dihidrógenofosfato amónico.

En el caso del paladio se añaden en el tubo de grafito 4 μ L de una disolución de Pd de 1000 mg/L y se construye la curva de calcinación registrando las señales de absorbancia para los valores de temperatura entre 200 °C a 1200 °C. Se fija la temperatura de atomización en 1500 °C. Los resultados se muestran en la **Tabla VIII** y se representan en la **Figura XIV**. Las señales obtenidas para temperaturas de calcinación menores de 800 °C son más bajas que las obtenidas a partir de ese valor, de forma similar a lo que ocurría sin modificador químico, lo que puede ser debido, como ya se ha comentado, a que la temperatura de calcinación no es suficientemente alta para eliminar la matriz completamente lo que provoca una atomización ineficiente. A partir de 800 °C la señal aumenta y se mantiene constante hasta 1100 °C, y a temperaturas superiores a 1200 °C disminuye drásticamente (casi la mitad), lo que implica que gran parte del Pb se está volatilizando antes de la etapa de atomización. Se seleccionan por tanto 1100 °C como temperatura óptima de calcinación.

La curva de atomización se construye utilizando el intervalo de temperaturas entre 1200 °C y 2100 °C, fijando la temperatura de calcinación en 1100 °C. En la **Tabla VIII** se recogen los resultados obtenidos, con los que se construye la curva de atomización (**Figura XIV**). Se observa que a temperaturas inferiores a 1300 °C no se consigue la completa atomización del Pb y a temperaturas superiores a 1600 °C disminuye la señal registrada en área de pico debido, como ya se ha comentado en ausencia de modificador químico, a un estrechamiento excesivo del mismo, lo que empeora la reproducibilidad de la señal. Por ello se escoge como temperatura óptima de atomización 1500 °C.

Tabla VIII. Variación de la absorbancia del Pb en función de las temperaturas de calcinación y de atomización, utilizando paladio como modificador químico.

Etapa de Calcinación									
Temperatura (°C)	400	500	600	700	800	900	1000	1100	1200
Absorbancia	0,082	0,094	0,101	0,107	0,124	0,123	0,123	0,124	0,068

Etapa de Atomización								
Temperatura (°C)	1200	1300	1500	1600	1700	1800	1900	2100
Absorbancia	0,008	0,089	0,119	0,114	0,097	0,076	0,057	0,038

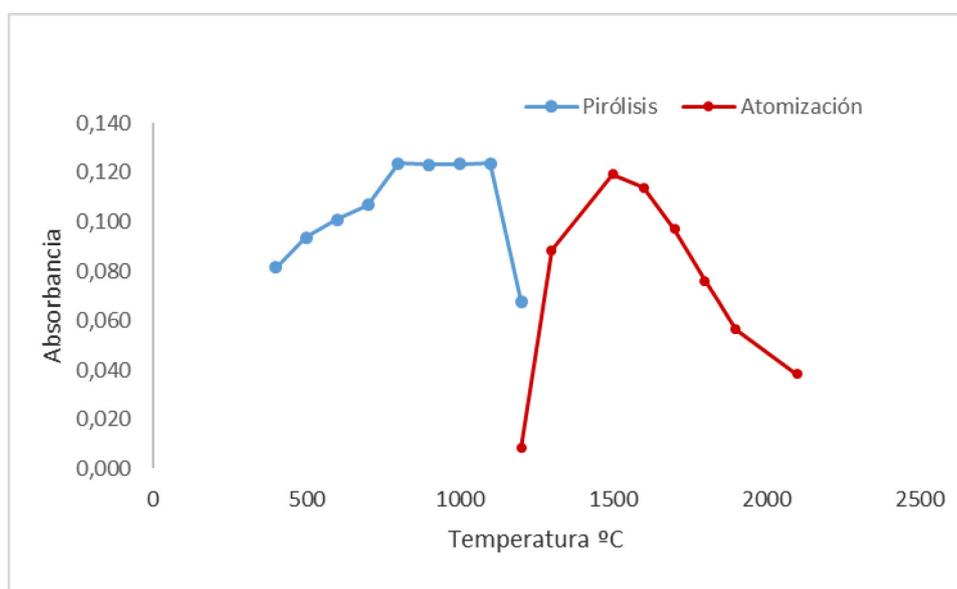


Figura XIV. Curvas de calcinación y atomización para suspensiones de microalgas con paladio como modificador químico.

En el caso del dihidrógenofosfato amónico se añadieron en el tubo de grafito 4 μ L de una disolución al 2 % (m/v). La curva de calcinación se construye con las señales de absorbancia registradas para los valores de temperatura entre 200 °C y 1100 °C. Se fija la temperatura de atomización en 1500 °C. Los resultados se muestran en la **Tabla IX** y se representan en la **Figura XV**. Se observa que a partir de 1000 °C disminuye la señal atómica lo que implica que parte del analito se está volatilizando antes de la etapa de atomización, por lo tanto se selecciona 900 °C como temperatura óptima de calcinación.

Se construye la curva de atomización utilizando el intervalo de temperaturas entre 1200 °C y 2100 °C, fijando la temperatura de calcinación en 900 °C. En la **Tabla IX** se recogen los resultados obtenidos, con los que se construye la curva de atomización (**Figura XV**). Se observa que la máxima señal se obtiene para 1500 °C, y que a temperaturas inferiores a 1300 °C no se consigue la completa atomización del Pb y a temperaturas superiores a 1600 °C disminuye la señal registrada, como consecuencia del estrechamiento del pico atómico. Por lo tanto la temperatura óptima de atomización es 1500 °C.

Tabla IX. Variación de la absorbancia del Pb en función de las temperaturas de calcinación y de atomización, utilizando dihidrógenofosfato amónico como modificador químico.

Etapa de Calcinación										
Temperatura (°C)	300	400	500	600	700	800	900	1000	1100	
Absorbancia	0,109	0,096	0,110	0,124	0,121	0,120	0,127	0,120	0,066	

Etapa de Atomización									
Temperatura (°C)	1200	1300	1500	1600	1700	1800	1900	2100	
Absorbancia	0,085	0,114	0,137	0,121	0,095	0,070	0,042	0,035	

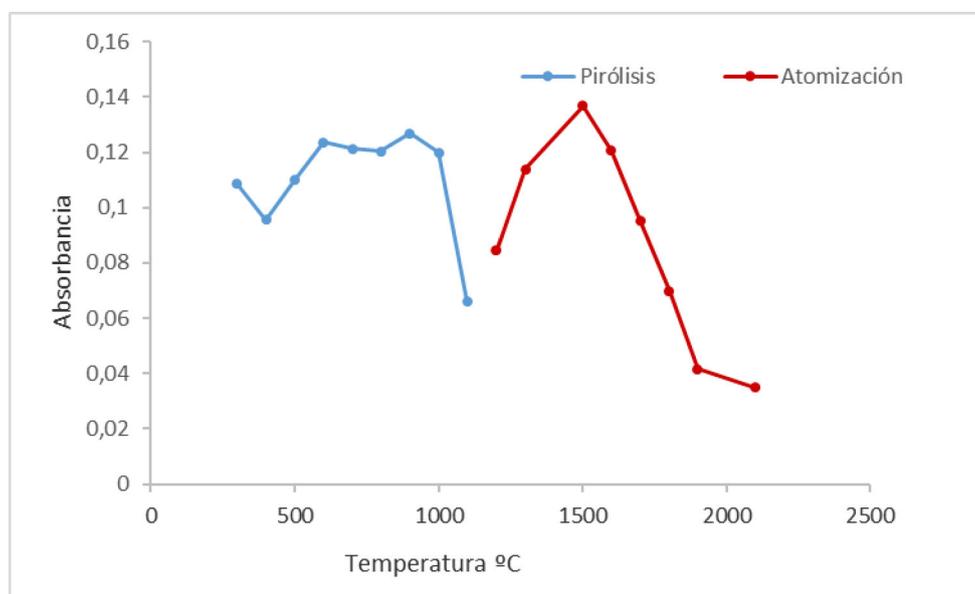


Figura XV. Curvas de calcinación y atomización para suspensiones de microalgas con dihidrógenofosfato amónico como modificador químico.

A la vista de los resultados obtenidos en el estudio de las temperaturas del programa de atomización se concluye que es necesaria la utilización de un modificador químico,

porque tanto el paladio como el dihidrógenofosfato amónico estabilizan al Pb a temperaturas de calcinación más altas que cuando se produce la atomización en ausencia de modificador. Pero en el caso del paladio la temperatura de mineralización óptima es de 1100 °C frente a 900 °C con dihidrógenofosfato amónico, por lo que el paladio es el modificador seleccionado para realizar la determinación de Pb en muestras de microalgas.

4.3.2. Nidos de avispas velutinas

Las pruebas preliminares mostraron que en ausencia de modificador químico se obtenían valores de absorbancia apreciables con perfiles atómicos adecuados y señales de fondo no significativas. Por lo que se decidió hacer el estudio del programa de atomización en estas condiciones. En el caso de las suspensiones de los nidos calcinados se fijaron igualmente dos etapas de secado a 100 °C y 130 °C, respectivamente.

La curva de calcinación se construye registrando los valores de absorbancia para diferentes temperaturas entre 200 °C y 1000 °C. Se fija la temperatura de atomización en 1800 °C. Los resultados se muestran en la **Tabla X** y se representan en la **Figura XVI**.

Tabla X. Variación de la absorbancia del Pb en función de las temperaturas de calcinación y de atomización, sin modificador químico.

<i>Etapas de Calcinación</i>									
<i>Temperatura (°C)</i>	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
<i>Absorbancia</i>	0,174	0,177	0,172	0,167	0,161	0,155	0,134	0,086	0,043

<i>Etapas de Atomización</i>									
<i>Temperatura (°C)</i>	1000	1100	1200	1300	1400	1500	1600	1700	1800
<i>Absorbancia</i>	0,062	0,105	0,190	0,290	0,289	0,279	0,262	0,216	0,173

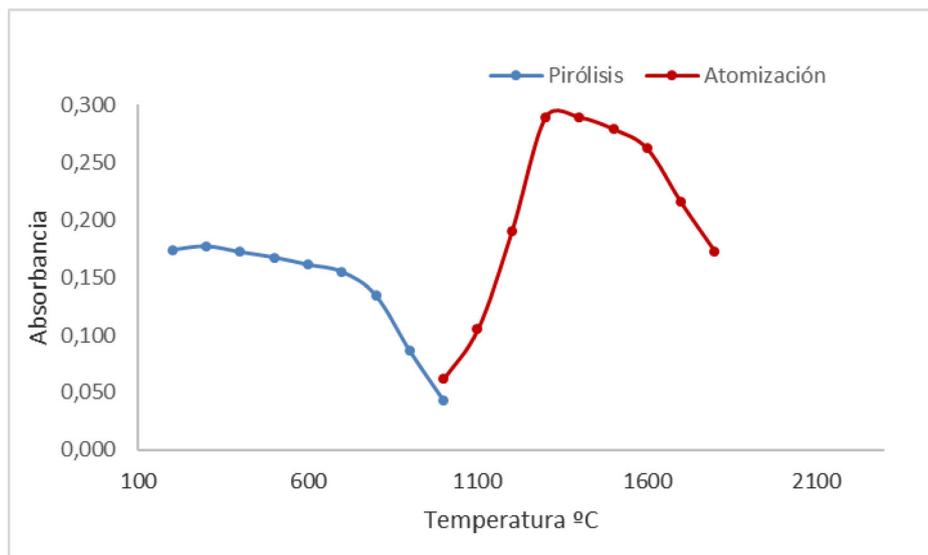


Figura XVI. Curvas de calcinación y atomización para una suspensión de nidos de avispas asiáticas calcinadas.

Se observa que a temperaturas mayores de 400 °C disminuye ligeramente la señal atómica, por lo que se selecciona este valor como temperatura óptima de calcinación, ya que además se obtiene un perfil del pico atómico más simétrico (**Figura XVII**). El fondo se mantiene constante y con valores despreciables en todos los casos.

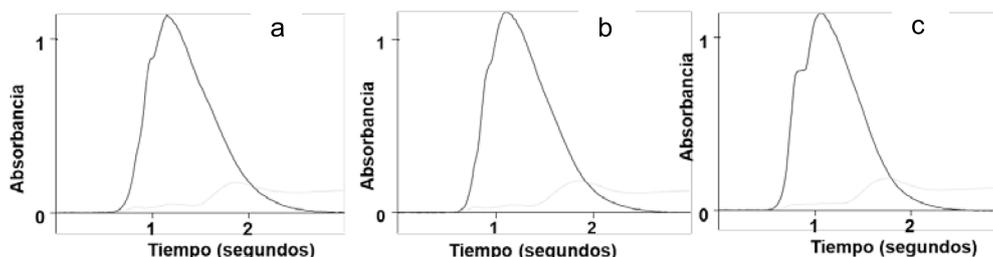


Figura XVII. Señales obtenidas para una suspensión de nidos de avispas asiáticas calcinadas para una temperatura de pirólisis de: (a) 300 °C, (b) 400 °C y (c) 500 °C.

La curva de atomización se construye en el intervalo de temperaturas de 1000 °C a 2200 °C, fijándose la temperatura de calcinación en 400 °C. En la **Tabla X** se recogen los resultados de absorbancia obtenidos con los que se construye la curva de atomización (**Figura XVI**). El valor máximo de absorbancia se obtiene para 1300 °C y 1400 °C, sin embargo a estas temperaturas, tal como se observa en la **Figura XVIII-a**, el perfil del pico atómico es muy irregular y la atomización se retrasa, con lo que el

pico atómico no aparece completo en los 3 s fijados para la etapa de atomización. Esto es debido a que a temperaturas tan bajas la atomización del Pb se produce de forma irregular y provoca además una dispersión importante en las medidas de absorbancia. A partir de 1500 °C la absorbancia disminuye ligeramente y a partir de 1700 °C las señales disminuyen, pero tanto el perfil del pico atómico como la precisión en la medida mejoran considerablemente (**Figura XVIII-b**). Teniendo en cuenta estos resultados así como el perfil del pico y el valor de la absorbancia, se selecciona 1800 °C como la temperatura óptima para la atomización.

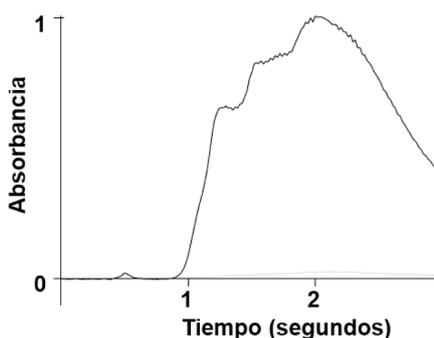


Figura XVIII-a. Señal obtenida para una suspensión de nidos de avispas asiáticas calcinadas, temperatura de atomización de 1300 °C.

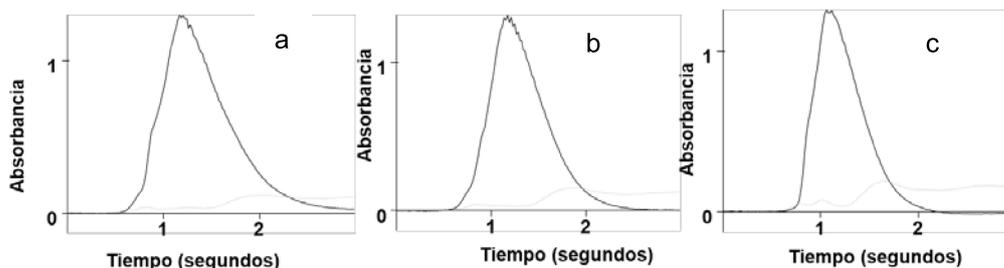


Figura XVIII-b. Señales obtenidas para una suspensión de nidos de avispas asiáticas calcinadas a una temperatura de atomización de: (a) 1700°C, (b) 1800°C y (c) 1900°C.

4.4. Validación del método analítico.

En química analítica se utiliza la validación para demostrar que un método es lo suficientemente consistente y confiable antes de que se pueda utilizar para el análisis de las muestras. Para ello se llevan a cabo diferentes ensayos, evaluando los

siguientes parámetros de desempeño: linealidad e intervalo de trabajo, estudio del efecto matriz, sensibilidad, LOD y LOQ, precisión y exactitud.

Intervalo lineal y evaluación del efecto matriz

La linealidad de un método analítico es la capacidad para obtener resultados procedentes de los ensayos que sean proporcionales a la concentración de analito en las muestras en un intervalo determinado, que denominamos intervalo lineal. Entre los dos extremos de este intervalo se pueden garantizar resultados con una precisión, exactitud y linealidad adecuadas. Como criterio de aceptación de la linealidad utilizaremos un valor de regresión lineal mínimo de $R^2 \geq 0,99$.

Experimentalmente, se prepararon disoluciones patrón de Pb de concentraciones crecientes hasta 130 $\mu\text{g/L}$ y se representó la absorbancia obtenida, en el eje de abscisas, frente a la concentración, en el eje de ordenadas (**Figura XIX**). Generalmente la relación entre estas dos variables es lineal hasta un determinado valor de la concentración del analito y responde a la ecuación: $y = bx + a$, donde el factor de proporcionalidad es la pendiente b. A continuación se obtiene, mediante mínimos cuadrados, la recta de regresión que mejor se ajusta a los puntos experimentales, la cual constituye la recta de calibrado. El coeficiente de determinación (R^2) obtenido es mayor de 0,99 por lo que el intervalo es lineal. No obstante, a partir de 60 $\mu\text{g/L}$ la señal tiende a disminuir progresivamente, estableciéndose un rango de trabajo de 0 a 50 $\mu\text{g/L}$.

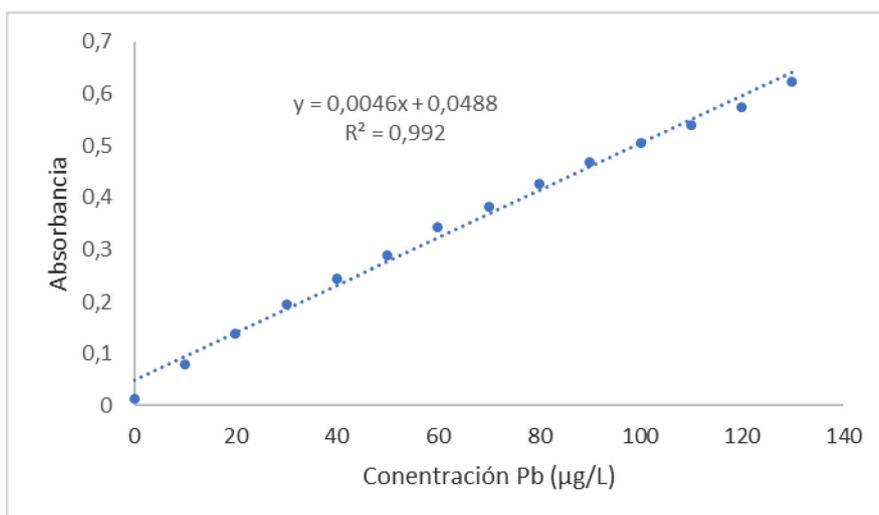


Figura XIX. Recta de calibrado.

Cuando se analizan matrices complejas, es necesario evaluar el efecto que tienen todos los componentes de la muestra en la respuesta analítica del analito. Para comprobar este efecto matriz se realiza una comparación entre las pendientes de la recta de calibrado externo y la de adiciones estándar. Ésta se ha obtenido adicionando a cada disolución del calibrado un pequeño volumen fijo de la disolución de la muestra. Para llevar a cabo la comparación de las pendientes es necesario realizar una comprobación previa de si los errores promedio de los dos ajustes son comparables (mediante un test F). A continuación la comparación de las pendientes de las dos rectas se realiza mediante un test t . En la **Figura XX** se muestran la recta de calibrado y las rectas de adición obtenidas para suspensiones de algas y de nidos calcinados.

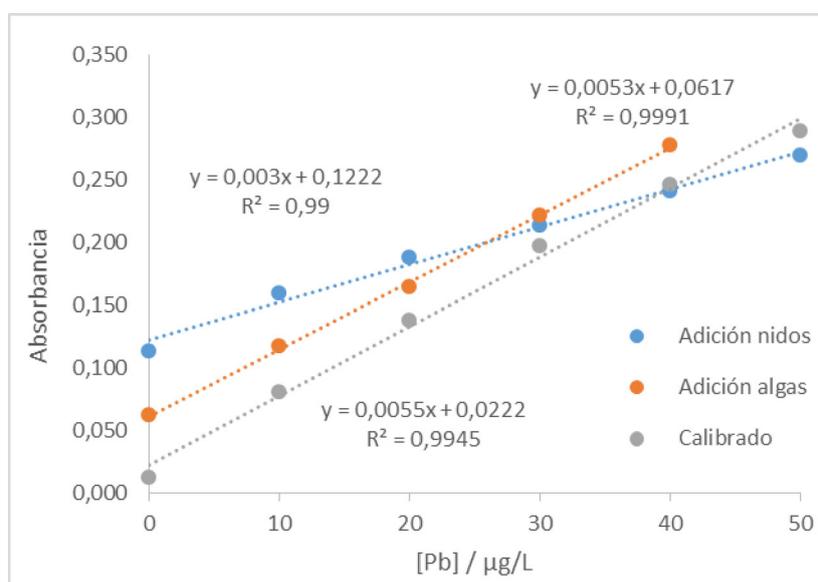


Figura XX. Recta de calibrado y rectas de adición obtenidas para suspensiones de algas y de nidos calcinados.

Con los resultados obtenidos se comprobó que las pendientes de las rectas de calibrado y adición para las algas son similares, por lo que la cuantificación de Pb en este tipo de muestras se llevará a cabo empleando el calibrado con patrones acuosos. Para las muestras de los nidos ambas pendientes no fueron comparables por lo que para la determinación de Pb en las cenizas de los nidos se utilizará método de adiciones estándar.

Sensibilidad

La sensibilidad de un método analítico mide la variación de respuesta de un instrumento en función de la magnitud medida. Cuando empleamos la calibración,

viene dada por la variación de la señal en función de la concentración del analito y normalmente se expresa como la pendiente de la recta de calibrado. Se obtuvo un valor de $5,3 \times 10^{-3}$ uA / $\mu\text{g/L}$ para la determinación de Pb en microalgas marinas y de $3,0 \times 10^{-3}$ uA / $\mu\text{g/L}$ para los nidos de velutinas.

Los límites de detección y cuantificación son parámetros también utilizados para evaluar la sensibilidad. El límite de detección (LOD) se corresponde con la menor concentración de analito que puede detectarse a un nivel de confianza dado y el límite de cuantificación (LOQ) con la menor concentración de analito que puede cuantificarse con fiabilidad. Se calculan mediante las siguientes ecuaciones:

$$LOD = \frac{a + 3S_a}{b}$$

$$LOQ = \frac{a + 10S_a}{b}$$

Donde a es la ordenada en el origen de la recta, S_a el error de la ordenada del origen y b la pendiente.

Para la determinación de Pb en **microalgas** se alcanza un LOD instrumental de 1,25 $\mu\text{g/L}$ y de 0,32 $\mu\text{g/g}$ para el método, teniendo en cuenta todo el procedimiento a que se someten las muestras para su análisis. El LOQ instrumental obtenido fue 4,18 $\mu\text{g/L}$ y para el del método 1,05 $\mu\text{g/g}$.

El LOD instrumental obtenido en la determinación de Pb en las muestras de **nidos** fue de 3,70 $\mu\text{g/L}$ y el del método 0,33 $\mu\text{g/g}$. Para el LOQ se obtuvieron valores de 12,32 $\mu\text{g/L}$ para el instrumental y de 1,09 $\mu\text{g/g}$ para el método.

En la bibliografía encontramos valores de LOD entre 0,238 - 4,572 $\mu\text{g/g}$ para muestras vegetales (Alushllari & Civici, 2014), 0,1 $\mu\text{g/g}$ para suelos, lodos y sedimentos (Savio et al., 2010) y 0,06 $\mu\text{g/g}$ y 0,07 $\mu\text{g/g}$ para plantas macrófitas y moluscos (Conti & Cecchetti, 2003).

Cuando se emplea la técnica ETAAS, la sensibilidad se puede evaluar también con la masa característica, que se define como la masa de analito que produce una señal de absorbancia de 0,0044 uA. Dicho parámetro se calcula utilizando la ecuación:

$$m_0 = \frac{C \cdot V_m \cdot 0,0044}{A_c - A_b}$$

Donde C es la concentración en µg/L, V_m es el volumen de la muestra en µL, A_c es absorbancia de la muestra y A_b la absorbancia del blanco.

Para las algas se obtuvo un valor medio para los diferentes niveles de concentración de (16,57 ± 0,44) pg. Y para los nidos ese valor es (25,52 ± 4,96) pg. En estudios como el de Kazi et al. (2009) donde se analizaron muestras biológicas se obtuvo un valor medio de 38 pg.

Precisión

La precisión indica el grado de concordancia entre los resultados obtenidos para diferentes réplicas de una misma muestra, obtenidos en las mismas condiciones. En este trabajo se estudió la precisión de la medida para diferentes niveles de concentración (n = 3), calculando la desviación estándar relativa (DER) también llamado coeficiente de variación (CV), con la siguiente ecuación:

$$DER = \frac{DE}{x} \cdot 100$$

Donde *DE* es la desviación estándar y *x* el valor medio de las señales de absorbancia.

En este estudio se evaluó la precisión en términos de repetibilidad, a dos niveles de concentración diferentes, bajo y alto. Y se toma como criterio de aceptación una DER ≤ 10 %.

En el análisis de microalgas se obtuvieron valores que oscilaron entre 1,5 y 3,5 %, y ligeramente mayores al analizar los nidos 0,6 – 6,8 %. En ambos casos, la precisión es muy satisfactoria. Otros autores, como Savio et al. (2010) y Kazi et al. (2009), obtuvieron valores superiores al 8,2 % para muestras de sedimentos, lodos y suelos y valores entre 1,2 % - 6,4 % para muestras biológicas.

La precisión del procedimiento se estudió en condiciones idénticas de equipo, analista y laboratorio pero no de tiempo. De tal forma que se evalúa en términos de precisión

intermedia, para las dos matrices estudiadas. Se analizaron 6 alícuotas de la microalga *Isochrysis T-ISO*, de una muestra de nido de velutina y de los materiales certificados *Peach leaves GBW 08501* (hojas de melocotonero) e *Interlab VL 93-690*, material vegetal de un ejercicio interlaboratorio. Los valores de DER obtenidos se encuentran en torno al valor del criterio de aceptación (10 %) e incluso por debajo del 5 % para el material *GBW 08501* (**Tabla XI**).

Tabla XI. Precisión intermedia obtenida en el análisis de las muestras (n = 6).

Concentración de Pb (µg/g)			
Microalgas	Nidos de avispa	Interlab VL 93-690	GBW 08501 <i>Peach leaves</i>
X = 1,48	X = 2,20	X = 10,14	X = 1,15
DE = 0,16	DE = 0,09	DE = 1,02	DE = 0,05
DER = 11,0 %	DER = 3,9 %	DER = 10,1 %	DER = 4,6 %

Exactitud

La exactitud se define como la proximidad o concordancia entre el valor promedio de una serie de resultados y el valor de referencia que se acepta como verdadero. Siempre que es posible se utilizan materiales de referencia certificados, calculando la recuperación del analito de la siguiente forma:

$$\% R = \frac{C_c}{\mu} \cdot 100$$

Donde C_c es la concentración calculada y μ es el valor certificado.

En el caso de no disponer de dichos materiales certificados se evalúa a través del cálculo de los porcentajes de recuperación analítica, aceptando valores dentro del rango 80 % - 120 % como valores de referencia. Para su cálculo se emplea la siguiente expresión:

$$\% R = \frac{C_c}{C_a} \cdot 100$$

Donde C_c es la concentración de Pb calculada y C_a la concentración de Pb añadida.

En el caso de las algas se llevó a cabo el estudio de recuperaciones analíticas, al no disponer de material de referencia. Se analizaron suspensiones de una muestra de microalgas a las que se adicionaron diferentes concentraciones conocidas de Pb (10, 20, 30, 40 µg/L). Se obtiene una recuperación media del $(99,6 \pm 3) \%$, valor muy satisfactorio.

Para evaluar la exactitud de la determinación de Pb en los nidos de velutinas se analizaron dos materiales de referencia de vegetales: *Peach leaves GBW 08501* (hojas de melocotonero) e *Interlab VL 93-690*, material vegetal de un ejercicio interlaboratorio. Ambos materiales se analizan obteniendo los resultados que se muestran en la **Tabla XII**.

Tabla XII. Resultados obtenidos en el análisis de materiales de referencia certificados de vegetales ($n = 6$)

Concentración Pb \pm DE ($\mu\text{g/g}$, $n = 5$)		
	<i>Interlab VL 93-690</i>	<i>GBW 08501</i>
Valor experimental	10,14 \pm 1,02	1,15 \pm 0,05
Valor certificado	13,48*	0,99 \pm 0,08
Recuperación (%)		
	75,2	116,6

*Valor orientativo

Para el material certificado GBW 08501 se obtiene un valor aceptable del 116,6 %, inferior al límite establecido. Esta recuperación es ligeramente superior al obtenido por Li et al., 2006, del 104%. Para el material vegetal del interlaboratorio se obtuvo un valor ligeramente inferior al límite del 80 %, pero al ser un valor orientativo se puede considerar también aceptable.

4.5. Análisis de muestras

La aplicación de los métodos desarrollados al análisis de muestra se vio interrumpido debido a la suspensión de la actividad académica presencial en todos los niveles académicos, incluida la enseñanza universitaria, por la declaración del estado de

alarma sanitaria ocasionada por la crisis del COVID-19 (Real Decreto 463/2020, del 14 de marzo). En ese decreto se estableció que durante el período de suspensión se mantendrían las actividades educativas a través de las modalidades a distancia y “on line”, siempre que sea posible.

Las directoras de este TFG, siguiendo las directrices de la Resolución Rectoral del 20 de marzo de la Universidade da Coruña, decidieron continuar las actividades relacionadas con el tratamiento de los resultados experimentales y la elaboración de la memoria en modalidad no presencial.

A continuación, con el fin de complementar el trabajo realizado, se comentan diversos estudios recogidos en la bibliografía sobre la determinación de plomo en el mismo tipo de muestras en las que se centra el presente proyecto y en otras similares que también se emplean como bioindicadores de calidad ambiental. Señalar que no se encontró bibliografía específica sobre el contenido metálico de nidos de avispa velutinas.

Lozano et al. (2003) determinan la concentración de Pb en 93 muestras del alga *Phaeophyta* recogidas a lo largo de las costas de Tenerife, siendo el valor medio obtenido de 11,2 µg/g. De todas las muestras analizadas, 8 superaban la concentración de 20 µg/g, de las cuales 4 pertenecían a una zona próxima a un área industrial. En estudios posteriores concluyeron que dichos valores tan altos podían deberse a una contaminación temporal. Los valores de plomo referenciados en este trabajo para otros tipos de algas de diferentes lugares del mundo oscilan entre 0,05 µg/g y 21,8 µg/g. En concreto en las zonas de Cádiz y Huelva para las especies *Fucus* y *Enteromorpha* son de 13 µg/g y 22 µg/g, respectivamente. En el trabajo realizado por Ródenas de la Rocha et al. (2009), se constata que las algas *Porphyra* y *Laminaria* procedentes de Asia tienen unos contenidos mayores que los reportados en Europa (0,6 – 1,3 µg/g para Asia y 0,3 - 0,4 µg/g para Europa). Estos valores posiblemente reflejan la diferente contaminación entre continentes. Conti y Cecchetti (2003) estudiaron los contenidos de plomo en las algas *P. pavonica* y *U. lactuca* y en los moluscos *M. turbinata*, *M. galloprovincialis* y *P. cerulea*. Para las algas los valores obtenidos se encontraban entre 1,67 y 4,82 µg/g, y en el caso de los moluscos los valores oscilaban entre 0,46 y 1,31 µg/g. Para muestras de marisco de varias zonas de Brasil los valores encontrados varían en el intervalo 0,10 - 5, 40 µg/g, mientras que en las de pescado se encuentran en el rango 0,01 – 0,50 µg/g. A su vez en muestras de pescado del mar negro, mar Egeo y en muestras de pescado enlatado de Turquía se

obtienen concentraciones entre 0,09 y 0,93 $\mu\text{g/g}$ (Santos et al., 2013).

Dolgoplova et al. (2004), determinaron las concentraciones de plomo en líquenes recogidos en Orlovka (Rusia) obteniendo valores de entre 4 $\mu\text{g/g}$ y 29 $\mu\text{g/g}$. Medici et al. (2008) estudian la capacidad de los musgos para la biomonitorización de metales pesados en aire de Quito (Ecuador). Las muestras de briófitas se ubicaron en 20 posiciones diferentes y se recolectaron una vez transcurridos 50 días. Las concentraciones de Pb obtenidas varían entre 1,7 $\mu\text{g/g}$ y 15,0 $\mu\text{g/g}$ dependiendo del lugar de procedencia de la muestra. La diferencia de concentraciones en función de la ubicación se puede explicar por una contaminación de fuentes industriales o por una mala gestión de los residuos. Niveles de plomo entre 1,5 $\mu\text{g/g}$ y 16,1 $\mu\text{g/g}$ fueron reportados por Agnan et al. (2017) al analizar diferentes especies de líquenes procedentes de bosques de áreas remotas en diferentes regiones de Francia.

En el estudio realizado por Alushllari y Civici en 2014 se analizaron 42 muestras de suelo y material vegetal recogidas a 600 - 800 m de una antigua fábrica de baterías en Albania. Las concentraciones obtenidas oscilaron entre 126 $\mu\text{g/g}$ y 24207 $\mu\text{g/g}$ para los suelos y entre 0,24 $\mu\text{g/g}$ y 4,6 $\mu\text{g/g}$ para el material biológico. Los resultados obtenidos se compararon con los niveles máximos permitidos por la Unión Europea de acuerdo con la Directiva 86/278 / CEE (Directiva, 1986) y los especificados por la Directiva N ° 1881/2006 (Directiva, 2006) y la conclusión fue que el área estaba altamente contaminada por plomo. A su vez, Savio et al. (2010) también analizaron muestras de suelos pero en este caso recogidas en los alrededores de una planta de energía que produce gas natural, petróleo, propano, gasolina y diésel ubicada en Argentina. Dos de esas muestras se tomaron en un área potencialmente contaminada, la tercera se tomó en un área limpia. Las concentraciones de Pb obtenidas fueron 88,2 $\mu\text{g/g}$ y 49,9 $\mu\text{g/g}$ para las dos primeras y de 30,2 $\mu\text{g/g}$ para la tercera. Los resultados se compararon mediante un test *t* pareado y se observaron diferencias significativas ($n = 3$, $p = 0.05$).

5. Conclusiones

En este Trabajo de Fin de Grado se ha realizado un estudio sobre la determinación de plomo en microalgas marinas y en nidos de avispa velutina empleando la metodología analítica basada en el análisis de suspensiones con agitación ultrasónica acoplada directamente a la espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica (US-ETAAS), del cual se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- Se requiere un tratamiento previo diferente para cada tipo de muestra a fin de obtenerla en la forma adecuada para su análisis como suspensión. Para las microalgas, resultó crítica la etapa de lavado para eliminar eficazmente el contenido salino, que se realizó con formiato de sodio. En el caso de los nidos de avispa fue necesario reducir el tamaño de partícula, requiriéndose nitrógeno líquido en la trituración y posterior pulverización para romper de forma efectiva las fibras vegetales de dicho material. Además, los bajos contenidos de plomo en estas muestras hizo necesario su calcinación previa, para preparar las suspensiones con las cenizas obtenidas.
- Las suspensiones se prepararon directamente en el cubilete del automuestreador, volumen total 1 mL. Se optimizaron las concentraciones de HNO₃ y Tritón® X-100 en la fase líquida. Las concentraciones fueron ligeramente diferentes para la microalga (1,5 % HNO₃ + 0,6 % Tritón® X-100) y para la ceniza de nido de avispa (1 % HNO₃ + 0,1 % Tritón® X-100). La eliminación previa de la materia orgánica en la etapa de calcinación de las muestras de nidos, permitió el uso de menores concentraciones de ácido y tensoactivo.
- En la determinación de plomo mediante ETAAS solo fue necesario el uso de modificador químico, paladio, al analizar las microalgas. La cuantificación se llevó a cabo a partir de la integración del área de los picos atómicos, utilizando el calibrado con disoluciones patrón de Pb para las microalgas y el método de adiciones estándar para los nidos.
- El método establecido presenta buenas características analíticas y una sensibilidad adecuada para la determinación de Pb en las muestras estudiadas. La precisión alcanzada fue satisfactoria, dentro del criterio de aceptación (DER < 10 %), y la exactitud aceptable, con recuperaciones entre el 116,6 % y 75,2 % para un material vegetal con contenido de plomo certificado y orientativo, respectivamente.
- El método establecido está en consonancia con la química verde, ya que utiliza pequeñas cantidades de reactivos y, por lo tanto, se generan pocos residuos,

siendo una buena alternativa a los métodos clásicos.

Conclusións

Neste Traballo de Fin de Grao realizouse un estudo sobre a determinación do chumbo en microalgas mariñas e niños de avespas velutinas usando a metodoloxía analítica baseada na análise de suspensións con axitación ultrasónica directamente acoplada á espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica (US-ETAAS), do que se poden extraer as seguintes conclusións:

- Requírese un pretratamento diferente para cada tipo de mostra para obtela na forma adecuada para a súa análise como suspensión. Para as microalgas, o paso do lavado foi fundamental para eliminar de maneira eficaz o contido salino, que se levou a cabo con formiato de sodio. No caso dos niños de avéspera foi necesario reducir o tamaño das partículas, requirindo nitróxeno líquido no triturado e posterior pulverización para romper con eficacia as fibras vexetais do dito material. Ademais, o baixo contido de chumbo nestas mostras fixo necesario a súa calcinación previa, para preparar as suspensións coas cinzas obtidas.
- As suspensións preparáronse directamente no cubilete do automostreador, volumen total 1 mL. Optimizáronse as concentracións de HNO₃ e Tritón® X-100 na fase líquida. As concentracións foron lixeiramente diferentes para as microalgas (1,5 % HNO₃ + 0,6 % Triton® X-100) e para a cinza do niño da avéspera (1% HNO₃ + 0,1 % Triton® X-100). A eliminación previa de materia orgánica na etapa de calcinación das mostras de niño, permitiu o uso de concentracións máis baixas de ácido e tensoactivo.
- Na determinación do chumbo por ETAAS só foi necesario empregar un modificador químico, o paladio, ao analizar as microalgas. A cuantificación realizouse a partir da integración da área dos picos atómicos, utilizando a calibración con disolucións patrón de Pb para as microalgas e o método de adicións estándar para os niños.
- O método establecido presenta boas características analíticas e unha sensibilidade adecuada para a determinación de Pb nas mostras estudadas. A precisión acadada foi satisfactoria, dentro dos criterios de aceptación (DER < 10 %) e a exactitude aceptable, con recuperacións entre o 116,6 % e o 75,2 % para un material vexetal con contido en plomo certificado e indicativo, respectivamente.
- O método establecido está en consonancia coa química verde, xa que emprega pequenas cantidades de reactivos e, polo tanto, xéranse poucos residuos, sendo unha boa alternativa aos métodos clásicos.

Conclusions

In this Final Degree Project has been carried out a study based on the determination of lead in marine microalgae and velutina wasp nests using the analytical methodology based on the analysis of slurries with ultrasonic agitation directly coupled to electrothermal atomic absorption spectrometry (US-ETAAS), from which the following conclusions can be drawn:

- A different pretreatment is required for each type of sample in order to obtain it in the appropriate form for the analysis as slurries. For the microalgae, the washing step was critical to effectively remove the salt content, which was carried out with sodium formate. In the case of wasp nests, it was necessary to reduce the particle size, requiring liquid nitrogen in the crushing and subsequent pulverization to effectively break the plant fibers of the material. Furthermore, the low lead contents in these samples made necessary their previous calcination, and preparing the slurries with the ashes obtained.
- The slurries were prepared directly in the cup of the autosampler, total volumen 1 mL. The concentrations of HNO₃ and Tritón® X-100 in the liquid phase were optimized. The concentrations were slightly different for the microalgae (1.5 % HNO₃ + 0.6 % Triton® X-100) and for the wasp nest ash (1 % HNO₃ + 0.1 % Triton® X-100). The previous elimination of the organic matter in the calcination step of the nest samples, allowed the use of lower concentrations of acid and surfactant.
- In the determination of lead by ETAAS it was only necessary to use a chemical modifier, palladium, to analyze the microalgae. The quantification was carried out from the integration of the area of the atomic peaks, using the calibration with Pb standard solutions for the microalgae and the standard additions method for the nests.
- The established method presents good analytical characteristics and an adequate sensitivity for the determination of Pb in the studied samples. The precision achieved was satisfactory, within the acceptance criteria (DER < 10 %), and the accuracy acceptable, with recoveries between 116.6 % and 75.2 % for a plant material with certified and indicative lead content, respectively.
- The established method is in agreement with green chemistry, since it uses small amounts of reagents and, therefore, little waste is generated, being a good alternative to classical methods.

6. Bibliografía

- Adriano, D. C. (2001). *Trace Elements in Terrestrial Environments: Biogeochemistry, Bioavailability, and Risks of Metals*. Springer-Verlag, New York. DOI: 10.1007/978-0-387-21510-5
- Alushllari, M., Civici, N. (2014). *Determination of Lead Accumulation By Leaves of Different Vegetation. Grow in Soil Pollution*. 10(12), 273–280. <http://eujournal.org/index.php/esj/article/view/3178>
- Bermejo-Barrera, P., Barciela-Alonso, M. C., Moreda-Piñeiro, J., González-Sixto, C., Bermejo-Barrera, A. (1996). Determination of trace metals (As, Cd, Hg, Pb and Sn) in marine sediment slurry samples by electrothermal atomic absorption spectrometry using palladium as a chemical modifier. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, 51(9–10), 1235–1244. DOI: 10.1016/0584-8547(96)01487-5
- Bianchini, M., Eyherabide, G. (1998). Técnicas de mineralización para la determinación de macronutrientes en muestras de raíz de zanahoria (*Daucus carota* L.). *Revista de La Facultad de Agronomía*, 103(2), 191–195. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/69498>
- Borges, A. R., Becker, E. M., Dessuy, M. B., Vale, M. G. R., Welz, B. (2014). Investigation of chemical modifiers for the determination of lead in fertilizers and limestone using graphite furnace atomic absorption spectrometry with Zeeman-effect background correction and slurry sampling. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, 92, 1–8. DOI: 10.1016/j.sab.2013.11.001
- Cal-Prieto, M. J., Carlosena, A., Andrade, J. M., Muniategui, S., López-Mahía, P. & Prada, D. (2000). Study of chemical modifiers for the direct determination of antimony in soils and sediments by ultrasonic slurry sampling-ETAAS with D2 compensation. *Atomic Spectroscopy*, 21(3), 93–99.
- Cal-Prieto, M. J., Felipe-Sotelo, M., Carlosena, A., Andrade, J. M., Fernández, E. Prada, D. (2006). Medium-to-high antimony concentrations in environmental samples determined by ETAAS using slurry-based sample preparation methods. *Atomic Spectroscopy*, 27(1), 7–12.
- Cal-Prieto, M. J., Felipe-Sotelo, M., Carlosena, A. Andrade, J. M. (2005). Direct generation of stibine from slurries and its determination by ETAAS using multivariate optimization. *Atomic Spectroscopy*, 26(3), 94–101.
- Capozzi, F., P. Adamo, A. Di Palma, J.R. Aboal, R. Bargagli, A.J. Fernandez, P. Lopez Mahia, R. Reski, M. Tretiach, V. Spagnuolo, S. G. (2017). Sphagnum palustre clone vs native *Pseudoscleropodium purum*: A first trial in the field to validate the

- future of the moss bag technique. *Environmental Pollution*. 225, 323–328. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.02.057
- Chaparro G., A. L., García F., J. J., Cardona R., Y., Bustamante C., J. J., Peláez P., M. (2016). Desarrollo y validación de un método ambientalmente amigable para determinación de metales pesados en pastos. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 33(2), 3. DOI: 10.22267/rcia.163302.48
- Chouvelon, T., Brach-Papa, C., Auger, D., Bodin, N., Bruzac, S., Crochet, S., Degroote, M., Hollanda, S. J., Hubert, C., Knoery, J., Munsch, C., Puech, A., Rozuel, E., Thomas, B., West, W., Bourjea, J., Nikolic, N. (2017). Chemical contaminants (trace metals, persistent organic pollutants) in albacore tuna from western Indian and south-eastern Atlantic Oceans: Trophic influence and potential as tracers of populations. *Science of the Total Environment*, 596–597, 481–495. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.04.048
- Conti, M. E., Cecchetti, G. (2003). A biomonitoring study: Trace metals in algae and molluscs from Tyrrhenian coastal areas. *Environmental Research*, 93(1), 99–112. DOI: 10.1016/S0013-9351(03)00012-4
- Orroño, D.I. *Plomo en especies del género Pelargonium: suministro desde el suelo, ubicación en la planta y toxicidad*. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, 2002.
- De Souza, M. M., Louzada, J., Serrão, J. E., Zanuncio, J. C. (2010). Social wasps (Hymenoptera: Vespidae) as indicators of conservation degree of riparian forests in southeast Brazil. *Sociobiology*, 56(2), 387–396. ISSN : 0361-6525
- Dolgoplova, A., Weiss, D. J., Seltmann, R., Stanley, C., Coles, B., Cheburkin, A. K. (2004). Closed-vessel microwave digestion technique for lichens and leaves prior to determination of trace elements (Pb, Zn, Cu) and stable Pb isotope ratios. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 84(12), 889–899. DOI: 10.1080/03067310410001729006
- Dongmei, L., Yiwei, F., Hui, S. (2016). *A Review on Researches of interaction between heavy metals and microalgae in water*. Conference: 2016 International Conference on Civil, Transportation and Environment. DOI: 10.2991/iccte-16.2016.113
- ECHA. *Plomo en munición, balas y aparejos de pesca*. Consulta 12 de abril de 2020 en <https://echa.europa.eu/es/hot-topics/lead-in-shot-bullets-and-fishing-weights>
- Felipe-Sotelo, M., Carlosena, A., Fernández-Fernández, E., Muniategui, S., López-Mahía, P. Prada, D. (2004). Evaluation of two atomisation modes for direct determination of molybdenum in complex matrices by ultrasonic slurry sampling–electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 524(1-2),

- 329-337. DOI: 10.1016/j.aca.2004.04.048
- Felipe-Sotelo, M., Carlosena, A., Fernández, E., López-Mahía, P., Muniategui, S. Prada, D. (2004). Microwave-assisted extraction and ultrasonic slurry sampling procedures for cobalt determination in geological samples by electrothermal atomic absorption spectroscopy. *Talanta*, 63(3), 735–742. DOI: 10.1016/j.talanta.2003.12.029
- Felipe Sotelo, M., Carlosena, A., Andrade, J.M., Cal-Prieto M.J., Fernández, E., Prada, D. (2005). *Slurry-based procedures to determine chromium, nickel and vanadium in complex matrices by ETAAS*. *Microchemical Journal*. 81(2), 217–224. DOI: 10.1016/j.microc.2005.05.002
- Frank, J. J., Poulakos, A. G., Tornero-Velez, R., Xue, J. (2019). Systematic review and meta-analyses of lead (Pb) concentrations in environmental media (soil, dust, water, food, and air) reported in the United States from 1996 to 2016. *Science of the Total Environment*, 694. N° art. 133489 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.295>
- Ghirardi, R., Fosco, M.E., Gervasio, S.G., Imbert, D., Enrique, C., Pacheco, C. G. (2010). Líquenes y claveles del aire como bioindicadores de contaminación atmosférica por metales pesados en el microcentro santafesino. *Revista FABICIB*, 14, 165–173. DOI: 10.14409/fabicib.v14i1.861
- Ghoneim, M. M., El-Desoky, H. S., El-Moselhy, K. M., Amer, A., Abou El-Naga, E. H., Mohamedein, L. I., Al-Prol, A. E. (2014). Removal of cadmium from aqueous solution using marine green algae, *Ulva lactuca*. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 40(3), 235–242. DOI: 10.1016/j.ejar.2014.08.005
- Gobierno de España. (2015). *Estrategia de gestión, control y posible erradicación del avispon asiático o avispa negra*. Consulta 5 de mayo de 2020 en https://www.miteco.gob.es/gl/biodiversidad/publicaciones/estrategia_vespavelutina_tcm37-69976.pdf
- Gomis Yagües, V. (2008). Espectroscopia de emisión y absorción atómica. *Técnicas Instrumentales en el Análisis Industrial* (p. 19). Universidad de Alicante. Departamento de Ingeniería Química. <http://rua.ua.es/dspace/handle/10045/8252?locale=en>
- Grupo cooperativo cajamar. (2015). *¿Que son las microalgas? Interés y uso*. Fichas de Transferencia. N° 11. Consultado el 15 de abril de 2020 en <https://www.cajamar.es/es/agroalimentario/innovacion/investigacion/documentos-y-programas/fichas-de-transferencia/que-son-las-microalgas-interes-y-uso/>
- Harrington, J. M., Nelson, C. M., Weber, F. X., Bradham, K. D., Levine, K. E., Rice, J. (2014). Evaluation of methods for analysis of lead in air particulates: An intra-

- laboratory and inter-laboratory comparison. *Environmental Sciences: Processes and Impacts*, 16(2), 256–261. DOI:10.1039/c3em00486d
- Herbello Hermelo, P. *Especiación de metales pesados mediante la formación de quelatos*. Tesis doctoral. Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, 2007.
- Hernández-Martínez, A. M., Padrón-Sanz, C., Torres-Padrón, M. E., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodríguez, J. J. (2016). Analysis of Ni, Cr, Cu, Pb and Cd in marine bioindicators using mixed-micelles with microwave assisted micellar extraction and GF-AAS. *Analytical Methods*, 8(39), 7141–7149. DOI: 10.1039/c6ay01913g
- Herrera-Muillo, J. Rodríguez Román, S. (2010). Validación de un método de análisis para la determinación de metales pesados en partículas PM10 colectadas en aire ambiente. *Tecnología En Marcha*, 23(3), 33–46. ISSN: 0379-3962
- Kaplan, D. (2013). Absorption and Adsorption of Heavy Metals by Microalgae. *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*. 2ª Ed. Págs: 603–611. Blackwell Publishing Ltd. Great Britain.
- Kazi, T. G., Jamali, M. K., Arain, M. B., Afridi, H. I., Jalbani, N., Sarfraz, R. A., Ansari, R. (2009). Evaluation of an ultrasonic acid digestion procedure for total heavy metals determination in environmental and biological samples. *Journal of Hazardous Materials*, 161(2–3), 1391–1398. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2008.04.103
- Krachler, M., Mohl, C., Emons, H., Shotyk, W. (2002). Analytical procedures for the determination of selected trace elements in peat and plant samples by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, 57(8), 1277–1289. DOI: 10.1016/S0584-8547(02)00068-X
- Li, L., Hu, B., Xia, L., Jiang, Z. (2006). Determination of trace Cd and Pb in environmental and biological samples by ETV-ICP-MS after single-drop microextraction. *Talanta*, 70(2), 468–473. DOI: 10.1016/j.talanta.2006.03.006
- Lozano, G., Hardisson, A., Gutiérrez, A. J., Lafuente, M. A. (2003). Lead and cadmium levels in coastal benthic algae (seaweeds) of Tenerife, Canary Islands. *Environment International*, 28(7), 627–631. DOI: 10.1016/S0160-4120(02)00103-4
- Maduro, C., Vale, G., Alves, S., Galesio, M., Da Silva, M. D. R. G., Fernandez, C., Catarino, S., Rivas, M. G., Mota, A. M., Capelo, J. L. (2006). Determination of Cd and Pb in biological reference materials by electrothermal atomic absorption spectrometry: A comparison of three ultrasonic-based sample treatment procedures. *Talanta*, 68(4), 1156–1161. DOI: 10.1016/j.talanta.2005.07.020
- Margui, E., González-Fernández, O., Hidalgo, M., Pardini, G., Queral, I. (2011). *Aplicación de la técnica de espectrometría de fluorescencia de rayos-X en el estudio de la dispersión de metales en áreas mineras*. Boletín geológico y

- minero,122(2), 273-286. ISSN 0366-0176
- Medici, P., Murillo, A., Bedón, A., Haro, J., Galecio, F. (2008). *Estudio de la concentración de cadmio y plomo en el aire de la ciudad de Quito, empleando briofitas como biomonitores*. La Granja: Revista de Ciencias de la Vida, 8(2), 17–24. ISSN 1390-3799
- Ministerio de Sanidad y AECOSAN. (2015). *PLOMO*. Consulta 1 de mayo de 2020 en http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/ampliacion/plomo.htm
- Monceau, K., Bonnard, O., Thiéry, D. (2014). Vespa velutina: A new invasive predator of honeybees in Europe. *Journal of Pest Science*, 87(1), 1–16. DOI: 10.1007/s10340-013-0537-3
- National Renewable Energy Laboratory. *Determination of Ash in Biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP)*. Technical Report NREL/TP-510-42622. EX: US, NREL, 2008
- Pájaro Castro, N. P., Maldonado Rojas, W., Pérez Gari, N. E., Díaz Cuadro, J. A. (2013). Revisión de las implicaciones ocupacionales por exposición al plomo. *Informador Técnico*, 77(2).DOI: 10.23850/22565035.58
- Paredes, J. P. F. *Variabilidad bioquímica de microalgas marinas en cultivo en función de la fuente de nitrógeno*. Tesis doctoral. Universidad de la Coruña, A Coruña, 1995.
- Parmar, T. K., Rawtani, D., Agrawal, Y. K. (2016). Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution. *Frontiers in Life Science*, 9(2), 110–118. DOI: 10.1080/21553769.2016.1162753
- Pazos-Capeáns, P., Barciela-Alonso, M. C., Bermejo-Barrera, A., Bermejo-Barrera, P. (2004). Chromium in marine sediment samples from the Ría de Arousa (Galicia, NW of Spain): Analysis of the total content in slurries by ETAAS. *Analytica Chimica Acta*, 524(1-2), 121–126. DOI: 10.1016/j.aca.2004.03.024
- Querol, X. (2008). CALIDAD DEL AIRE, PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN Y METALES. *Esp Salud Pública*, 82(5), 447–454. ISSN 2173-9110.
- Ródenas de la Rocha, S., Sánchez-Muniz, F. J., Gómez-Juaristi, M., Marín, M. T. L. (2009). Trace elements determination in edible seaweeds by an optimized and validated ICP-MS method. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(4), 330–336. DOI: 10.1016/j.jfca.2008.10.021
- Rubio, C.; Gutiérrez, A.J.; Martín Izquierdo, R.E; Revert, C.; Lozano, G.; Hardisson, A. (2004). El plomo como contaminante alimenticio. *Toxicología*. 21(2-3),72-80. <http://rev.aetox.es/wp/wp-content/uploads/hemeroteca/vol21-23/209-465-1-SM.pdf>.

- Sánchez-Moreno, R. A., Gismera, M. J., Sevilla, M. T., Procopio, J. R. (2010). Direct and rapid determination of ultratrace heavy metals in solid plant materials by ET-AAS ultrasonic-assisted slurry sampling. *Phytochemical Analysis*, 21(4), 340–347. DOI: 10.1002/pca.1204
- Santos, L. F. P., Trigueiro, I. N. S., Lemos, V. A., da Nóbrega Furtunato, D. M., Cardoso, R. de C. V. (2013). Assessment of cadmium and lead in commercially important seafood from São Francisco do Conde, Bahia, Brazil. *Food Control*, 33(1), 193–199. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.02.024
- Savio, M., Cerutti, S., Martinez, L. D., Smichowski, P., Gil, R. A. (2010). Study of matrix effects and spectral interferences in the determination of lead in sediments, sludges and soils by SR-ETAAS using slurry sampling. *Talanta*, 82(2), 523–527. DOI: 10.1016/j.talanta.2010.05.017
- Sibakoti, T., McCurdy, D. (2011). Hydride Generation Atomic Absorption Spectrophotometry (HGAAS) for the Determination of Lead (Pb). Truman State University *CHEM 322 Lab Manual*. December 10, 1-9.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., Crouch, S. R. (2008). *Principios de análisis instrumental*. 6ª Ed. Cengage Learning Editores. México.
- Tato, T., Beiras, R. (2019). The use of the marine microalga *Tisochrysis lutea* (T-iso) in standard toxicity tests; comparative sensitivity with other test species. *Frontiers in Marine Science*, 6(JUL), 1–10. DOI: 10.3389/fmars.2019.00488
- Török, P., Žemberyová, M. (2012). Comparison of chemical modifiers for direct determination of Cd, Cu and Zn in food stuffs by solid-sampling-ETAAS. *Food Chemistry*, 132(1), 554–560. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.10.068
- Unión Europea. REGLAMENTO (CE) No 1881/2006 DE LA COMISIÓN de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea, 19 de diciembre de 2006. nº 364, p. 5-24.
- Unión Europea. Directiva 86/278/CEE del Consejo de 12 de junio de 1986 relativa a la protección del medio ambiente y, en particular, de los suelos, en la utilización de los lodos de depuradora en agricultura. Diario Oficial de la Unión Europea, 4 de julio de 1986, nº 181, p. 6-12.
- Unión Europea. REGLAMENTO (UE) 2015/1005 DE LA COMISIÓN de 25 de junio de 2015 que modifica el Reglamento (CE) no 1881/2006 por lo que respecta al contenido máximo de plomo en determinados productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea, 26 de junio de 2015, nº 161, p. 9-13.
- Unión Europea. RECOMENDACIÓN (UE) 2018/464 DE LA COMISIÓN de 19 de marzo de 2018 relativa al control de metales y yodo en las algas marinas, las

- plantas halófilas y los productos a base de algas marinas. Diario Oficial de la Unión Europea, 21 de marzo de 2018, nº78, p. 16-18.
- Unión Europea. Directiva 2008/50/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de mayo de 2008, relativa a la calidad del aire ambiente y a una atmósfera más limpia en Europa. Diario Oficial de la Unión Europea, 11 de junio de 2008, nº 152.
- Urbini, A., Sparvoli, E., Turillazzi, S. (2006). Social paper wasps as bioindicators: a preliminary research with *Polistes dominulus* (Hymenoptera Vespidae) as a trace metal accumulator. *Chemosphere*, 64(5), 697–703. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2005.11.009
- Volynskii, A. B. (2003). Chemical Modifiers in Modern Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry*, 58, 905–921. DOI: 10.1023/A:1026115330513
- Yannick, A., Probst, A., Séjalon-Delmas, N. (2017). Evaluation of lichen species resistance to atmospheric metal pollution by coupling diversity and bioaccumulation approaches: A new bioindication scale for French forested areas. *Ecological Indicators*, 72, 99–110. DOI: 10.1016/j.ecolind.2016.08.006
- Yebra-Biurrun, M. C., Moreno-Cid Barinaga, A. (2002). Literature survey of on-line spectroscopic methods for lead determination in environmental solid samples. *Chemosphere*, 48(5), 511–518. DOI: 10.1016/S0045-6535(02)00115-7
- Yu, Z., Vandecasteele, C., Desmet, B., Dams, R. (1990). Determination of lead in environmental reference materials (plant materials) by slurry-ETA-AAS. *Mikrochimica Acta*, 100(1–2), 41–48. DOI: 10.1007/BF01244496
- Zhelyazkova, H. (2012). Honeybees - Bioindicators for environmental quality. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 18(3), 435–442. ISSN : 1310-0351
- Zhu, C. J., Lee, Y. K. (1997). Determination of biomass dry weight of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 9, 189–194. DOI: 10.1023/A:1007914806640

7. ANEXO: Cronograma de las actividades realizadas

	Febrero 2019	Marzo 2019	Abril 2019	Mayo 2019	Junio 2019	Marzo 2020	Abril 2020	Mayo 2020	Junio 2020	Julio 2020	Septiembre 2020
Búsqueda y análisis bibliográfico	█	█	█	█			█	█	█	█	
Trabajo experimental	█	█	█	█	█						
Análisis de resultados			█		█			█	█	█	
Redacción de la memoria								█	█	█	█