

Engracia Mozas García

Espectrometría de absorción atómica
con atomización electrotérmica para
la determinación de nanopartículas y
el análisis directo de nanomateriales

Departamento
Química Analítica

Director/es
Crespo Miñana, Ana Cristina
Resano Ezcaray, Martín

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

Tesis Doctoral

ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON
ATOMIZACIÓN ELECTROTÉRMICA PARA LA
DETERMINACIÓN DE NANOPARTÍCULAS Y EL ANÁLISIS
DIRECTO DE NANOMATERIALES

Autor

Engracia Mozas García

Director/es

Crespo Miñana, Ana Cristina
Resano Ezcaray, Martín

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Química Analítica

2013

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE ARAGÓN
Y
UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



Departamento de
Química Analítica
Universidad Zaragoza



**ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN
ATÓMICA CON ATOMIZACIÓN
ELECTROTÉRMICA PARA LA
DETERMINACIÓN DE
NANOPARTÍCULAS Y EL ANÁLISIS
DIRECTO DE NANOMATERIALES**

Memoria presentada en la Universidad de Zaragoza por D^a Engracia Mozas García para optar al Grado de Doctor en Ciencias, Sección Químicas.



Departamento de
Química Analítica
Universidad Zaragoza



Dr. D. Martín Resano Ezcaray, Profesor Titular del Departamento de
Química Analítica de la Universidad de Zaragoza

y

Dra. Dña. Ana Cristina Crespo Miñana, del Instituto Tecnológico de
Aragón

CERTIFICAN

Que la presente Memoria para optar al grado de Doctor en Ciencias,
titulada:

**“Espectrometría de absorción atómica con atomización
electrotérmica para la determinación de nanopartículas y el
análisis directo de nanomateriales”**

Se ha realizado en los Laboratorios del Departamento de Química
Analítica de la Universidad de Zaragoza y del Instituto Tecnológico de
Aragón, bajo nuestra inmediata dirección, autorizando su presentación
para proseguir los trámites oportunos en orden a su calificación por el
Tribunal correspondiente.

Zaragoza, a 14 de Junio de 2013.

Fdo. Dr. D.
Martín Resano Ezcaray

Fdo. Dra. Dña.
Ana Cristina Crespo Miñana

“Coal and diamonds, sand and computer chips, cancer and healthy tissue: throughout history, variations in the arrangement of atoms have distinguished the cheap from the cherished, the diseased from the healthy. Arranged one way, atoms make up soil, air, and water; arranged another, they make up ripe strawberries. Arranged one way, they make up homes and fresh air; arranged another they make up ash and smoke.”

Eric Drexler en

Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology, 1986

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral es fruto del trabajo, del tiempo y de la ayuda desinteresada de muchas personas sin quienes hubiese sido imposible realizarla. Quiero aprovechar estas líneas para poder mencionar sólo a algunas de ellas.

En primer lugar, tengo mucho que agradecer a Martín Resano. Para mí ha sido un privilegio poder compartir apenas una pequeña parte de sus conocimientos. Quiero resaltar su ayuda técnica, que me ha permitido crecer como investigadora y como química, y quizás lo más importante, su excepcional personalidad y su comprometida entrega, que ha hecho que sea todo un placer viajar a MARTE cada día durante años. Muchas gracias Martín.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a Cristina Crespo, quién me introdujo en la química analítica, primero, y en la espectrometría de absorción atómica, después. Estoy muy agradecida porque creyera en este proyecto durante años, por su tiempo y su dedicación.

Agradezco de manera muy especial la ayuda que me prestó Miguel Ángel Belarra, su impulso y sus consejos en los momentos más críticos de este trabajo.

Deseo expresar mi agradecimiento al Instituto Tecnológico de Aragón, y en particular al Grupo de Investigación Aplicada del Instituto, por permitir que esta tesis doctoral se llevara a cabo poniendo a mi alcance todos los medios necesarios para su desarrollo.

Me gustaría agradecer la colaboración de Pilar Bernal y Ángel Rueda en el trabajo realizado sobre sílices nanoestructuradas y muy especialmente la de Jorge Pérez, quien durante años ha prestado su ayuda resolviendo dudas.

Asimismo quiero agradecer la ayuda de los compañeros marcianos, por acogerme de la forma en que lo hicieron y permitir que me moviera por MARTE como por mi propia casa, por sus consejos y su paciencia. Muchas gracias a Eduardo Bolea, Esperanza

García, Jorge Briceño, Luis Rello, Maite Aramendía y muy especialmente a la inminente doctora Charo Flórez, quién reconoce cada ruido del ContrAA y sin cuya ayuda todo hubiera sido más difícil.

Me gustaría agradecer a los compañeros del ITA por el apoyo que suponen esa infinidad de cafés: Dani, Elías, Javier, José Manuel, Margarita, Mario, Noelia, Pablo, Salva y Sebas. Muchas gracias también a M^a Eugenia quién durante años ha compartido conmigo química y muchos otros momentos, por ser compañera de camino en esta tesis.

Debo agradecer también a muchos amigos que han soportado años de tesis, peroratas, lamentos e incluso problemas de química. A Conchi, Laura, Óscar, Rubén, Salva, Silvia y a las Homoquímicas, Berta, Cris, Margarita (las dos veces merecidas), María A., María S., Norma, Teresa y Verónica, sin cuyo aliento constante probablemente no estaría donde estoy.

Mi familia es el alma que sustenta todo lo que soy y a quienes esta tesis les ha robado mucho tiempo conmigo. Muchas gracias especialmente a mis hermanos Alfredo y Susana, y a mi padre Teodoro porque sin ellos ni esto ni nada tendría sentido. Gracias a Teresa, por su apoyo logístico. Gracias a los peques Javier y Marta, que ayudan tanto sin ni siquiera saberlo y quienes no entendían qué era eso que tenía tan ocupada a la tía que no podía jugar con ellos.

Y finalmente, es difícil expresar lo que Javi ha supuesto en esta tesis. Él sabe, como yo, que el “Doc” es suyo. Gracias por enjugar los lloros, por aupar el ánimo, por recomponer los trozos, por tantas noches en ciencias para defenderme de los fantasmas escondidos, por las frases redactadas a medias, por los problemas resueltos de química, por el servicio 24 h de informática, por deshacer los entuertos y trabajar en esto como si fuera su proyecto más que el mío y, como no, por enseñarme palabras como pedalier, fixie o buje. Lo pondré por escrito: si alguna vez en el futuro se me ocurre mencionar la palabra tesis de nuevo, doy aquí mi aceptación expresa de que un juez le de toda la razón. MZ.

PUBLICACIONES

El trabajo que se presenta en esta memoria ha dado lugar, hasta el momento, a las siguientes publicaciones:

- *Direct analysis of silica by means of solid sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry*

M. Resano, E. Mozas, C. Crespo, J. Pérez, E. García-Ruiz, M.A. Belarra

Spectrochimica Acta Part B 71–72 (2012) 24–30

- *Solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry to monitor the biodistribution of gold nanoparticles in mice tissue after intravenous administration*

M. Resano, E. Mozas, C. Crespo, J. Briceño, J. del Campo Menoyo, M. A. Belarra.

Journal of Analytical Atomic Spectrometry., 2010,25, 1864-1873

- *Simultaneous determination of Co, Fe, Ni and Pb in carbon nanotubes by means of solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry*

M. Resano, E. Bolea-Fernández, E. Mozas, M.R. Flórez, P. Grinberg, R. E. Sturgeon

Journal of Analytical Atomic Spectrometry., 2013, 28, 657–665

Por último, la siguiente publicación se encuentra todavía en fase de redacción:

- *Direct determination of sulfur in nanocomposites by means of high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption as a method to determine the percentage of inorganic nanowires.*

M. Resano, E. Mozas, M.R. Flórez, C. Crespo

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	1
PUBLICACIONES.....	3
ÍNDICE	5
ABREVIATURAS.....	1
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	5
I.1 CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS QUÍMICO DE NANOPARTÍCULAS Y NANOMATERIALES.....	7
I.1.1 Aspectos generales de nanopartículas y nanomateriales.....	7
I.1.2 Desarrollo histórico de la nanotecnología	9
I.1.3 Retos actuales en nanociencia y nanotecnología.....	11
I.1.4 Caracterización y análisis químico de nanopartículas y nanomateriales.....	13
I.2 EL USO DE LA ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA DE MUESTRAS SÓLIDAS EN HORNO DE GRÁFITO CON FUENTE CONTINUA DE ALTA RESOLUCIÓN (SS HR-CS GFAAS) PARA EL ANÁLISIS QUÍMICO ELEMENTAL CUANTITATIVO DE NANOMATERIALES.....	18
I.2.1 La determinación directa de elementos sobre muestras sólidas	18
I.2.2 El uso de la espectrometría de absorción atómica en horno de gráfita para el análisis de muestras sólidas (SS-GFAAS)	20
I.2.3. Breve desarrollo histórico de la determinación directa mediante SS- GFAAS.....	22
I.2.4 La espectrometría de absorción atómica de alta resolución con fuente continua.....	25
I.2.4.1 Desarrollo de la espectrometría de absorción atómica con fuente continua.....	25
I.2.4.2 Características instrumentales de la HR-CS AAS.....	27
I.2.4.3 Ventajas potenciales de la HR-CS AAS frente a la AAS con fuente de línea.....	30

I.2.4.4	Aplicación de la HR-CS AAS al análisis directo de muestras sólidas..	31
I.2.5	El uso de la espectrometría de absorción atómica en horno de gráfita de alta resolución con fuente continua de muestras sólidas (SS HR-CS GFAAS) para el análisis de nanomateriales	36
I.3	METODOLOGÍA DE TRABAJO MEDIANTE SS-GFAAS Y HR-CS GFAAS	38
I.3.1	Dificultades que presentan las técnicas de GFAAS y HR-CS GFAAS en el análisis de muestras sólidas.....	38
I.3.1.1	Exceso de sensibilidad	38
I.3.1.2	Dificultades derivadas del análisis directo de muestras sólidas.....	40
I.3.1.3	Dificultades para el calibrado.....	41
I.3.1.4	Influencia de la cantidad de muestra utilizada en los resultados obtenidos	43
I.3.1.5	Obtención y tratamiento de los resultados	44
I.3.1.6	Dificultades derivadas del análisis de nanomateriales	44
I.3.2	Metodología de las técnicas de SS-GFAAS y HR-CS-AAS	45
I.3.2.1	Pretratamiento de la muestra	47
I.3.2.2	Condiciones de trabajo	47
I.3.2.3	Programa de temperaturas.....	47
I.3.2.4	Calibrado	48
I.3.2.5	Tratamiento de resultados	48
I.3.2.6	Validación de resultados	49
I.4	OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	49
I.5	BIBLIOGRAFÍA	51
CAPÍTULO II	EXPERIMENTAL	67
II.1	INSTRUMENTACIÓN	69
II.2	REACTIVOS Y DISOLUCIONES	71
II.2.1	Reactivos.....	71
II.2.2	Disoluciones patrón.....	72
II.2.3	Disoluciones de modificantes químicos	72
II.3	MUESTRAS ESTUDIADAS.....	73
II.4	PARÁMETROS INSTRUMENTALES	80

II.5 PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS.....	91
II.5.1 Procedimientos para realizar las determinaciones tras disolución de las muestras.....	91
II.5.1.1 Determinación de As, Cd, Cu, Cr, Hg, Pb y Sb en sílices.....	91
II.5.1.2 Determinación de Au en órganos de ratón.....	94
II.5.1.3 Determinación de Al, Co, Cr, Fe, Ni y Pb en nanotubos de carbono.....	96
II.5.1.4 Determinación de Mo y S en nanohilos disueltos.....	99
II.5.1.5 Determinación de Mo en <i>nanocomposites</i> disueltos.....	101
II.5.2 Preparación de las muestras para realizar las determinaciones directas sobre los sólidos.....	102
II.5.2.1 Muestras de sílices.....	102
II.5.2.2 Materiales de referencia para validar el análisis de sílices.....	102
II.5.2.3 Órganos de ratón.....	102
II.5.2.4 Nanotubos de carbono.....	103
II.5.2.5 <i>Nanocomposites</i>	103
II.5.3 Introducción de las muestras sólidas en el horno de grafito.....	103
II.5.4 Procedimientos para realizar las determinaciones directas sobre las muestras sólidas.....	104
II.5.4.1 Determinación de As, Cd, Cu, Cr, Hg, Pb y Sb en sílices.....	104
II.5.4.2 Determinación de Au en órganos de ratón.....	105
II.5.4.3 Determinación de Al, Co, Cr, Fe, Ni y Pb en nanotubos de carbono.....	108
II.5.4.4 Determinación de Mo y S en <i>nanocomposites</i>	109
II.6 BIBLIOGRAFÍA.....	110
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	111
III.1 DETERMINACIÓN DE As, Cd, Cu, Cr, Hg, Pb Y Sb EN SÍLICES.....	113
III.1.1 Introducción.....	113
III.1.2 Objetivo del trabajo.....	117
III.1.3 Desarrollo del método.....	118
III.1.3.1 Selección de muestras de referencia.....	118
III.1.3.2 Ajuste de la sensibilidad.....	118
III.1.3.3 Atomización de los analitos en el CRM.....	119

III.1.3.3 Protección de la plataforma	125
III.1.3.4 Análisis de las CRM. Desempeño del método.....	126
III.1.2.5 Análisis de muestras de sílice (SAS).....	127
III.1.4 Conclusiones.....	131
III.1.5 Bibliografía.....	132
III.2 MONITORIZACIÓN DE LA BIODISTRIBUCIÓN DE NANOPARTICULAS DE ORO EN TEJIDOS DE RATÓN....	137
III.2.1 Introducción	137
III.2.2 Objetivo del trabajo.....	141
III.2.3 Desarrollo del método	141
III.2.3.1 Optimización de las condiciones para la atomización del Au	141
III.2.3.2 Control de las soluciones de AuNPs	144
III.2.3.3 Análisis de la muestra mediante análisis directo de sólidos HR-CS GFAAS. Solución a las interferencias espectrales.....	147
III.2.3.4 Resultados del análisis de la muestra	153
III.2.4 Conclusiones.....	158
III.2.5 Bibliografía.....	159
III.3 DETERMINACIÓN DIRECTA DE Co, Fe, Ni, Pb, Cr y Al EN NANOTUBOS DE CARBONO.....	165
III.3.1 Introducción	165
III.3.2 Objetivo del trabajo.....	168
III.3.3 Desarrollo del método	169
III.3.3.1 Selección de la longitud de onda	169
III.3.3.2 Condiciones de atomización	176
III.3.3.3 Estrategia para la calibración	179
III.3.3.4 Análisis de los CNTs.....	182
III.3.4 Conclusiones.....	187
III.3.5 Bibliografía.....	188
III.4. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE NANOREFUERZO EN UN <i>NANOCOMPOSITE</i>	188
III.4.1 Introducción	195
III.4.2 Objetivo del trabajo.....	199

III.4.3 Desarrollo del método	200
III.4.3.1 Determinación de Mo	200
III.4.3.2 Determinación de S	201
III.4.3.3 Resultados y validación de los contenidos de S	204
III.4.3.3 Estudio de la homogeneidad	206
III.4.4 Conclusiones	209
III.4.5 Bibliografía.....	210
CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES	217
ANEXO I.....	221

ABREVIATURAS

- AAS** Espectrometría de absorción atómica (*Atomic Absorption Spectrometry*)
- AuNPs** Nanopartículas de oro (*Gold Nanoparticles*)
- ASTM** *American Society for Testing and Materials*, sociedad americana para el desarrollo de normas de ensayo y de materiales
- CCD** Detector de tipo “dispositivo de carga acoplada” (*Charge-coupled device*)
- CNT** Nanotubo de carbono (*Carbon Nanotube*)
- COINAPO** Proyecto europeo con título “*Composites of Inorganic Nanotubes and Polymers*”
- CRM** Material Certificado de Referencia
- CS-AAS** Espectrometría de absorción atómica con fuente continua (*Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry*)
- EDS** Espectrometría de energía dispersada de rayos X (*Energy-dispersive X-ray spectrometry*)
- EFSA** *European Food Safety Authority*, agencia de la Unión Europea que tiene la responsabilidad de alertar y detectar los problemas que afecten a la seguridad alimentaria.
- GFAAS** Espectrometría de absorción atómica con horno de grafito (*Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*)
- GFMAS** Espectrometría de absorción molecular con horno de grafito (*Graphite Furnace Molecular Absorption Spectrometry*)
- H_E** Constante de homogeneidad
- HR-CS AAS** Espectrometría de absorción atómica con fuente continua de alta resolución (*High Resolution Continuum Source Atomic Absorption*)

Spectrometry)

HR-CS GFAAS	Espectrometría de absorción atómica con fuente continua de alta resolución en horno de grafito (<i>High Resolution Continuum Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>)
HR-CS GFMAAS	Espectrometría de absorción molecular con fuente continua de alta resolución en horno de grafito (<i>High Resolution Continuum Source Graphite Furnace Molecular Absorption Spectrometry</i>)
ICP-MS	Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (<i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>)
ICP-OES	Espectrometría de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (<i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>)
IQE	Industrias Químicas del Ebro, empresa matriz del grupo IQE, grupo industrial del sector químico con sede en Zaragoza
ISO	<i>International Organization for Standardization</i> es una federación mundial de organismos nacionales de normalización
ITA	Instituto Tecnológico de Aragón
JECFA	Comité Conjunto de Expertos de Aditivos en Comida (<i>Joint Expert Committee on Food Aditives</i>)
λ	Longitud de onda (<i>Wavelength</i>)
LOD	Límite de detección (<i>Limit of detection</i>)
LOQ	Límite de cuantificación (<i>Limit of quantification</i>)
LSBC	Corrección de fondo mediante un algoritmo de mínimos cuadrados (<i>Linear Squares Background Correction</i>)
MWCNT	Nanotubo de carbono de pared múltiple o nanotubo multicapa (<i>Multi-walled Carbon Nanotubes</i>)

- NAA** Análisis por activación neutrónica (*Neutron Activation Analysis*)
- NRC** *National Research Council*, principal organización del gobierno de Canadá para la investigación y el desarrollo
- OECD** *Organisation for Economic Co-operation and Development*, Organización para la cooperación y el desarrollo económico constituida por 34 países de todo el mundo
- PA** Poliamida
- PET** Polietilen-tereftalato
- PP** Polipropileno
- PVP** polivinilpirrolidona
- Q_A** Absorbancia integrada
- QCM-D** Microbalanza de cristal de cuarzo con disipación (*Quartz Crystal Microbalance with Dissipation*)
- RSD** Desviación estándar relativa (*Relative Standard Deviation*)
- SAS** Sílice amorfa sintética (*Synthetic amorphous silica*)
- SEM** Microscopía electrónica de Barrido (*Scanning Electron Microscopy*)
- SS** Análisis directo de muestras solidas (*Solid sampling*)
- SWCNT** Nanotubo de carbono de pared simple o nanotubo monocapa (*Single-walled carbon nanotube*)
- TEM** Microscopía electrónica de transmisión (*Transmission Electron Microscopy*)
- TGA** Análisis termogravimétrico (*Thermogravimetric analysis*)
- TMCH** Material formado por metal de transición +

calcógeno + yodo

UNE Una Norma Española, conjunto de normas tecnológicas creadas por los comités técnicos de normalización

UV Ultravioleta

UV-Vis Ultravioleta-Visible

Capítulo I.

Introducción

“Le rôle de l'infiniment petit est infiniment grand.”

Louis Pasteur

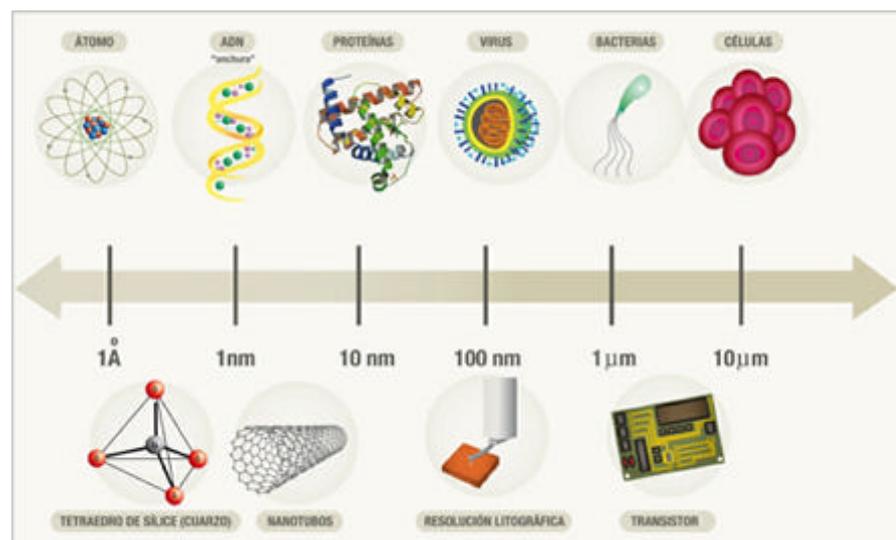
I.1 CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS QUÍMICO DE NANOPARTÍCULAS Y NANOMATERIALES

I.1.1 Aspectos generales de nanopartículas y nanomateriales

La definición de nanomateriales engloba a aquellos que contienen partículas sueltas o formando un agregado o aglomerado y en el que el 50% o más de estas partículas presenta una o más dimensiones externas en el intervalo de tamaños comprendido entre 1 nm y 100 nm (lo que normalmente se conoce como nanoescala).¹

La nanotecnología es el estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales a través del control de la materia a nanoescala. También se incluye dentro del término de nanotecnología la explotación de fenómenos y propiedades de la materia a nanoescala. Actualmente, la síntesis, aplicación y estudio de nanomateriales es una de las ramas con mayor auge en la investigación.

Figura I.1 Materiales a escala nano y micro²



La nanotecnología se caracteriza por ser un campo esencialmente multidisciplinar, y cohesionado exclusivamente por la escala de la materia con la que trabaja. La cualidad más importante y

sorprendente de esta nueva familia de materiales es el desarrollo de importantes propiedades dependientes del tamaño cuando sus dimensiones alcanzan el rango nanométrico. Las propiedades físicas y químicas de la materia cambian a escala nanométrica, lo cual se debe a efectos cuánticos. La conductividad eléctrica, el calor, la resistencia, la elasticidad, la reactividad, entre otras propiedades, se comportan de manera diferente que en los mismos elementos a mayor escala.³

La tendencia general es preparar materiales nanoestructurados “a medida”, es decir, crear materiales con propiedades determinadas según las aplicaciones que requieran en cada caso. Por ello, las aplicaciones potenciales de los materiales nanométricos son infinitas y los sectores de actividad interesados tan numerosos que abarcan desde la energía hasta sectores como la biomédicina, ingeniería, artículos de consumo, medio ambiente, electrónica e industria de la alimentación.

En la bibliografía, la definición de nanomateriales incluyen materiales nanoestructurados, nanopartículas, nanopolvos, materiales nanoporosos, nanofibras, fullerenos, nanotubos de carbono, nanohilos, dendrímeros, así como *nanocomposites*, esto es, materiales compuestos de una matriz con un refuerzo nanoestructurado.^{4,5}

Algunas de las posibles aplicaciones de la nanotecnología a medio y largo plazo son:^{6,7}

- Energías alternativas, energía del hidrógeno, pilas (células) de combustible, dispositivos de ahorro energético.
- Administración localizada de medicamentos, especialmente para combatir el cáncer y otras enfermedades.
- Computación cuántica, semiconductores, nuevos chips.
- Seguridad. Microsensores de altas prestaciones. Industria militar.
- Aplicaciones industriales muy diversas: tejidos, deportes, materiales, automóviles, cosméticos, pinturas, construcción, envasados alimentos, pantallas planas...

- Prestaciones aeroespaciales: nuevos materiales, etc.
- Fabricación molecular.

I.1.2 Desarrollo histórico de la nanotecnología

El desarrollo de esta disciplina se produce a partir de las propuestas de RICHARD FEYNMAN. Este físico cuántico y premio Nobel habla por primera vez en 1959 en una conferencia sobre el futuro de la investigación científica: "A mi modo de ver, los principios de la física no se pronuncian en contra de la posibilidad de maniobrar las cosas átomo por átomo". FEYNMAN propuso fabricar productos en base a un reordenamiento de átomos y moléculas. Su libro "*There is plenty of room at the bottom*" examinaba ya entonces el incipiente campo de los nanomateriales.⁸

Fue NORIO TANIGUCHI quién en 1974 utiliza por primera vez el término nanotecnología para referirse a la precisión que requería el mecanizado y terminado de ciertos materiales.⁸

En 1981, K. E. DREXLER, describe un nuevo planteamiento "método de abajo-arriba" (*bottom-up*) en lugar de los anteriores planteamientos de FEYNMANN y TANIGUCHI "método de arriba-abajo" (*top-down*). El nuevo planteamiento de DREXLER "método de abajo-arriba" (*bottom-up*) ya contempla la ingeniería molecular para construir máquinas y equipos moleculares con precisión atómica. Se trata de manipular materia a escalas nanométricas, de manera que se puedan constituir o ensamblar objetos de átomo en átomo o de molécula en molécula. En el antiguo planteamiento, "método de arriba-abajo" (*top-down*), los mecanismos y las estructuras se miniaturizaban hasta la escala nanométrica. Este tipo de nanotecnología era la más frecuente hasta esta fecha, más concretamente en el ámbito de la electrónica, donde predominaba la miniaturización.⁸

En 1986, DREXLER publica un libro "*Engines of Creation*" que finalmente populariza el término de nanotecnología.

Desde entonces la producción científica entorno al desarrollo de nuevos materiales nanoestructurados y sus aplicaciones ha sido enorme y muy variada y va mejorando conforme se desarrollan nuevas técnicas de análisis que permiten su caracterización. Algunos de los logros mas reseñables son:

- En 1981 un grupo de científicos soviéticos⁹ publica los resultados de la estructura química y caracterización de las nanopartículas de carbono, producido por una desproporción termo-catalítica de monóxido de carbono. Usando imágenes TEM y patrones de XRD, los autores sugirieron que sus "cristales tubulares de carbono multicapa", se formaron mediante el enrollamiento de capas de grafito en forma de cilindros. Además, especularon que durante el proceso de enrollamiento de capas de carbono en un cilindro son posibles muchos arreglos diferentes de grafito en forma de redes hexagonales.
- En 1982 se desarrolla el "microscopio de efecto túnel", el cual permite visualizar átomos como entidades independientes; este avance tecnológico permitió una base real para el progreso posterior de la manipulación de materia a escala muy pequeña.
- En 1991, SUMO IJIMA, de la sede de NEC (compañía japonesa de tecnología) en Japón, descubre los nanotubos de carbono.
- En 1993, el equipo del *Weizmann Institute of Science* en Israel crea las primeras nanoestructuras con propiedades sorprendentes lo cual lleva a la creación de la "cuerdas" de nanotubos; se despierta así el interés internacional por las propiedades físicas y químicas de los nanotubos de carbono.
- En 1996, WARREN ROBINETT y R. STANLEY WILLIAMS, crean un 'nanomanipulador', un aparato conectado a un microscópio de efecto túnel que permite ver los átomos.

- En el año 2000, el presidente CLINTON lanza la *National Nanotechnology Initiative*, con un presupuesto de 422 millones de dólares.

A partir del año 2000 el presupuesto mundial destinado a la investigación en nanotecnología se dispara. En la tabla I.1 se muestran algunos de los indicadores utilizados en las previsiones del desarrollo de la nanotecnología en el mundo.¹⁰

Tabla I.1 Indicadores del desarrollo de la nanotecnología en el mundo¹⁰

Año	Personal laboral	SCI ^a	Patentes	Productos finales en mercado (Billones \$)	Financiación I+D (Billones \$)
2000	≈60000	18085	1197	≈30	≈1.2
2008	≈40000	70287	12776	≈200	≈15
Estimación para 2015	≈200000	--	--	≈1000	--

^a SCI: Artículos en *Science Citation Index*

I.1.3 Retos actuales en nanociencia y nanotecnología

Numerosos estudios revelan los últimos avances en síntesis¹¹ y aplicaciones de una gran variedad de nanomateriales.^{12,13} Sin embargo, junto a ellos surgen también una serie de autores que plantean otras cuestiones derivadas del reciente auge de estos nuevos materiales como son su efecto en el medio ambiente, su efecto en la sociedad y finalmente, su efecto sobre el hombre, derivado principalmente por su posible toxicidad.^{14,15,16} El hecho de que muchos de estos nanomateriales se estén fabricando ya a nivel industrial, poniéndose en contacto con humanos, bien por su uso final o bien por su uso industrial en las cadenas de fabricación, hace que su control y caracterización sea ya una prioridad para organismos oficiales.

La OECD, la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, ha elaborado una lista con estos materiales que ya están en producción.¹⁷ La EFSA, Autoridad Europea para la

Seguridad de los Alimentos, ha redactado una guía para la evaluación de los riesgos de nanomateriales centrándose en productos de alimentación humana o animal, productos químicos para la agricultura y nanomateriales incorporados a productos que están en contacto con alimentos para humanos o animales (como por ejemplo, envases de alimentos).¹⁸

Ante la predicción realizada por distintas autoridades acerca de que las aplicaciones de las nanotecnologías impregnarán todas las áreas de la vida y permitirán avances espectaculares en las áreas de comunicación, la salud, la fabricación, los materiales y las tecnologías basadas en el conocimiento, existe una evidente necesidad de proporcionar a la industria y a la investigación las herramientas adecuadas para el desarrollo y la aplicación de dichas tecnologías.¹⁹ Asimismo, es esencial que los reguladores y las agencias de protección ambiental y de la salud posean sistemas de medición y protocolos de evaluación fiables, soportados por normas robustas y bien fundamentadas.¹⁹ Por esta razón, durante los últimos años, varios organismos oficiales de normalización internacional (ASTM, ISO) y española (UNE) se hacen eco de estas necesidades y han desarrollado un ya extenso número de normas (véase anexo I, página 221) que se centran en describir prácticas de seguridad y salud en lugares de trabajo relacionados con las nanotecnologías, incluyendo descripción y fabricación de los nanomateriales, efectos sobre la salud, evaluaciones de la exposición y técnicas de control. Sin embargo, estos mismos organismos son conscientes de que el campo de la nanotecnología está en constante avance y que todavía hay muchas lagunas en la ciencia actual sobre identificación, caracterización y evaluación de exposiciones laborales potenciales en el contexto de la nanotecnología.¹⁶

En este sentido, varios trabajos presentan resultados sobre la caracterización de nanomateriales.^{20,21} Sin embargo, cada día son más los que ponen de manifiesto la escasez de resultados de este tipo debido, por un lado, a la todavía nueva nanotecnología y por otro, a la falta de consenso entre la comunidad científica de qué propiedades

son las esenciales para caracterizar un nanomaterial.^{16,22,23} Las mismas propiedades que hace que estas partículas sean tan atractivas para su uso con fines muy variados (su pequeñísimo tamaño con su enorme potencial para interactuar con su entorno de una forma diferente) hacen también que sean potencialmente tóxicas. Existe una necesidad manifiesta de mejorar este conocimiento buscando nuevas técnicas de análisis y avanzando así en su caracterización fisicoquímica,^{22,23} en estudios toxicológicos en vivo,^{24,17} y en su control en general.²⁵

En este contexto, la disponibilidad de instrumentos de medida y el desarrollo de técnicas analíticas apropiadas para el análisis y caracterización de los nanomateriales son fundamentales para garantizar su control y conocimiento, desde su fabricación hasta su uso final. Paralelamente, resulta necesario que las técnicas a desarrollar cumplan con una serie de requisitos analíticos (límites de detección impuestos científica o legalmente), de tiempo y sencillez.

I.1.4 Caracterización y análisis químico de nanopartículas y nanomateriales

La caracterización de materiales nanoestructurados implica a su vez un numeroso abanico de desafíos para la comunidad científica. Entre ellos algunos aspectos juegan un papel importante a la hora de escoger una técnica de análisis adecuada:²⁵

- a) La manipulación y preparación de la muestra (en muchos casos con una toxicidad aún desconocida).
- b) La influencia que tienen el tiempo y el medio ambiente en las muestras, que pueden verse fácilmente alteradas ya que habitualmente presentan una alta reactividad con su entorno.
- c) Problemas asociados con el deterioro de la muestra y cuya cantidad disponible para el análisis suele ser limitada.
- d) Aspectos fundamentales como son la nanoestructura de la muestra y su composición química elemental.

Cuando se selecciona una técnica de análisis, no solo deben considerarse los aspectos relacionados con la muestra, sino que también deben estudiarse con detenimiento las ventajas e inconvenientes de dicha técnica de análisis, sus limitaciones y si los métodos o parámetros de la técnica pueden ajustarse al tipo de muestra de estudio.²⁵

Hasta el momento existen muchos estudios que incluyen la caracterización de nanomateriales desde un punto de vista de análisis cualitativo mediante técnicas como microscopía electrónica de transición (TEM) o de barrido (SEM).^{26,27,28} Otros estudios investigan el análisis químico de nanomateriales mediante técnicas atómicas como son el análisis por activación neutrónica (NAA),²¹ la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS)^{21,30} o la espectrometría de absorción atómica con cámara de grafito (GFAAS) sobre muestras líquidas tras digestión.³¹ También existen trabajos que hacen una recopilación de técnicas experimentales para la caracterización de nanomateriales abordando distintos puntos de vista como son aspectos morfológicos (tamaño de partícula, distribución de tamaños), caracterización química, hidrofobicidad de la superficie, dispersión de las nanopartículas y otros.²³ Sin embargo, tan solo se ha encontrado un artículo dedicado al análisis directo de nanomateriales usando GFAAS,³² a pesar de que el empleo de esta técnica puede presentar ventajas en algunos contextos, como se discutirá en el apartado I.2. En la tabla I.2, en la página 15, se muestra un resumen de las distintas técnicas de análisis químico encontradas en bibliografía, analizando las ventajas e inconvenientes que presenta cada técnica para el análisis químico cuantitativo de nanomateriales.

Tabla I.2 Estudio comparativo de técnicas experimentales para su uso en el análisis químico elemental cuantitativo de nanomateriales

Principales Ventajas	Principales Desventajas
Análisis por activación neutrónica (NAA)^{21,33}	
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Una de las técnicas más sensibles para análisis multielemental. ✓ Posibilidad de análisis directo de muestra sólidas. 	<ul style="list-style-type: none"> × Necesidad de disponer de un reactor nuclear grande que permita la irradiación de las muestras por su elevado coste. × Necesidad de personal capacitado y seguridad adecuada. × Elevado tiempo de análisis.
Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS)^{21,30}	
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Una de las técnicas más sensibles para análisis multielemental. 	<ul style="list-style-type: none"> × En general, es necesaria una cantidad apreciable de muestra (0.5 g) y un tratamiento previo de la misma.
Espectrometría de absorción atómica de llama y con cámara de grafito (GFAAS) sobre muestras líquidas tras digestión³¹	
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Técnica de análisis cuantitativo con alta sensibilidad y exactitud. 	<ul style="list-style-type: none"> × En general, es necesaria una cantidad apreciable de muestra (0.5 g) y un tratamiento previo de la misma. × No es multielemental.
Análisis termo-gravimétrico (TGA)^{21,26,34}	
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Equipo de fácil disponibilidad y manejo 	<ul style="list-style-type: none"> × Las impurezas metálicas se determinan como la fracción residual de la muestra tras su calentamiento/combustión. El resultado se obtiene por diferencia y no permite la cuantificación de cada metal por separado. × Los resultados analíticos se pueden ver influidos por la presencia de impurezas no metálicas (carburos u óxidos metálicos)
Difracción de rayos X (XRD)²⁷	
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Ensayo no destructivo y rápido 	<ul style="list-style-type: none"> × Se puede estudiar de forma cualitativa la pureza de las muestras y la presencia de metales pero no ofrece resultados químicos cuantitativos.

Principales Ventajas	Principales Desventajas
Espectroscopía de energía dispersada de rayos X (TEM-EDS y SEM-EDS)^{26,27,28}	
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Rápidez de análisis y escasa o nula preparación de muestra. ✓ La técnica ofrece una imagen de la muestra a elevados aumentos lo que permite observar su microestructura. 	<ul style="list-style-type: none"> × La determinación de carbono no es fiable porque el equipo presenta contaminación debido a hidrocarburos y a la baja sensibilidad de los detectores de EDS. × TEM-EDS presenta más inconvenientes que SEM-EDS porque además tiene contaminación de Cu y S. × Los resultados son más cualitativos que cuantitativos. × Debido al pequeño tamaño de muestra, solo se debe utilizar con muestras muy homogéneas.
Espectroscopía Raman²⁶	
<ul style="list-style-type: none"> ✓ No requiere preparación de muestra. ✓ Es un ensayo no-destruccionivo 	<ul style="list-style-type: none"> × Típicamente, no ofrece resultados químicos cuantitativos. Se utiliza para caracterizar compuestos de carbono y el estado de los átomos de carbono que hay en la muestra (útil para el caso de nanotubos de carbono) y su homogeneidad.
Espectrofotometría UV-Vis^{26, 34}	
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Equipo de fácil adquisición y manejo 	<ul style="list-style-type: none"> × Se puede utilizar como medida de la dispersión de nanopartículas en un líquido. En algunos casos se utiliza como análisis cuantitativo de elementos químicos presentes como impurezas en nanopartículas o nanotubos, pero en estos casos requiere de una preparación de la muestra que separe y/o ponga en disolución las impurezas metálicas.
Espectroscopía de infrarrojos por Transformada de Fourier (FTIR)²⁷	
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Ensayo no destructivo, rápido y fácil manejo 	<ul style="list-style-type: none"> × No ofrece resultados químicos cuantitativos. Se utiliza para caracterizar compuestos de carbono

Principales Ventajas	Principales Desventajas
Espectrometría de retrodispersión de Rutherford (RBS) y análisis por emisión de Rayos X inducida por partículas inducidas (PIXE)³⁵	
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Análisis multielemental 	<ul style="list-style-type: none"> × Ofrece resultados semicuantitativos mediante la identificación y la altura de los picos presentes en el espectro. × Técnica de análisis superficial, por lo que la contaminación superficial de la muestra puede influir en los resultados de análisis.
Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por Rayos X (XPS)^{25,36}	
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Ofrece información química de la muestra y además, permite obtener información sobre sus dimensiones 	<ul style="list-style-type: none"> × Técnica de análisis superficial, por lo que la contaminación superficial de la muestra puede influir en los resultados de análisis. × Técnica semi-cuantitativa que habitualmente se utiliza para estimar la estequiometría (con un error del 10% aproximadamente), estado químico y la estructura electrónica de los elementos que existen en un material. × Como técnica de análisis cuantitativo presenta elevados límites de detección (del orden de partes por mil aunque en algunos casos se puede llegar a ppm) y algunos parámetros de la técnica tienen una fuerte dependencia del tamaño de nanopartícula.
Fluorescencia de Rayos X (XRF)³⁷	
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Análisis no destructivo y rápido. ✓ Bajo coste. ✓ Permite determinaciones multielemental ✓ Escasa o nula preparación de la muestra ✓ El equipo puede ser portátil. 	<ul style="list-style-type: none"> × No siempre ofrece suficiente sensibilidad. Sus límites de detección oscilan entre 1 y 100 ppm. × Técnica de análisis superficial, por lo que la contaminación superficial de la muestra puede influir en los resultados de análisis.

I.2 EL USO DE LA ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA DE MUESTRAS SÓLIDAS EN HORNO DE GRÁFITO CON FUENTE CONTINUA DE ALTA RESOLUCIÓN (SS HR-CS GFAAS) PARA EL ANÁLISIS QUÍMICO ELEMENTAL CUANTITATIVO DE NANOMATERIALES

I.2.1 La determinación directa de elementos sobre muestras sólidas

El desarrollo de métodos cuantitativos de análisis se ha realizado, tradicionalmente, tras la puesta en disolución del analito, lo que antiguamente se denominaba “vía húmeda” de análisis,³⁸ sin que el desarrollo de nuevos métodos instrumentales cambiara significativamente esta tendencia.

Con esta tradición histórica no resulta sorprendente que a muchos químicos analíticos actuales, la obtención directa a partir de un sólido de una señal analítica con fines cuantitativos, salvo que se realice por alguna técnica específica como fluorescencia de rayos X, pueda parecerles una curiosidad científica.

Sin embargo, si se realizan algunas operaciones previas, como la puesta en disolución de las muestras sólidas, antes de obtener la señal analítica, es debido a que se considera que dicha señal no se puede conseguir directamente o no tendrá la calidad requerida. En efecto, el aspecto esencial del desarrollo de un proceso analítico que permita conseguir la información deseada, es la obtención de una señal analítica de la calidad requerida, basada en cualquiera de las propiedades del analito.³⁹

Ahora bien, cualquier manipulación de la muestra supone asumir el riesgo de provocar cambios en la información analítica que posee y, desde luego, aumenta el tiempo, y habitualmente el dinero, necesario para obtener dicha información. Las operaciones previas, que se estima que en muchas ocasiones pueden suponer entre un 70%

y un 95% del tiempo dedicado al desarrollo completo del proceso analítico,⁴⁰ pueden ser imprescindibles en muchos casos, pero resultan indeseables en el desarrollo de un proceso analítico ideal.

La eliminación de cualquiera de estas etapas, siempre que sea posible, va a presentar aspectos beneficiosos en el desarrollo del proceso analítico. Así, la obtención de la señal analítica directamente desde la muestra sólida, al eliminar el proceso de disolución de la misma, ofrece potencialmente las siguientes ventajas:

- a) Minimiza el riesgo de contaminación de la muestra.
- b) Evita pérdidas del analito durante el tratamiento: ataque incompleto, retención por residuos insolubles, pérdida de compuestos volátiles, etc.
- c) Incrementa la sensibilidad con respecto al trabajo en disolución, dado que las muestras no se diluyen.
- d) Permite obtener información a la que no se tiene acceso por métodos que requieren la disolución de la muestra, como por ejemplo la distribución del analito en la misma.
- e) Es rápido, pues disminuye o elimina el tratamiento previo de la muestra.
- f) Evita la utilización de productos peligrosos y corrosivos, necesarios muy a menudo en el proceso de disolución.
- g) En general requiere una cantidad de muestra reducida, lo que resulta importante cuando únicamente se dispone de una pequeña cantidad de ésta.

Pese a las ventajas anteriormente enunciadas, las determinaciones directas sobre muestras sólidas pueden presentar también notables dificultades. Especialmente cabe destacar:

- a) La mayoría de las técnicas analíticas vigentes durante muchos años (por ejemplo, la volumetría, la absorción molecular en el UV-VIS o la cromatografía de gases) parecen poco adecuadas

para obtener la información analítica a partir de muestras sólidas.

- b) Como consecuencia de lo anterior, aunque algunas técnicas tengan la posibilidad de actuar sobre muestras sólidas, siquiera ocasionalmente, a menudo no se ha comercializado la instrumentación adecuada, lo que limita todavía más su desarrollo.
- c) En los casos en los que realmente se realizan determinaciones directas sobre muestras sólidas suelen existir serios problemas para conseguir un calibrado correcto.
- d) Generalmente es necesario desarrollar una metodología de trabajo específica.

I.2.2 El uso de la espectrometría de absorción atómica en horno de grafito para el análisis de muestras sólidas (SS-GFAAS)

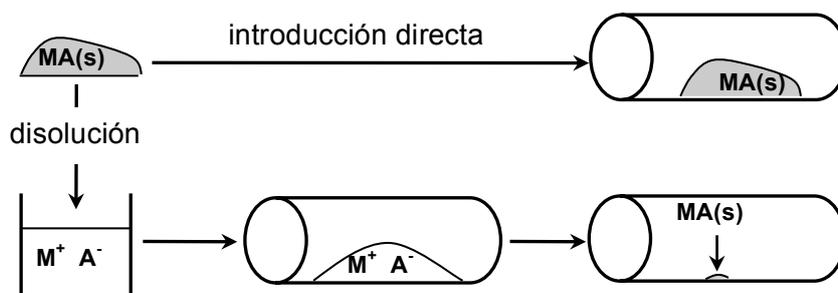
La espectrometría de absorción atómica utilizando un horno de grafito como atomizador (GFAAS) puede solventar alguna de las dificultades enumeradas en el apartado anterior para el análisis de muestras sólidas.

En primer lugar, como puede verse en la figura I.2 (página 21), tras introducir la muestra disuelta en el horno de grafito y realizar la etapa de secado, la señal analítica se genera a partir de un sólido. Incluso puede suceder que el analito se encuentre en este momento en la misma forma química que tenía en la muestra original.

Además, dado que el trabajo con muestras sólidas puede considerarse tan antiguo como la propia técnica de espectrometría de absorción atómica⁴¹ y que, desde entonces, ha habido un número reducido pero permanente de investigadores que han trabajado en este campo, se han comercializado varios dispositivos que permiten el trabajo directo con muestras sólidas, los más importantes de los cuales se pueden consultar en el artículo de revisión de BENDICHO y DE

LOOS⁴² y cuya expresión más acabada la constituyen los diseños de KURFÜRST *et al.*,⁴³ que llevaron a la fabricación de un aparato completamente automático por parte de la casa Grün y que actualmente comercializa la empresa Jena tras realizar mejoras importantes.

Figura I.2 Evolución del analito antes de generar la señal analítica en el horno de grafito



La consecución de un calibrado correcto ha sido un tema controvertido durante mucho tiempo, pero en la última década parece haberse impuesto la solución más sencilla, es decir, realizarlo frente a disoluciones patrón de los analitos (véase apartado I.3.1.3, página 41).

A ello han contribuido, por supuesto, las mejoras instrumentales (correctores potentes de absorción inespecífica y, sobre todo, la posibilidad de realizar medidas de absorbancia integrada), pero probablemente sean más importantes las excelentes prestaciones que el horno de grafito ofrece para la atomización de muestra sólidas.

En efecto, antes de obtener la señal analítica en la etapa de atomización, el horno de grafito permite realizar tratamientos térmicos de la muestra (en el trabajo convencional con disoluciones, las etapas de secado y de pirólisis) a una temperatura y con una duración controlados y, si se considera necesario, con ayuda de reactivos (modificantes químicos).

Estas posibilidades instrumentales permiten realizar transformaciones de la muestra sólida antes de someterla al proceso de atomización, de forma que éste se realice en las condiciones más favorables. Por ejemplo, aún en el supuesto de la figura I.2 (página 21) en el que el analito queda en idéntica forma química con y sin disolución previa de la muestra, es evidente que el proceso de atomización de la muestra sólida puede verse perturbado por el resto de la matriz. Pues bien, si por ejemplo ésta fuera de naturaleza orgánica se podría eliminar en la etapa de pirólisis.

En resumen, las etapas térmicas anteriores a la de atomización y el uso de modificantes químicos son operaciones previas a la obtención de la señal analítica, que permiten modificar las características de la muestra sólida de forma que la atomización del analito se produzca en condiciones óptimas.

La metodología de trabajo cuando se trabaja con muestras sólidas requiere algunas modificaciones con relación a cuando se trabaja en disolución y serán comentadas en el apartado I.3.

I.2.3. Breve desarrollo histórico de la determinación directa mediante SS-GFAAS

En la tabla I.3 (página 24) se presenta un resumen de los hitos más relevantes y de las tendencias más importantes en cada década para el desarrollo de la determinación directa de metales sobre muestras sólidas mediante SS-GFAAS.

El potencial de la cámara de grafito como sistema de atomización de muestras sólidas ya fue indicado por L'VOV en 1959, en el trabajo en el que propuso su diseño de *graphite cuvette* como sistema de atomización electrotérmico.⁴¹

En las dos décadas siguientes numerosos investigadores realizan trabajos en este campo y, aunque hoy resulten algo desfasados, merece la pena destacar el ingenio que desarrollaron para diseñar los sistemas caseros más variopintos que permitieran la

atomización de muestras sólidas. Sus aportaciones se encuentran reflejadas en los artículos de revisión de L'VOV⁴⁴ y LANGMYHR.⁴⁵

Finalmente se impuso la atomización electrotérmica y a finales de los años setenta y principios de los ochenta, son notables las aportaciones de LANGMYHR^{45,46} y de HEADRIDGE.⁴⁷ En sus trabajos utilizan mayoritariamente sistemas de atomización no comerciales y las muestras que abordan son metalúrgicas en el caso de HEADRIDGE y más variadas en los trabajos de LANGMYHR (geológicas, biológicas y medioambientales). En estos trabajos ya se detectan algunos de los problemas del método: apreciable imprecisión, dificultades en el calibrado y elevada señal de fondo.

La primera determinación directa sobre una muestra sólida mediante SS-GFAAS utilizando un instrumento comercial, la determinación de Au en fibra de poliéster, fue realizada por KERBER⁴⁸ en 1971 y puede considerarse como el inicio de la época actual de la técnica, aunque el desarrollo de dispositivos comerciales específicos para sólidos se producirá, sobre todo, en la década de los ochenta, con distintas soluciones propuestas por las diferentes casas comerciales.⁴²

En las décadas siguientes, las mejoras generales en la instrumentación (posibilidades de medir absorbancia integrada, mejores correctores de absorción inespecífica) y en la metodología de la cámara de grafito (concepto de horno con plataforma de temperatura estabilizada),⁴⁹ permiten mejorar la calidad de las medidas de absorción atómica a partir de muestras sólidas. Se desarrollan varios dispositivos comerciales específicos para sólidos que pueden ser utilizados en los mismos instrumentos que se utilizan para el análisis de disoluciones. Sus características quedan descritas en el artículo de BENDICHO y DE LOOS,⁴² todos ellos se basan en pesar el sólido en un soporte que se pueda introducir en el horno de grafito.

Durante este periodo de tiempo, se realizan también numerosos estudios para resolver los problemas de calibrado, aunque no llegan a conclusiones inequívocas. El informe DE MILLER-IHLI es

una buena síntesis, ligeramente pesimista, de las posibilidades de la técnica a finales de la década de los ochenta.⁵⁰

Tabla I.3 Desarrollo histórico de las determinaciones directas sobre muestras sólidas mediante GFAAS

Año o periodo	Principales características	Principales autores
1959	Primera propuesta de análisis directo de sólidos mediante EAA-HG.	L'VOV ⁴¹
1960/70	Estudio de diversos sistemas atomizadores.	
1970/80	Trabajo con atomizadores electrotérmicos caseros.	LAGMHYR ^{45,46} HEADRIDGE ⁴⁷
1971	Primera determinación con un instrumento comercial.	KERBER ⁴⁸
1980/90	Diversas empresas comercializan dispositivos para la introducción de sólidos en el horno de grafito. Importantes mejoras instrumentales (absorbancia integrada, Zeeman). Calibrado: patrones sólidos o líquidos. Métodos de adición estándar.	KURFÜRST ⁴³ ATSUYA ⁵¹ BAXTER ⁵²
1984	Primer congreso internacional dedicado específicamente al método. ⁵³	
1990/2000	Tratamiento de resultados y desarrollo metodológico. Extensión a matrices refractarias. Estudios de homogeneidad de CRM's. Diseño atomizador con sistema de calentamiento transversal	KURFÜRST ^{54,55} BELARRA/ RESANO ^{56,57} KRIVAN ⁵⁸ GROBECKER ⁵⁹ KRIVAN ⁶⁰
2002	Primer uso de la fuente continua de alta resolución en SS-GFAAS	WELZ ⁶¹
2002/2012	Diversos estudios y aplicaciones sobre las ventajas de la fuente continua de alta resolución frente a la fuente de línea	WELZ ⁶² RESANO/ BELARRA ⁶³

El mayor volumen de trabajo se realiza en Alemania y el tipo de muestras estudiadas es preferentemente de naturaleza orgánica. Es en aquél país donde, en 1984, tiene lugar el primer congreso dedicado al análisis directo de muestras sólidas, organizado por KURFÜRST. Estos congresos, que comenzaron siendo casi una reunión de usuarios del equipo de Grün, fueron adquiriendo cada vez mayor importancia.

Si la década de los ochenta es esencialmente de desarrollo instrumental, las aportaciones más interesantes de la de los noventa son metodológicas. Aprovechando una determinación convencional, el excelente trabajo de BAXTER Y FRECH expone con claridad las dificultades de la técnica y comenta sus posibles soluciones,⁶⁴ mientras que BELARRA *et al.* realiza una revisión del estado de la técnica.⁵⁶ Las posibles causas de error y el tratamiento de resultados fueron estudiadas por KURFÜRST^{54,55} y BELARRA *et al.*^{56,57}

En un aspecto más aplicado, los trabajos de KRIVAN extendieron el uso de la técnica a matrices poco estudiadas hasta entonces⁵⁸ y, en otra dirección, la capacidad del método para averiguar la distribución del analito en la muestra, mediante la aplicación del concepto de factor de inhomogeneidad,⁶⁵ se ha aplicado al estudio de la homogeneidad de materiales de referencia certificados.⁵⁹

En el 2002, aparece publicado el primer uso de la espectrometría de alta resolución con fuente continua.⁶¹ Desde entonces hasta hoy en día son muchos los estudios que investigan las mejoras de esta técnica frente a la tradicional fuente de línea.⁶²

I.2.4 La espectrometría de absorción atómica de alta resolución con fuente continua

I.2.4.1 Desarrollo de la espectrometría de absorción atómica con fuente continua

La reciente espectrometría de absorción atómica con fuente continua (CS-AAS) también puede considerarse la técnica atómica más antigua si se tiene en cuenta el descubrimiento por FRAUNHOFER de las líneas de absorción en el espectro solar. Cuando en la segunda

mitad del siglo XIX BUNSEN y KIRCHHOFF estudiaron la relación entre la absorción y la emisión de los metales alcalinos y alcalinotérreos también utilizaron una fuente continua, pues era la única disponible en la época. A principios de 1870, se desarrolló un instrumento completo de CS-AAS, que usaba una lámpara eléctrica como fuente continua.

Aunque se probaron otras fuentes de radiación, el advenimiento de la espectrometría cuantitativa a principio del siglo XX hizo que la espectrometría de emisión atómica se considerase mucho más adecuada para estos fines que la de absorción atómica que había sido utilizada con fines esencialmente cualitativos. En efecto, es más sencillo cuantificar una radiación, por pequeña que sea, sobre un fondo prácticamente transparente (emisión) que cuantificar la minúscula pérdida en la intensidad total de una fuente continua producida por la absorción atómica (absorción). Esta situación se mantuvo hasta los trabajos de WALSH en 1952. Este investigador fue consciente de que el uso de una fuente continua resultaba inadecuado, ya que era necesario un monocromador con una resolución imposible de alcanzar en aquella época. Por ello, planteó un enfoque distinto utilizando una fuente con líneas lo más finas posibles, para que de esta forma la labor del monocromador fuese tan sólo el separar dicha línea del resto de las emitidas por la fuente. La alta resolución necesaria para utilizar la absorción atómica era proporcionada por la fuente de línea y no por el monocromador.

WALSH⁶⁶ propuso el uso de lámparas de cátodo hueco, y consiguió desarrollar una técnica de suma utilidad dentro del análisis elemental, con mínimos requisitos en cuanto a los sistemas de monocromación, aunque limitada de hecho a ser una técnica monoelemental por la utilización de fuentes de línea. Todos los dispositivos comerciales construidos a lo largo de cinco décadas se han basado en este principio.

Pese a ello, durante todos estos años hubo investigadores que continuaron estudiando el desarrollo de espectrómetros de absorción atómica utilizando una fuente continua, intentando resolver

esencialmente los problemas de obtener una fuente continua de alta intensidad, buena estabilidad y amplio intervalo espectral y, sobre todo, los de disponer de un sistema de monocromación de alta resolución.

Finalmente, ha sido el grupo de BECKER-ROSS en Berlín el que ha resuelto el problema, aprovechando los avances anteriores pero dándole un enfoque más radical. En lugar de intentar adaptar la instrumentación existente, se plantearon desde el principio las necesidades de un dispositivo de fuente continua en lo relativo a la fuente de radiación, el monocromador y el detector y diseñaron un nuevo instrumento de espectrometría de absorción atómica de alta resolución con fuente continua (HR-CS AAS).⁶⁷

I.2.4.2 Características instrumentales de la HR-CS AAS

Los instrumentos de HR-CS AAS que ha comercializado recientemente la empresa alemana Analytik Jena (ContrAA 300 con atomizador de llama, ContrAA 600 con atomizador de cámara de grafito y ContrAA 700 que cuenta con atomizadores de llama y de cámara de grafito en línea) siguen el prototipo propuesto por el grupo de BECKER-ROSS y su diseño básico se muestra en la figura I.3 (página 28). Sus componentes principales son:^{62,68}

- a) Una lámpara de arco corto de xenón como fuente continua.

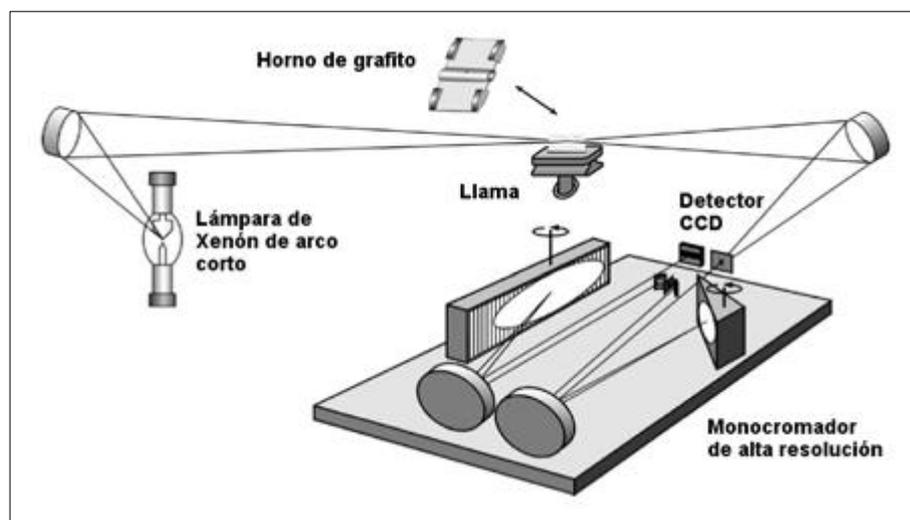
Aunque las lámparas convencionales de xenón se utilizan ampliamente en la actualidad (por ejemplo, para la iluminación de los estadios), no tienen suficiente energía en la zona del UV, en la que se encuentran la mayoría de las líneas de interés para las determinaciones por AAS.

La lámpara que se utiliza en el instrumento de HR-CS AAS trabaja a alta presión (17 bar, en frío) en el modo que se denomina *hot spot*, alcanzando temperatura de alrededor de 10000 K en el pequeño plasma generado en su interior.

Estas lámparas permiten cubrir el espectro entre 190 y 900 nm y su intensidad de emisión es al menos 10 veces mayor que la

de las lámparas convencionales de xenón alcanzando una intensidad 100 veces mayor en el rango de UV lejano. Asimismo tienen una intensidad unas 100 veces superior a las lámparas de cátodo hueco convencionales en el rango espectral completo.

Figura I.3 Diseño esquemático de un instrumento HR-CS AAS.⁶⁰



b) Una unidad de atomización.

Esta parte de la HR-CS AAS es igual que la de los instrumentos con fuente de línea, pudiendo realizarse la atomización con llama o electrotérmica.

c) Un sistema monocromador de alta resolución.

El uso de una fuente de radiación continua para AAS requiere inevitablemente disponer de un monocromador de alta resolución. El sistema propuesto para la instrumentación de HR-CS AAS consiste en un sistema doble de dispersión: un prisma de 300 mm que actúa como pre-monocromador y una red de difracción en escalera de 400 mm.

La radiación emitida por la lámpara de xenón entra al monocromador a través de una ranura y se dirige mediante unos espejos parabólicos sobre el prisma que provoca la

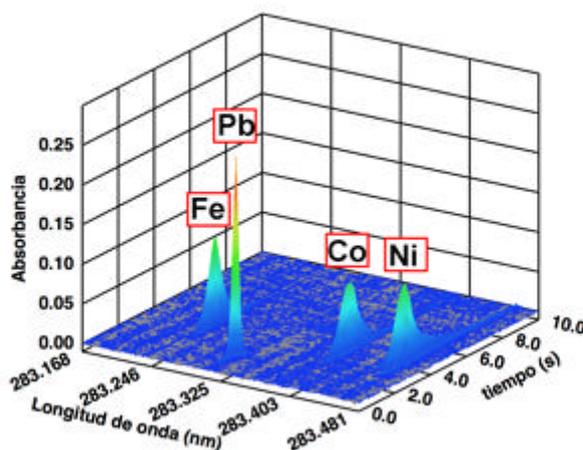
dispersión de la radiación. Mediante la oportuna rotación del prisma, se dirige la zona de longitudes de onda de interés, a través de una ranura, hacia la red en escalera consiguiendo una resolución de unos picómetros (1.1 pm a 200 nm).

d) Un detector de tipo “dispositivo de carga acoplada” (CCD).

El sistema detector consiste en un CCD de matriz lineal con 588 píxeles (elementos de imagen), 200 de los cuales se utilizan con fines analíticos. Como cada píxel funciona simultáneamente de forma independiente, realmente se dispone de 200 detectores lo que permite medir, no sólo la longitud de onda de interés, sino también su entorno inmediato.

Como conclusión, en la figura I.4 se puede observar la elevada resolución que se consigue mediante esta instrumentación para una determinación multielemental de Co, Fe, Ni y Pb. En primer lugar, la línea de interés de cada elemento aparece perfectamente separada de las líneas del resto de elementos. Además, como para medir la absorción atómica de un elemento se utilizan esencialmente tres píxeles, el resto de los 200 píxeles disponibles proporcionan información precisa sobre las variaciones de la línea base.

Figura I.4 Medida de la absorbancia mediante SS HR-CS GFAAS en el entorno de la línea del hierro a 283.306 nm



I.2.4.3 Ventajas potenciales de la HR-CS AAS frente a la AAS con fuente de línea

La principal expectativa que generaba el uso de una fuente continua en AAS era realizar determinaciones multielementales. Desafortunadamente, con la instrumentación actual, esta posibilidad se ve limitada por las características del detector. El sistema comercializado permite medir de forma simultánea en un intervalo de longitudes de onda entre 0.2 y 1.0 nm, por lo que sólo se pueden hacer determinaciones multielementales para elementos con líneas muy próximas.

A pesar de la cierta decepción que este hecho puede suponer, la HR-CS AAS presenta claras ventajas que hacen que sus prestaciones sean significativamente superiores a las de un instrumento de absorción atómica con fuente de línea. Entre las ventajas potenciales se pueden citar:

- Mejora en la fiabilidad de la medida.

La medida simultánea de 200 píxeles (sectores de longitud de onda) hace que todo el entorno de la línea de análisis (0.2-0.5 nm, según la longitud de onda) se haga 'visible' en alta resolución. De hecho, el sistema va a funcionar como un dispositivo simultáneo de doble haz, lo que permite una corrección muy eficiente de bastantes efectos indeseados, como oscilaciones temporales de la fuente de emisión, pequeños cambios en la transmisión del atomizador o en la sensibilidad del detector.

- Mejora en los límites de detección.

Como consecuencia de lo anterior y de la mayor intensidad de radiación de la lámpara de xenón comparada con la de cátodo hueco, se mejora el límite de detección en un factor de tres a cinco.

- Mejora en la corrección de la absorción inespecífica.
Al poder medir simultáneamente el entorno de la longitud de onda de interés, se pueden corregir mucho mejor interferencias espectrales, incluso en el caso de señales de fondo debidas a procesos que cambian muy rápidamente o a espectros de estructura hiperfina, difíciles de solventar con los sistemas de corrección convencionales.
- Control de la sensibilidad y del rango lineal.
En HR-CS AAS es posible disminuir la sensibilidad de las medidas, utilizando un número menor de píxeles o eligiendo los de las alas de la señal en lugar de los centrales.
- Posibilidad de determinar elementos no metálicos, como F, Cl, P ó S.
Estos elementos tienen sus líneas atómicas más sensibles en el UV lejano y no pueden utilizarse con la instrumentación actual. Sin embargo, la HR-CS AAS es capaz de utilizar líneas de absorción molecular, principalmente aquellas que corresponden a transiciones rotacionales que tienen una anchura media de unos pocos picómetros, semejante al de las líneas atómicas.

I.2.4.4 Aplicación de la HR-CS AAS al análisis directo de muestras sólidas

Si relacionamos las ventajas que presenta la HR-CS AAS, que se han explicado en el apartado anterior, con los problemas que aparecen específicamente en la determinación directa de elementos mediante SS-GFAAS, se observa que la nueva instrumentación de fuente continua puede resultar particularmente beneficiosa para resolver algunos de los citados problemas. En concreto:

- Una nueva forma de controlar el exceso de sensibilidad.
Dado que en SS-GFAAS no es posible diluir las muestras, el exceso de sensibilidad es un problema relativamente frecuente.

El uso de HR-CS AAS proporciona una nueva forma de regular la sensibilidad y de esta manera extender el intervalo lineal, por elección del número y posición de los píxeles que se utilizan para cuantificar la señal y con la ventaja sobre los mecanismos utilizados habitualmente (cambio de longitud de onda, mantenimiento del caudal de argón durante la atomización) de no tener que alterar las condiciones experimentales.

- Mejor corrección de la absorción inespecífica.

En SS-GFAAS la alícuota de medida contiene la matriz intacta, con lo que se tiene mayor riesgo de interferencias. Esto es especialmente importante en la situación más complicada de SS-GFAAS, en la que el analito y la matriz tienen semejante volatilidad y no es posible cambiarlas con el uso de modificantes químicos. La posibilidad de medir el entorno de la señal hace que la HR-CS AAS posea una extraordinaria capacidad de corrección de la absorción inespecífica que puede resultar muy valiosa en las situaciones comentadas.

- Medida simultánea de más de un elemento.

Pese a que la HR-CS AAS no pueda considerarse como una técnica multielemental, existe la posibilidad de medir simultáneamente varios elementos que tengan líneas de absorción suficientemente próximas, tal como se vio en la figura I.4 (página 29).

En la tabla I.4, en la página 33, se resumen los trabajos que se han publicado referidos a la determinación directa de elementos sobre muestras sólidas utilizando la HR-CS AAS. Su número aunque va incrementándose paulatinamente todavía no es muy elevado debido a la especificidad del campo de SS-GFAAS y al hecho de que la comercialización de la instrumentación es todavía reciente. La mayoría de los trabajos exploran sobre todo la segunda de las ventajas indicadas anteriormente, las enormes posibilidades de la HR-CS AAS para la corrección de absorción inespecífica, basada en su elevada

resolución y en la posibilidad de medir el entorno espectral a ambos lados de la línea utilizada para la determinación. Además, se utilizan para la corrección los espectros de referencia producidos por la vaporización de sustancias puras (por ejemplo, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ y SiO_2 para corregir las especies PO y SiO, respectivamente).^{69,70} La capacidad de determinación simultánea de más de un elemento mediante HR-CS-AAS se ha demostrado en varios estudios.

Tabla I.4 Artículos publicados sobre la determinación directa de elementos sobre muestras sólidas utilizando HR-CS-AAS

Analito	Matriz	Aspectos más relevantes
Año 2004		
Tl	Carbón	Detección y eliminación de interferencias espectrales. ⁷¹
Año 2005		
Cd	Carbón	Corrección de la señal de fondo con un algoritmo de mínimos cuadrados. ⁷²
Co	Muestras biológicas	Señal de fondo estructurada debida al PO. ⁷³
Año 2006		
Hg	Muestras biológicas	No se utiliza modificante químico en muestras sólidas y se elimina la pirolisis. ⁷⁴
Pb	Carbón	Corrección de la señal de fondo con un algoritmo de mínimos cuadrados. ⁷⁵
Pb	Muestras biológicas	Se utilizan espectros de referencia para corregir la señal de fondo. ⁷⁶
Año 2007		
Al	Muestras farmacéuticas con alto contenido en Fe	Se examinan las ventajas de fuente continua frente a la fuente de línea en la corrección de la señal de fondo. ⁷⁷
Año 2009		
Ag	Muestras geológicas	Calibración con muestras solidas. Corrección de fondo con algoritmo de mínimos cuadrados. ⁷⁰
Cd y Fe	Cereales	Determinación multielemental con analitos de diferente volatilidad. ⁷⁸
Cd y Fe	Judías y suelos	Ajuste de la sensibilidad mediante la selección de líneas de análisis. ⁷⁹

Analito	Matriz	Aspectos más relevantes
Cr y Fe	Crudo	Determinación multielemental. ⁸⁰
Hg	Polímeros	Comparativa entre SS-GFAAS y SS HR-CS GFAAS. ⁸¹
P	Muestras biológicas	Uso de tubo y plataforma recubiertos de Tungsteno y medida de P a través de líneas atómicas y moleculares. ⁸²
Sb	Sedimentos	Corrección de fondo con algoritmo de mínimos cuadrados. ⁸³
Año 2010		
Co y V	Crudo	Determinación multielemental. ⁸⁴
Cu, Cr, Fe, Mn, Mo, Ni y V	Carbón y negro de carbono	Corrección de la señal de fondo con un algoritmo de mínimos cuadrados. ⁸⁵
Cu, Cr, Fe, Mn, Mo, Ni, y V	Carbón y negro de carbono	SS-HR-CS GFAAS se utiliza como método de referencia en comparación con ICP-OES. ⁸⁶
S	Muestras biológicas	Medida de S a través de línea de absorción de la molécula CS. Uso de W y Pd como modificantes. ⁸⁷
Sb	Partículas presentes en el aire	Ajuste de la sensibilidad mediante el uso de una línea atómica secundaria. Uso de Ru como modificante. ⁸⁸
Año 2011		
Ag, Cd, Co, Ni y Fe	Muestras Biológicas	Se analizan tres ventajas concretas de la HR-CS-GFAAS: i) Ampliar el rango lineal mediante multipletes ii) uso de un estándar interno para mejorar la precisión ii) Determinación multielemental simultáneo. ⁶³
Hg	Partículas presentes en el aire	Desarrollo de métodos de análisis rutinarios sin preparación de muestra. ⁸⁹
Ni	Muestras biológicas (Daphnia magna)	Medida de Ni en muestras sólidas con bajo LOD (8.3 pg) y LOQ (27.7 pg). ⁹⁰
Zn	Muestras biológicas (Daphnia magna)	Ajuste de la linealidad mediante la selección de los píxeles adecuados en la señal. ⁹¹
Año 2012		
Cr	Plantas medicinales	Estudio de la microhomogeneidad del análisis. ⁹²

Analito	Matriz	Aspectos más relevantes
Cu, Mo, Sb	Materia particulada del aire	Comparación de las medidas en sólidos directos con muestras tras lixiviación y extracción con agua regia. ⁹³
Ni	Muestras biológicas (Daphnia magna)	Medida de Ni en muestras sólidas con bajo LOD (8.3 pg) y LOQ (27.7 pg). ⁹⁴
Pb	Plantas medicinales	Estudio del comportamiento termoquímico del Pb usando diferentes modificantes. ⁹⁵
Pd	Partículas presentes en el aire	Se investiga el efecto del peso de muestra y de la acción de varios modificantes. ⁹⁶
S	Muestras de diferente naturaleza	Medida de S a través de la línea de absorción de la molécula CS. Uso de Ru y nanopartículas de Pd como modificantes. ⁹⁷
Año 2013		
Ag	Muestras biológicas (Daphnia magna)	Ajuste de la linealidad mediante la selección de los píxeles adecuados en la señal. ⁹⁸
Ag	Partículas presentes en el aire	Desarrollo de métodos de análisis rutinarios sin preparación de muestra. ⁹⁹
Cd y Cr	Biomasa	Determinación secuencial (no simultánea) sin modificante químico. ¹⁰⁰
Mo y Ti	Orina depositada en papel clínico de filtro	Determinación simultánea de Mo y Ti. ¹⁰¹
Pb	Arroz	Estudio del contenido de Pb en diferentes granos de arroz dentro dentro de la misma muestra. ¹⁰²
Pb	Pelo humano	Se compara el análisis directo de sólidos con el análisis tras digestión de las muestras. ¹⁰³
Pb	Pintalabios	Se comparan con los resultados obtenidos con las mismas muestras digeridas en microondas. ¹⁰⁴
S	Carbón	Medida de S a través de la línea 258.033 nm de absorción de la molécula CS. Uso de Ru como modificante permanente. ¹⁰⁵

I.2.5 El uso de la espectrometría de absorción atómica en horno de grafito de alta resolución con fuente continua de muestras sólidas (SS HR-CS GFAAS) para el análisis de nanomateriales

A priori, la espectrometría de absorción atómica de muestras sólidas en horno de grafito de alta resolución con fuente continua (SS HR-CS GFAAS) ofrece unas capacidades muy adecuadas para el análisis de nanomateriales. A continuación, la tabla I.5 muestra algunos de los aspectos más relevantes a tener en cuenta en el análisis de nanomateriales junto con las capacidades que aporta la técnica SS HR-CS GFAAS.

Tabla I.5 Capacidades de la técnica SS HR-CS GFAAS aplicadas al análisis de nanomateriales

Análisis de nanomateriales	Capacidades de la técnica SS HR-CS GFAAS
<p>Limitada cantidad de producto a analizar</p> <ul style="list-style-type: none"> • La síntesis de nanomateriales suele conllevar un elevado costo y, por tanto, la cantidad disponible de estos productos (muchas veces en fase de investigación) suele ser muy reducida, por lo tanto no es posible disponer de grandes cantidades. • La cantidad de muestras en estudios toxicológicos con nanopartículas suele ser limitada. 	<p>Análisis sobre pequeñas cantidades de muestra</p> <ul style="list-style-type: none"> • El análisis directo de muestra sólida permite el análisis sobre muy pequeñas cantidades de muestra (en un rango de 0.1 a 10 mg).
<p>Dificultad en la disolución</p> <ul style="list-style-type: none"> • Algunos nanomateriales como los nanotubos de carbono presentan una elevada estabilidad química y su disolución resulta complicada. • Otros materiales nanoestructurados (como la sílice) se pueden disolver pero su proceso de disolución conlleva el uso de ácidos muy agresivos, como el ácido fluorhídrico. 	<p>Análisis directo de la muestra</p> <ul style="list-style-type: none"> • Con un desarrollo adecuado del método de análisis no es necesaria la disolución de la muestra.

Análisis de nanomateriales	Capacidades de la técnica SS HR-CS GFAAS
<p>Requieren unos límites de detección muy bajos</p> <ul style="list-style-type: none"> • La pureza de los nanomateriales suele ser elevada. La determinación de impurezas suele conllevar bajos límites de detección. • Imposición de límites legales de ciertos elementos químicos (metales pesados) en nanomateriales. • Determinación de nanopartículas en baja concentración en ciertos órganos para estudios toxicológicos. 	<p>Mayor poder de detección que otras técnicas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Incremento de la sensibilidad, ya que la muestra no se diluye. • El riesgo de contaminación y la pérdida de analito se reduce al mínimo ya que la muestra no se manipula.
<p>Necesidad de estudio de la dispersión de nanopartículas</p> <ul style="list-style-type: none"> • En estudios toxicológicos, se analiza el estudio de la bio-distribución de nanopartículas usadas con fines farmacológicos. • En el caso de materiales nanoreforzados, la distribución del refuerzo está directamente relacionada con las propiedades finales del material. 	<p>Mayor información de la muestra</p> <ul style="list-style-type: none"> • La técnica SS-GFAAS permite obtener información espacial a la que no se tiene acceso por técnicas que requieren la disolución de la muestra. • Permite el estudio de la microhomogeneidad de la muestra.
<p>Necesidad de un control de la muestra</p> <ul style="list-style-type: none"> • En el caso de nanomateriales en producción, es necesario controlar su composición química de forma periódica o rutinaria. 	<p>Rapidez de análisis</p> <ul style="list-style-type: none"> • Al no requerir de preparación de muestra, la velocidad de análisis es mayor, lo que permite realizar análisis rutinarios. • Posibilidad de determinación multielemental en un solo análisis mediante la selección de líneas cercanas

I.3 METODOLOGÍA DE TRABAJO MEDIANTE SS-GFAAS Y HR-CS GFAAS

I.3.1 Dificultades que presentan las técnicas de GFAAS y HR-CS GFAAS en el análisis de muestras sólidas

A la hora de desarrollar métodos para el análisis directo de nanomateriales y, de sólidos en general, hay que considerar una serie de peculiaridades respecto del trabajo con disoluciones que se discuten en este apartado.

I.3.1.1 Exceso de sensibilidad

La espectrometría de absorción atómica es una de las técnicas más sensibles para la determinación de metales. Esto, junto con el hecho de que en el análisis de sólidos directos la muestra no se diluye puede hacer que esta técnica sea la óptima en el caso de concentraciones muy bajas de analitos ($\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$).

Sin embargo, la sensibilidad del método puede suponer un problema si el contenido del analito en la muestra es más elevado, ya que el rango lineal de calibrado de la técnica GFAAS es bastante reducido y además, no se puede utilizar fácilmente la solución trivial de diluir la muestra, tal y como se hace cuando se trabaja con disoluciones.⁶⁴

Esta dificultad se detectó desde los inicios de la técnica y se han ofrecido diversas soluciones para resolverla, aunque varias de ellas resultan poco prácticas:

- a) Diluir la muestra con un sólido (normalmente grafito en polvo).

Esta opción aumenta el tiempo para tener resultados y además tiene el inconveniente de que debe conseguirse una mezcla homogénea, lo cual no siempre es fácil.

- b) Reducir la cantidad de la muestra atomizada hasta valores próximos al microgramo.

Los problemas de esta opción se centran en la manipulación de la muestra así como de homogeneidad de la misma.

- c) Utilizar una temperatura de atomización inferior a la óptima.
Esta opción tiene el riesgo de que aumente la imprecisión.
- d) Otras modificaciones instrumentales.

En la actualidad las herramientas que más se utilizan para el ajuste de la sensibilidad en las técnicas SS-GFAAS y SS HR-CS GFAAS son:

- a) Uso de líneas menos sensibles en la absorción atómica.

La mayor parte de los elementos tienen suficientes líneas de distinta sensibilidad como para que una de ellas responda bien a la concentración del analito en la muestra.

- b) Mantenimiento del caudal de argón en la etapa de atomización.

De esta forma se disminuye el tiempo de permanencia de los átomos en la zona de absorción y, por tanto, la señal analítica generada.

- c) Selección de los píxeles adecuados para la medida.

Esta nueva opción solo es posible en la técnica SS HR-CS GFAAS y presenta la gran ventaja frente a las dos anteriores, que una vez hecho el análisis de la muestra, no es necesario repetirlo para reducir la sensibilidad.

Consiste en disminuir la sensibilidad de la medida eligiendo los píxeles de las alas de la señal en lugar de los centrales. Esta opción se constituye, además, como la única solución práctica en el caso de análisis multielemental donde mantener el caudal de argón en la atomización disminuiría la señal de todos los analitos a la vez y donde a veces no es posible elegir otro rango de longitud de onda donde aparezcan todos los elementos de interés.

I.3.1.2 Dificultades derivadas del análisis directo de muestras sólidas

Las determinaciones directas sobre muestras sólidas presentan las siguientes dificultades específicas o de más difícil solución que cuando se trabaja con muestras disueltas:

- a) Necesidad de una optimización del programa de temperaturas para conseguir la atomización del analito minimizando el efecto de la matriz.

El programa de temperaturas utilizado en el horno de grafito tiene como principal objetivo conseguir la atomización selectiva del analito o analitos de interés. Esta optimización es necesaria tanto si la muestra se introduce en estado sólido o en disolución.

En el proceso de disolución de una muestra se suele conseguir una separación de la matriz de la muestra y de los analitos de interés. Estos últimos suelen presentarse en una forma química sencilla (cationes o complejos solubles).

Sin embargo, el análisis directo de muestras sólidas hace que la optimización del programa de temperaturas sea más complicado debido a que la matriz juega un papel importante, por ejemplo puede actuar como modificante químico reteniendo el analito .

- b) Menor eficiencia de los modificantes químicos externos, cuya interacción con el analito, cuando está inmerso en la matriz sólida, resulta más complicada.¹⁰⁶
- c) Mayor desgaste del tubo y la plataforma de grafito, lo que disminuye, en ocasiones drásticamente (véase apartado III.1.3.3, página 125) la vida de los mismos y por tanto conlleva un aumento en el coste de los análisis.
- d) Presencia de residuos en la plataforma o en el tubo, incluso después de la etapa de limpieza, que es necesario eliminar mecánicamente después de un número de análisis (véase II.5.4.1, página 104).

- e) Posible vaporización de algunos de los componentes de la matriz junto al analito. Esto puede producir un incremento de la absorción inespecífica, debida a la absorción por moléculas de la matriz en fase vapor o a la radiación dispersada por pequeñas partículas sólidas suspendidas en el volumen de atomización. También pueden aparecer interferencias en la fase gaseosa.

I.3.1.3 Dificultades para el calibrado

El calibrado suele ser uno de los problemas más importantes cuando se quieren obtener resultados analíticos cuantitativos a partir de muestras sólidas por cualquier técnica analítica.

En la década de los años ochenta varios trabajos analizan diversas estrategias para resolverlo, la mayor parte de las cuales han sido discutidas por BAXTER:¹⁰⁷

- a) Con materiales de referencia certificados sólidos, que parece la solución más natural al problema aunque no la más sencilla. Este método fue muy utilizado en la citada década, hasta el punto de casi considerarse el único sistema válido de calibración.¹⁰⁸
- b) Con patrones sólidos sintéticos, línea en la que destacan los trabajos de ATSUYA *et al.*,⁵¹ que los preparan por coprecipitación. No resulta raro que este método no se haya extendido debido a la complicación adicional de preparar dichos patrones.
- c) Por métodos de adiciones estándar, para lo que BAXTER *et al.* proponen varias aproximaciones.⁶⁴ Aunque estos trabajos son interesantes, la obtención de resultados resulta tan complicada que BERGLUND y BAXTER desarrollaron un programa informático específico para resolver la calibración.⁵²
- d) Con patrones en disolución acuosa, que constituye sin duda la forma de calibrado más sencilla y que fue la utilizada en los trabajos pioneros con atomizadores comerciales,⁴⁸ pero que en

los años siguientes se consideró inadecuada, salvo para algunos casos especiales.

La posibilidad de realizar el calibrado con disoluciones patrón del analito se consideró durante mucho tiempo problemática, como consecuencia de que el proceso de atomización del mismo puede ser diferente cuando se atomiza una disolución, de la que en muchas ocasiones se ha eliminado parte de la matriz, que cuando se atomiza una muestra sólida, con la inevitable presencia de la matriz.

Sin embargo, en la mayoría de los trabajos publicados en los últimos años, se realiza el calibrado frente a patrones disueltos. Este último procedimiento, único compatible con la rapidez y facilidad de utilización que se suele demandar al método, requiere que la señal obtenida sea independiente de la cantidad y naturaleza de la matriz y sólo sea dependiente de la cantidad de analito, lo que puede resultar complicado debido a los problemas, citados anteriormente, que provoca la introducción completa de la matriz.

El uso de disoluciones para realizar el calibrado ha sido posible en buena parte por las mejoras que se han producido en la instrumentación, especialmente a la posibilidad de medir con facilidad valores de absorbancia integrada con lo que la señal es menos dependiente del proceso de atomización utilizado, y a un mejor control instrumental de las temperaturas de calcinación y atomización. En estas condiciones y suponiendo que se consiga una atomización suficientemente selectiva del analito, nada impide realizar el calibrado frente a disoluciones acuosas,¹⁰⁹ cuestión que ESSER consideraba casi imprescindible desde un punto de vista de análisis industrial.¹¹⁰

Asimismo, el uso de HR-CS AAS facilita la corrección de la señal de absorción inespecífica, haciendo posible el calibrado con patrones acuosos incluso en situaciones en las que la atomización del analito no sea completamente selectiva. También es posible, en algunas situaciones, medir un patrón interno, lo que puede compensar algunos efectos causados por la matriz.⁶³

I.3.1.4 Influencia de la cantidad de muestra utilizada en los resultados obtenidos

La cantidad de muestra utilizada en las determinaciones mediante SS-GFAAS puede tener una influencia importante en los resultados obtenidos. En primer lugar, dicha cantidad puede seleccionarse convenientemente con el fin de ajustar la sensibilidad del método (sobre todo en el caso de SS-GFAAS) a la concentración del analito en la muestra analizada (seleccionando cantidades pequeñas para muestras concentradas y viceversa) así como para minimizar la influencia de potenciales efectos interferentes procedentes de la matriz (resulta preferible utilizar cantidades pequeñas para muestras poco volátiles, mientras que pueden utilizarse cantidades mayores para muestras orgánicas en las que, presumiblemente, podrá conseguirse más fácilmente la vaporización/atomización selectiva del analito).

Sin embargo, la cantidad de muestra introducida en el horno de grafito también puede tener un efecto negativo en los resultados obtenidos, afectando a la precisión y la exactitud de los mismos. En este sentido, resulta evidente que la introducción de cantidades de muestra muy pequeñas en el sistema de atomización/vaporización no está recomendada para materiales poco homogéneos.

En cuanto a la exactitud, ya en el primero de los trabajos publicados por este grupo de investigación sobre SS-GFAAS se indicó que, aun trabajando dentro del rango lineal de una curva de calibrado obtenida a partir de disoluciones patrón, sólo se obtienen resultados correctos para un cierto rango de masa de muestra introducida en el atomizador.¹¹¹ Los estudios posteriores sobre esta cuestión indican que la tendencia general conlleva la obtención de resultados erróneos por defecto para cantidades de muestra muy elevadas y por exceso para cantidades muy bajas.¹¹²

Para este problema, no se han encontrado hasta el momento soluciones generales, siendo necesaria con frecuencia la realización de un estudio específico en cada caso particular.

I.3.1.5 Obtención y tratamiento de los resultados

El tratamiento final de los resultados obtenidos mediante SS-GFAAS y HR-CS GFAAS es algo más complicado que cuando se trabaja con disoluciones.

Por un lado, en ambas técnicas se observa que la aparición de resultados anómalos (en torno a un 3-5%) y la imprecisión de los resultados (con desviaciones estándar entorno al 15%) es bastante más elevada que cuando se trabaja con muestras disueltas. Este inconveniente puede minimizarse mediante el uso de la mediana que propone BELARRA *et al.*⁵⁶ y elevando el número de medidas que se realizan. Esta forma de trabajo presenta como desventaja el incremento en el tiempo necesario para obtener el resultado.

I.3.1.6 Dificultades derivadas del análisis de nanomateriales

El análisis de nanomateriales conlleva varias dificultades derivadas de la propia naturaleza de los mismos, como son:

a) Limitada cantidad del producto

Habitualmente se trata de materiales con un elevado coste de producción, por lo que la cantidad recibida para su análisis es pequeña. Además, al tratarse muchas veces de materiales en fase de investigación, no es posible obtener más cantidad de producto debido a que se producen solo pequeños lotes de fabricación.

b) Dificultades en su manipulación

No menos problemática resulta la manipulación de algunas muestras de nanomateriales, como por ejemplo los nanotubos de carbono. Por un lado, la peligrosidad de estos nanomateriales fruto de su composición química, superficie, tamaño, forma,... hace que su manipulación deba realizarse con ciertas medidas de protección adecuadas que eviten principalmente el contacto con la piel (guantes), su inhalación (mascarilla) y su posible ingestión.

Por otro lado, el trabajo con partículas de tipo pulverulento conlleva también ciertos problemas de manipulación, fundamentalmente, en la toma y pesada de las muestras, que hace que estas muestras se dispersen fácilmente y contaminen la superficie de trabajo o se adhieran a espátulas u otros medios no deseados debido a su carga electrostática.

c) Dificultades para verificar los resultados de análisis

En el desarrollo de un nuevo método analítico resulta necesaria la validación de los resultados obtenidos bien mediante muestras de referencia de la misma naturaleza que la muestra problema o bien mediante el uso de otras técnicas de análisis sobre la misma muestra problema.

Debido al reciente desarrollo de nanomateriales, no existen todavía muestras de referencia certificadas de naturaleza similar a las muestras analizadas en esta tesis, por lo que se debe recurrir al uso de otras técnicas de análisis sobre las mismas muestras analizadas. Sin embargo, éstas presentan dos grandes inconvenientes. Por un lado, requieren de la puesta en disolución de las muestras, lo que en muchos casos (como son los nanotubos de carbono y las sílices) es complicado debido a la estabilidad química de las muestras. Por otro lado, el proceso de disolución disminuye la concentración del analito en la muestra y en ocasiones puede ser complicado obtener una señal adecuada ya que la concentración puede ser menor que el límite de detección del método.

I.3.2 Metodología de las técnicas de SS-GFAAS y HR-CS-AAS

En la figura I.5 (página 46) se propone una metodología para las determinaciones directas sobre muestras sólidas mediante SS-GFAAS que atiende a las dificultades enunciadas en el apartado anterior y que se va a poner en práctica a lo largo de la presente tesis doctoral. Se parte de la base de disponer de un instrumento que

permite la introducción de las muestras sólidas, que posee un buen sistema de corrección de absorción inespecífica y, por supuesto, capaz de medir absorbancia integrada.

Figura I.5 Diferencias metodológicas entre las determinaciones directas sobre muestras sólidas y sobre disoluciones mediante HR-CS GFAAS y GFAAS.



I.3.2.1 Pretratamiento de la muestra

Debe reducirse al mínimo imprescindible para mantener la rapidez del método. En consecuencia, la pulverización y homogeneización de la muestra sólo se realizarán si el beneficio en la precisión de los resultados es apreciable y necesario. En algunos casos puede ser necesario el secado y molido de la muestra, previo a la introducción de la muestra en el tubo de grafito.

I.3.2.2 Condiciones de trabajo

Debe sustituirse el criterio de utilizar las líneas resonantes de máxima sensibilidad por el de buscar líneas con una sensibilidad y un rango lineal adecuados al contenido del analito en la muestra y que sea capaz de determinar los analitos de interés en el caso de análisis multielemental.

Además, en ocasiones resulta aconsejable mantener el caudal de argón durante la etapa de atomización, en lugar de utilizar las condiciones habituales de trabajo de *stop-flow*. De esta forma se puede disminuir la sensibilidad y reducir algunos efectos de la matriz.

I.3.2.3 Programa de temperaturas

Esta etapa resulta fundamental para conseguir una volatilización y atomización selectiva del analito.

La estrategia a seguir depende de la volatilidad del analito y de la matriz, pudiendo distinguirse tres situaciones distintas:

- a) La matriz es más volátil que el analito, lo que se produce en muchas muestras de naturaleza orgánica. La clave está en eliminar en la etapa de pirólisis la mayor cantidad posible de matriz sin que se produzcan pérdidas del analito.
- b) El analito es más volátil que la matriz, situación propia de muchas muestras de naturaleza inorgánica. En estos casos resulta esencial la temperatura de atomización, que debe ser la mínima que permita una atomización eficaz del analito, con una vaporización mínima de la matriz.

- c) El analito y la matriz tienen una volatilidad parecida, tanto de los analitos más volátiles en muestras orgánicas, como del resto de analitos en muchas matrices inorgánicas. En este caso resulta conveniente cambiar la volatilidad del analito o de la matriz mediante el uso de modificantes químicos. Modificar la volatilidad del analito requiere una solución particular para cada elemento y la modificación de la volatilidad de matrices complejas puede hacer necesario el uso de varios reactivos.

I.3.2.4 Calibrado

Tanto en SS-GFAAS como en HR-CS GFAAS se debe intentar el calibrado frente a patrones disueltos, ya que probablemente sea el único procedimiento que permita la incorporación de estos métodos a los análisis rutinarios. La consecución de este objetivo resulta sencilla o complicada, dependiendo del éxito conseguido en la etapa anterior.

I.3.2.5 Tratamiento de resultados

Dada la escasa precisión del método es importante optimizar el número de medidas que se realizan para obtener un resultado, combinando la exactitud del mismo con el tiempo necesario para obtenerlo.

Debe tenerse siempre en cuenta la posible aparición de resultados anómalos. Su tratamiento dependerá del número de medidas realizadas, de forma que, si éste es elevado ($n \approx 20$), se pueden utilizar los criterios estadísticos habituales, pero si es reducido ($n \approx 5$), parece preferible el uso de la mediana.

Otros dos aspectos fundamentales en el tratamiento de datos que se pueden aplicar únicamente en el caso de HR-CS GFAAS son la selección de los píxeles de medida y la corrección de la señal de fondo. En HR-CS GFAAS es posible ajustar la sensibilidad de las medidas, utilizando un número menor de píxeles o eligiendo los de las alas de la señal en lugar de los centrales. Por otro lado, la técnica HR-CS GFAAS permite también la corrección de la absorción inespecífica

mediante la sustracción de espectros de referencia mediante un algoritmo de mínimos cuadrados (LSBC),¹¹³ lo cual puede mejorar la exactitud de los resultados en situaciones en las que no sea posible conseguir una atomización selectiva.

I.3.2.6 Validación de resultados

Es necesario la verificación del método de análisis desarrollado de forma que se compruebe que el método ofrece resultados con una buena precisión y exactitud para una muestra de referencia certificada (CRM) de naturaleza similar a la muestra problema.

Otra forma de verificar que el método de análisis ofrece buenos resultados analíticos es comparar dichos resultados con los obtenidos para la misma muestra problema con otra técnica de análisis (ICP-OES, ICP-MS, ...). Normalmente, estas técnicas de análisis requieren la disolución de la muestra.

I.4 OBJETIVOS DEL TRABAJO

Como se ha venido comentando a lo largo de este capítulo, un gran número de fuentes predicen que las aplicaciones de las nanotecnologías impregnarán prácticamente todas las áreas de la vida en un futuro próximo y permitirán avances espectaculares en sectores tan diversos como la comunicación o la salud. Fruto de esta situación, actualmente existe una urgente y manifiesta necesidad de proporcionar un conocimiento más profundo de estos todavía novedosos nanomateriales y nanopartículas, en el que se incluye su composición química, como parte fundamental de su caracterización. En este contexto, la espectrometría de absorción atómica por cámara de grafito puede ser una técnica adecuada para el análisis directo de estos nanomateriales que presentan una problemática muy concreta (limitada cantidad de material, dificultad de disolución, bajos contenidos de analitos,...).

El objetivo general de esta tesis doctoral consiste en el desarrollo de métodos de análisis directo para la determinación de

nanopartículas y el análisis directo de nanomateriales mediante espectrometría de absorción atómica. El trabajo pretende investigar algunas de las capacidades de las técnicas SS-GFAAS y SS HR-CS GFAAS que pueden ser especialmente interesantes en el análisis de dichos materiales. Para ello, se han escogido diferentes muestras que presentan problemas por su dificultad de puesta en disolución (sílice nanoestructurada, nanotubos de carbono, *nanocomposites*) o por el bajo nivel de analito esperado (tejidos biológicos expuestos a nanopartículas).

Por otro lado, la reciente aparición de la espectrometría de absorción atómica con fuente continua de alta resolución (HR-CS AAS), añade a las ventajas tradicionales de la técnica de SS-GFAAS con fuente de línea, una serie de capacidades que se pueden ser decisivas a la hora de desarrollar métodos rápidos y fiables de análisis. Por ello, a lo largo de este trabajo se investigarán en más detalle los siguiente aspectos, siempre en el contexto del análisis de nanomateriales:

- a) La HR-CS AAS presenta mejoras importantes para la detección de interferencias espectrales y para su corrección, debido a su elevada resolución (aprox. 1pm a 200 nm) y a la posibilidad de monitorizar todo el entorno espectral de las línea seleccionada de forma simultánea. Este hecho debe permitir la corrección de la señal interferente mediante un algoritmo de mínimos cuadrados (LSBC), incluso en situaciones en las que el nivel de analito sea muy bajos (pg), lo que se puede producir en el caso de la detección de nanopartículas en material biológico.
- b) Pese a que la HR-CS AAS no puede considerarse como una técnica multielemental, existe la posibilidad de medir simultáneamente varios elementos siempre que tengan líneas de absorción próximas, ya que la información de todos los píxeles del detector medidos de forma simultánea se encuentra disponible para el analista. Esta característica se debe traducir en una mayor rapidez de análisis y en menor cantidad de

muestra necesaria, aspectos importantes en el análisis multielemental de nanotubos de carbono. Asimismo, puede permitir el empleo de un estándar interno, cuando sea preciso. Finalmente, la selección de píxeles del detector alejados del centro de la línea puede permitir expandir el rango lineal, lo cual puede ser necesario en el análisis elemental directo de muestras sólidas.

- c) La HR-CS AAS permite la determinación de especies moleculares diatómicas. En concreto, es posible detectar la estructura hiperfina rotacional de transiciones electrónicas de moléculas diatómicas. Estas “líneas” tienen una anchura media de unos pocos picómetros, semejante a la de las líneas atómicas. Esta característica permite la detección de elementos que no era posible abordar mediante GFAAS, como la mayoría de no metales. En este trabajo se estudiará la medida de S, presente en *nanocomposites*.

I.5. BIBLIOGRAFÍA

1. Diario Oficial de Unión Europea, *Recomendación de la comisión de 18 de octubre de 2011 relativa a la definición de nanomaterial*. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu>, accedida por última vez en Junio, 2013.
2. C. Scianca, *El pequeño mundo de los nanomateriales del futuro*. Disponible en: www.masciencia.info/investigacion, accedida por última vez en Junio, 2013.
3. B. Bozeman, P. Laredo, V. Mangematin, *Understanding the emergence and deployment of “nano” S&T*, Research Policy, 2007, 36, 807-812.
4. J. Méndez Vivar, *Los nanomateriales y sus aplicaciones*, Materiales Avanzados, 2005, 4, 25-30.
5. D.R. Paul, L.M. Robeson, *Polymer nanotechnology: Nanocomposites*, Polymer, 2008, 49, 3187-3204.

6. M. Saladin El Naschie, *Nanotechnology for the developing world*, Chaos, Solitons & Fractals, 2006, 30, 769-773.
7. V. Uskoković, *Nanotechnologies: What we do not know*, Technology in Society, 2007, 29, 43-61.
8. M.F. Ashby, P.J. Ferreira, D.L. Schodek, *Nanomaterials, Nanotechnologies and Design. An Introduction for Engineers and Architects. Chapter 1- Nanomaterials, Nanotechnologies: An Overview*, Butterworth Heinemann, 2009, USA.
9. Izvestiya Akademii Nauk SSSR, *Neorganicheskiye Materialy*, Metals, 1982, 3, 12-17.
10. M.C. Roco, *The long view of nanotechnology development: The National Nanotechnology Initiative at 10 years*, Journal of Nanoparticle Research, 2011, 13, 427-445.
11. C.N.R. Rao, F.L. Deepak, G. Gundiah, A. Govindaraj, *Inorganic nanowires*, Progress in Solid State Chemistry, 2003, 31, 5-147.
12. H. Chu, L. Wei, R. Cui, J. Wang, Y. Li, *Carbon Nanotubes Combined with Inorganic Nanomaterials: Preparations and Applications*, Coordination Chemistry Reviews, 2010, 254, 1117-1134.
13. M.G. Lines, *Nanomaterials for practical functional uses*, Journal of Alloys and Compounds, 2008, 449, 242-245.
14. K. Aschberger, C. Micheletti, B. Sokull-Klüttgen, F. M. Christensen, *Analysis of currently available data for characterising the risk of engineered nanomaterials to the environment and human health. Lessons learned from four case studies European Commission, Joint Research Centre (JRC), Institute for Health and Consumer Protection (IHCP)*, 2011, Italy.
15. T. Sheetz, J. Vidal, T. D. Pearson, K. Lozano, *Nanotechnology: Awareness and societal concerns*, Technology in Society, 2005, 27, 329-345.

16. Norma UNE- ISO/TR 12885:2008. *Nanotecnologías. Prácticas de seguridad y salud en lugares de trabajo relacionados con las nanotecnologías*. AENOR, 2010.
17. OECD *Environment, Health and Safety Publications. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials*, No. 27, 2010.
18. EFSA Scientific Committee, *Scientific Opinion on Guidance on the risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain*, *EFSA Journal* 2011; 9(5):2140.
19. Norma UNE-CEN ISO/TS 27687:2008. *Nanotecnologías. Terminología y definiciones para nano-objetos. Nanopartícula, nanofibra y nanopláca*. AENOR, 2010.
20. Y. Chen, S.K. Lunsford, Y. Song, H. Ju, P. Falaras, V. Likodimos, A.G. Kontos, D. D. Dionysiou, *Synthesis, characterization and electrochemical properties of mesoporous zirconia nanomaterials prepared by self-assembling sol-gel method with Tween 20 as a template*, *Chemical Engineering Journal*, 2011, 170, 518-524.
21. C. Ge, F. Lao, W. Li, Y. Li, C. Chen, Y. Qiu, X. Mao, B. Li, Z. Chai, Y. Zhao, *Quantitative analysis of metal impurities in carbon nanotubes: efficacy of different pretreatment protocols for ICPMS spectroscopy*, *Analytical Chemistry*, 2008, 80, 9426-9434.
22. V. Stone, B. Nowack, A. Baun, N. van den Brink, F. von der Kammer, M. Dusinska, R. Handy, S. Hankin, M. Hassellöv, E. Joner, T. F. Fernandes, *Nanomaterials for environmental studies: Classification, reference material issues, and strategies for physico-chemical characterization*, *Science of The Total Environment*, 2010, 408, 1745-1754.
23. C. Blasco, Y. Picó, *Determining nanomaterials in food*, *TrAC- Trends in Analytical Chemistry*, 2011, 30, 84-99.
24. W.E. Bawarski, E. Chidlowsky, D.J. Bharali, S.A. Mousa, *Emerging nanopharmaceuticals*, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2008, 4, 273-282.

25. D.R. Baer, M.H. Engelhard, *XPS analysis of nanostructured materials and biological surfaces*, Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena, 2010, 178-179, 415-432.
26. S. Arepalli, P. Nikolaev, O. Gorelik, V.G. Hadjiev, W. Holmes, B. Files, L.Yowell, *Protocol for the characterization of single-wall carbon nanotube material quality*, Carbon, 2004, 42, 1783-1791.
27. E. Boccaleri, A. Arrais, A. Frache, W. Gianelli, P. Fino, G. Camino, *Comprehensive spectral and instrumental approaches for the easy monitoring of features and purity of different carbon nanostructures for nanocomposite applications*, Materials Science and Engineering B, 2006, 131, 72-82.
28. A. Goldoni, L. Petaccia, L. Gregoratti, B. Kaulich, A. Barinov, S. Lizzit, A. Laurita, L. Sangaletti, R. Larciprete, *Spectroscopic characterization of contaminants and interaction with gases in single-walled carbon nanotubes*, Carbon, 2004, 42, 2099-2112.
29. U. Heitmann, M. Schutz, H. Becker-Ross and S. Florek, *Measurements of the Zeeman-splitting of analytical lines by means of a continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometer with linear charge coupled device array*, Spectrochimica Acta Part B, 1996, 51, 1095-1105.
30. W.H. De Jong, W.I. Hagens, P. Krystek, M.C. Burger, A. J.A.M. Sips, R.E. Geertsma, *Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration*, Biomaterials, 2008, 29, 1912-1919.
31. G.M. Fent, S. W. Casteel, D.Y. Kim, R. Kannan, K. Katti, N.Chanda, K. Katti, *Biodistribution of maltose and gum arabic hybrid gold nanoparticles following IV injection in juvenile swine*, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2009, 5, 128-135.
32. P.A. Mello, L.F. Rodrigues, M.A.G. Nunes, J.C.P. Mattos, E.I. Müller, V.L. Dressler and E.M.M. Flores, *Determination of metal impurities in carbon nanotubes by direct solid sampling electrothermal*

- atomic absorption spectrometry*, Journal of the Brazilian Chemical Society, 2011, 22, 1040-1049.
33. I. Herrmann, U.I. Kramm, S. Fiechter, P. Bogdanoff, *Oxalate supported pyrolysis of CoTMPP as electrocatalysts for the oxygen reduction reaction*, Electrochimica Acta, 2009, 54, 4275-4287.
 34. S. Mohanapriya, V. Lakshminarayana, *Simultaneous purification and spectrophotometric determination of nickel present in as-prepared single-walled carbon nanotubes (SWCNT)*, Talanta, 2007, 71, 493-497.
 35. I.O. Usov, Y.Q. Wang, Q. Li, Y.T. Zhu, R.F. DePaula, P.N. Arendt, *Impurity elements study of carbon nanotubes fabricated by chemical vapor deposition*, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, 2007, 261, 574-577.
 36. J. Kruusma, N. Mould, K. Jurkschat, A. Crossley, C.E. Banks, *Single walled carbon nanotubes contain residual iron oxide impurities which can dominate their electrochemical activity*, Electrochemistry Communications, 2007, 9, 2330-2333.
 37. Z. Darvishi, A. Morsali, *Synthesis and characterization of Nano-bentonite by sonochemical method*, Ultrasonics Sonochemistry, 2011, 18, 238-242.
 38. F. Szabadváry, *History of Analytical Chemistry*, Pergamon Press Ltd, 1966, United Kingdom.
 39. M. Valcárcel, S. Cárdenas, *We need reliable ways to bypass preliminary operations in (bio)chemical measurement*, Trends in Analytical Chemistry, 2002, 21, 211-212.
 40. M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, M.T. Tena, *Analytical viewpoint. Preliminary operations: a pending goal of today's Analytical Chemistry*, Analytical Proceedings, 1993, 30, 276-279.
 41. B.V. L'vov, *An investigation of atomic spectra by complete vapourization of the substance in a graphite cell*, Inzhenerno-Fizicheskii Zhurnal, 1959, 2, 44-52.

42. C. Bendicho, M.T.C. de Loos-Vollebregt, *Solid sampling in electrothermal atomic absorption spectrometry using commercial atomizers: A review*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 1991, 6, 353-374.
43. U. Kurfüst, M. Kempeneer, M. Stoepler, O. Schuierer, *Theory and instrumentation: An automated solid sample analysis system*, Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 1990, 337, 248-252.
44. B.V. L'vov, *Trace characterization of powders by atomic-absorption spectrometry*, Talanta, 1976, 23, 109-118.
45. F.J. Langmyhr, *Direct analysis of solids by atomic-absorption spectrophotometry*, The Analyst, 1979, 104, 993-1016.
46. F.J. Langmyhr, G.Wibetoe, *Direct analysis of solids by atomic-absorption spectrophotometry*, Progress in Analytical Spectroscopy, 8, 193-256.
47. J.B. Headridge, *Determination of trace-elements in metals by atomic-absorption spectrometry with introduction of solid samples into furnaces: An appraisal*, Spectrochimica Acta Part B, 1980, 35, 785-793.
48. J.D. Kerber, *The direct determination of gold in polyester fibers with the HGA-70 graphite furnace*, Atomic Absorption Newsletter, 1971, 10, 104-105.
49. W. Slavin, D.C. Manning, G.R. Carnrick, *The stabilized temperature platform furnace*, Atomic Spectroscopy, 1981, 2, 137-145.
50. N.J. Miller-Ihli, *Solids analysis by GFAAS*, Analytical chemistry, 1992, 64, 964A-968A.
51. K. Akatsuka, I. Atsuya, *Synthetic reference material for direct analysis of solid biological samples by electrothermal atomic absorption spectrometry*, Analytical Chemistry, 1989, 61, 216-220.
52. M. Berglund, D.C. Baxter, *Methods of calibration in the direct analysis of solid samples by electrothermal atomic absorption spectrometry*, Spectrochimica Acta Part B, 1992, 47, 1567-1586.

53. M. Stoeppler, *Introductory remarks on the special tissue being published in conjunction with the colloquium of the state-of-the-art of solid sampling AAS - Wetzlar October 8 -10, 1984*, Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie, 1985, 322, 653-653.
54. U. Kurfüst, *Statistical treatment of ETA-AAS (electrothermal atomisation - atomic absorption spectrometry) solid sampling data of heterogeneous samples*, Pure and Applied Chemistry, 1991, 63, 1205-1211.
55. U. Kurfüst, *Consideration of the uncertainty in the CRM value with the analysis of solid materials using atomic spectrometry*, Accreditation and Quality Assurance, 1998, 3, 406-411.
56. M.A. Belarra, M. Resano, F. Vanhaecke, L. Moens, *Direct solid sampling with electrothermal vaporization/atomization: what for and how?*, Trends in analytical chemistry, 2002, 21, 828-839.
57. M.A. Belarra, M. Resano, J.R. Castillo, *Theoretical evaluation of solid sampling-electrothermal atomic absorption spectrometry for screening purposes*, Journal of analytical atomic spectrometry, 1999, 14, 547-552.
58. V. Krivan, H.M. Dong, *Direct analysis of pieces of materials by solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry demonstrated using high-purity titanium*, Analytical chemistry, 1998, 70, 5312-5321.
59. J. Pauwels, L. De Angelis, K.H. Grobecker, *Solid sampling Zeeman atomic-absorption spectrometry in production and use of certified reference materials*, Pure and applied chemistry, 1991, 63, 1199-1204.
60. K.C. Friese, V. Krivan, *A solid-sampling system for a transversely heated graphite-furnace and its application to trace-element analysis of high purity tantalum powders by atomic-absorption spectrometry*, Spectrochimica Acta Part B, 1998, 53, 1069-1078.
61. M.G.R. Vale, M.M. Silva, B. Welz, R. Nowka, *Control of spectral and non-spectral interferences in the determination of thallium in river and marine sediments using solid sampling electrothermal atomic absorption*

- spectrometry*, Journal of analytical atomic spectrometry, 2002, 17, 38-45.
62. B. Welz, D.L.G. Borges, F. G. Lepri, M. Goreti, M.G.R. Vale, U. Heitmann, *High-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry - An analytical and diagnostic tool for trace analysis*, Spectrochimica Acta Part B, 2007, 62, 873-883.
 63. M. Resano, L. Rello, M. Flórez, M.A. Belarra, *On the possibilities of high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for the simultaneous or sequential monitoring of multiple atomic lines*, Spectrochimica Acta Part B, 2011, 66, 321-327.
 64. D.C. Baxter, W. French, *On the direct analysis of solid samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry*, Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 1990, 337, 253-263.
 65. M. Stoeppler, U. Kurfüst, K.H. Groebecker, *Investigations on the analysis of heavy metals in solids by direct zeeman atomic absorption spectroscopy - V. The homogeneity factor as a criterion for pulverised solid samples*, Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie, 1985, 322, 687-671.
 66. A. Walsh, *The application of atomic absorption spectra to chemical analysis*, Spectrochimica Acta, 1955, 7, 108-117.
 67. B. Welz, H. Becker-Ross, S-Florek, U. Heitmann, *High-Resolution Continuum Source AAS*, Wiley-VCH, 2005, Germany.
 68. <http://www.analytik-jena.de>, accedida por última vez en Junio, 2013.
 69. B. Welz, *High-resolution continuum source AAS – the better way to perform atomic absorption spectrometry*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2005, 381, 69-71.
 70. I.M. Dittert, D.L.G. Borges, B. Welz, A.J. Curtius, H. Becker-Ross, *Determination of silver in geological samples using high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry and direct solid sampling*, Microchimica Acta, 2009, 167, 21-26.

71. A.F. Da Silva, D.L.G. Borges, B. Welz, M.G.R. Vale, M.M. Silva, A. Klassen, U. Heitmann, *Method development for the determination of thallium in coal using solid sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry with continuum source, high-resolution monochromator and CCD array detector*, Spectrochimica Acta Part B, 2004, 59, 841-850.
72. A.F. Da Silva, D.L.G. Borges, F.G. Lepri, B. Welz, A.J. Curtius, U. Heitmann, *Determination of cadmium in coal using solid sampling graphite furnace high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2005, 382, 1835-1840.
73. A.S. Ribeiro, M.A. Vieira, A.F. da Silva, D.L.G. Borges, B. Welz, U. Heitmann, A.J. Curtius, *Determination of cobalt in biological samples by line-source and high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry using solid sampling or alkaline treatment*, Spectrochimica Acta Part B, 2005, 60, 693-698.
74. A.F. Da Silva, F.G. Lepri, D.L.G. Borges, B. Welz, A.J. Curtius, U. Heitmann, *Determination of mercury in biological samples using solid sampling high-resolution continuum source electrothermal atomization atomic absorption spectrometry with calibration against aqueous standards*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2006, 21, 1321-1326.
75. D.L.G. Borges, A.F. Da Silva, A.J. Curtius, B. Welz, U. Heitmann, *Determination of lead in coal using direct solid sampling and high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry*, Microchimica Acta, 2006, 154, 101-107.
76. D.L.G. Borges, A.F. da Silva, B. Welz, A.J. Curtius, U. Heitmann, *Determination of lead in biological samples by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry with direct solid sampling*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2006, 21, 763-769.
77. D. Bohrer, U. Heitmann, M. Huang, H. Becker-Ross, S. Florek, B. Welz, D. Bertagnolli, *Determination of aluminum in highly concentrated iron samples: Study of interferences using high-resolution*

- continuum source atomic absorption spectrometry*, Spectrochimica Acta Part B, 2007, 62, 1012-1018.
78. L.M.G. dos Santos, R.G.O. Araujo, B. Welz, S.D.C. Jacob, M.G.R.Vale, H. Becker-Ross, *Simultaneous determination of Cd and Fe in grain products using direct solid sampling and high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry*, Talanta, 2009, 78, 577-583.
79. L.M.G. Dos Santos, B. Welz, R.G.O. Araujo, S.D.C. Jacob, M.G.R. Vale, A. Martens, I.B. Gonzaga Martens, H. Becker-Ross, *Simultaneous determination of Cd and Fe in beans and soil of different regions of brazil using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct solid sampling*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57, 10089-10094
80. I.M. Dittert, J.S.A. Silva, R. G.O. Araujo, A.J. Curtius, B. Welz, H. Becker-Ross, *Direct and simultaneous determination of Cr and Fe in crude oil using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry*, Spectrochimica Acta Part B, 2009, 64, 537-543.
81. M. Resano, J. Briceño, M.A. Belarra, *Direct determination of Hg in polymers by solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry. A comparison of the performance of line source and continuum source instrumentation*, Spectrochimica Acta Part B, 2009, 64, 520-529.
82. M. Resano, J. Briceño, M.A. Belarra, *Direct determination of phosphorus in biological samples using a solid sampling-high resolution-continuum source electrothermal spectrometer: Comparison of atomic and molecular absorption spectrometry*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2009, 24, 1343-1354.
83. R.G.O. Araujo, B. Welz, F. Vignola, H. Becker-Ross, *Correction of structured molecular background by means of high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry-Determination of antimony in sediment reference materials using direct solid sampling*, Talanta, 2009, 80, 846-852.

84. I.M. Dittert, J.S.A. Silva, R.G.O. Araujo, A.J. Curtius, B. Welz, H. Becker-Ross, *Simultaneous determination of cobalt and vanadium in undiluted crude oil using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2010, 25, 590-595.
85. F.G. Lepri, D. L.G. Borges, R.G.O. Araujo, B. Welz, F. Wendler, M. Krieg, H. Becker-Ross, *Determination of heavy metals in activated charcoals and carbon black for Lyocell fiber production using direct solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption and inductively coupled plasma optical emission spectrometry*, Talanta, 2010, 81, 980-987.
86. F. Wendler, F.G. Lepri, D.L. Borges, R.G.O. Araujo, B. Welz, F. Meister, *Trace element status of activated charcoals and carbon black: influence on thermal stability of modified lyocell solutions*, Journal of Applied Polymer Science, 2010, 116, 3408-3418.
87. H.S. Ferreira, F.G. Lepri, B. Welz, E. Carasek, M.D. Huang, *Determination of sulfur in biological samples using high-resolution molecular absorption spectrometry in a graphite furnace with direct solid sampling*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2010, 25, 1039-1045.
88. R.G.O. Araujo, B. Welz, I.N.B. Castilho, M.G.R. Vale, P. Smichowski, S.L.C. Ferreira, H. Becker-Ross, *Determination of antimony in airborne particulate matter collected on filters using direct solid sampling and high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2010, 25, 580-584.
89. R.G.O. Araujo, F. Vignola, I.N.B. Castilho, D.L.G. Borges, B. Welz, M.G.R. Vale, P. Smichowski, S.L.C. Ferreira, H. Becker-Ross, *Determination of mercury in airborne particulate matter collected on glass fiber filters using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct solid sampling*, Spectrochimica Acta Part B, 2011, 66, 378-382.
90. R. Evens, K. A.C. De Schamphelaere, L. Balcaen, Y. Wang, K. De Roy, M. Resano, M.R. Flórez, P. Van der Meer, N. Boon,

- F. Vanhaecke, C. R. Janssen, *Liposomes as an alternative delivery system for investigating dietary metal toxicity to Daphnia magna*, *Aquatic Toxicology*, 2011, 105, 661-668.
91. J. Briceño, M.A. Belarra, K.A.C. De Schamphelaere, S. Vanblaere, C.R. Janssen, F. Vanhaecke, M. Resano, *Direct determination of Zn in individual Daphnia magna specimens by means of solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2010, 25, 503-510
92. A. Virgilio, J. A. Nóbrega, J.F. Rêgo, J.A.G. Neto, *Evaluation of solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for direct determination of chromium in medicinal plants*, *Spectrochimica Acta Part B*, 2012, 78, 58-61.
93. I.N.B. Castilho, B. Welz, M.G.R. Vale, J.B. De Andrade, P. Smichowski, A.A. Shaltout, L. Colares, E. Carasek, *Comparison of three different sample preparation procedures for the determination of traffic-related elements in airborne particulate matter collected on glass fiber filters*, *Talanta*, 2012, 88, 689-695.
94. R. Evens, K.A.C. De Schamphelaere, L. Balcaen, Y. Wang, K. De Roy, M. Resano, M. Flórez, N. Boon, F. Vanhaecke, C. R. Janssen, *The use of liposomes to differentiate between the effects of nickel accumulation and altered food quality in Daphnia magna exposed to dietary nickel*, *Aquatic Toxicology*, 2012, 109, 80-89.
95. J. Figuerêdo Rêgo, A. Virgilio, J.A. Nóbrega, J.A.G. Neto, *Determination of lead in medicinal plants by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry using direct solid sampling*, *Talanta*, 2012, 100, 21-26.
96. S. Atilgan, S. Akman, A. Baysal, Y. Bakircioglu, T. Szigeti, M. Óvári, G. Zárny, *Monitoring of Pd in airborne particulates by solid sampling high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry*, *Spectrochimica Acta Part B*, 2012, 70, 33-38.

97. M. Resano, M.R. Flórez, *Direct determination of sulfur in solid samples by means of high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry using palladium nanoparticles as chemical modifier*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2012, 27, 401-412.
98. M. Resano, A.C. Lapeña, M.A. Belarra, *Potential of solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry to monitor the Ag body burden in individual Daphnia magna specimens exposed to Ag nanoparticles*, Analytical Methods, 2013, 5, 1130-1139.
99. R. G.O. Araujo, F. Vignola, I.N.B. Castilho, B. Welz, M.G.R. Vale, P. Smichowski, S.L.C. Ferreira, H. Becker-Ross, *Determination of silver in airborne particulate matter collected on glass fiber filters using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct solid sampling*, Microchemical Journal, 2013, 109, 36-40.
100. A.T. Duarte, M.B. Dessuy, M.G.R. Vale, B. Welz, J.B. De Andrade, *Sequential determination of Cd and Cr in biomass samples and their ashes using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct solid sample analysis*, Talanta, 2013, 115, 55-60.
101. L. Rello, A.C. Lapeña, M. Aramendía, M.A. Belarra, M. Resano, *A dried urine spot test to simultaneously monitor Mo and Ti levels using solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry*, Spectrochimica Acta Part B, 2013, 81, 11-19.
102. S. Gunduz, S. Akman, *Determination of lead in rice grains by solid sampling HR-CS GFAAS*, Food Chemistry, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.020>
103. L.-J. Zhao, T. Ren, R.-G. Zhong, *Determination of Lead in Human Hair by High Resolution Continuum Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry with Microwave Digestion and Solid Sampling*, Analytical Letters, 2012, 45, 2467-2481.

104. S. Gunduz, S. Akman, *Investigation of lead contents in lipsticks by solid sampling high resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry*, Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2013, 65, 34-37.
105. R. Mior, S. Morés, B. Welz, E. Carasek, J.B. De Andrade, *Determination of sulfur in coal using direct solid sampling and high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry of the CS molecule in a graphite furnace*, Talanta, 2013, 106, 368-374
106. M.A. Belarra, M. Resano, S. Rodríguez, J. Urchaga, J.R. Castillo, *Use of chemical modifiers in the determination of cadmium in sewage sludge and tin in PVC by solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry*, Spectrochimica Acta Part B, 1999, 54, 787-795.
107. D.C. Baxter, *Evaluation of the simplified generalised standard additions method for calibration in the direct analysis of solid samples by graphite furnace atomic spectrometric techniques*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 1989, 4, 415-421.
108. U. Kurfüst, *Instrumental requirements, analytical performance and characteristics for the analysis of solid samples by GF-AAS*, Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie, 1987, 328, 316-318
109. U. Völlkopf, Z. Grobowski, R. Tamm, B. Welz, *Solid sampling in graphite furnace atomic-absorption spectrometry using the cup-in-tube technique*, The Analyst, 1985, 110, 573-575.
110. P. Esser, *Direct analysis of inorganic solids: Experiences of a laboratory in cement industries*, Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie, 1985, 322, 677-680.
111. M.A. Belarra, I. Lavilla, J.M. Anzano, J.R. Castillo, *Rapid determination of lead by analysis of solid samples using graphite furnace atomic absorption spectrometry*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 1992, 7, 1075-1078.
112. M.A. Belarra, C. Crespo, M.P. Martínez-Garbayo, J.R. Castillo, *Direct determination of metals in solid samples by graphite-furnace atomic*

absorption spectrometry: Does sample mass influence the analytical results?, Spectrochimica Acta Part B, 1997, 52, 1855-1860.

113. H. Becker-Ross, M. Okruss, S. Florek, U. Heitmann, M.D. Huang, *Echelle-spectrograph as a tool for studies of structured background in flame atomic absorption spectrometry*, Spectrochimica Acta Part B, 2002, 57, 1493-1504.

Capítulo II.

Experimental

“Yo tenía con frecuencia ese mismo problema, el de tener que demostrar a aquellos tíos descreídos cosas que no estaban dispuestos a creer. Por ejemplo, (...) la vez en que otro soltó que al tomar aspirina y Coca-cola uno se desmayaba inmediatamente. Les dije que me parecía una trola como un castillo, y me ofrecí yo a tomar la aspirina y la Coca-cola. Entonces se pusieron a discutir si había que tomar la aspirina antes que la Coca-cola, o justo después, o mezclada con ella. Así que tuve que tomarme seis aspirinas y tres ‘cocas’, una detrás de otra. Primero me tomé dos aspirinas, y encima, una Coca-cola. Después desleímos dos aspirinas en una Coca-Cola y me la bebí; finalmente me tuve que beber una Coca-cola y engullir un par de aspirinas. En cada ocasión, los necios que se tragarón el cuento me rodeaban, atentos a sujetarme en cuanto me desmayase. Pero nada ocurrió. Recuerdo, en cambio, que aquella noche no pude dormir muy bien, así que me levanté, hice un montón de cálculos, y desarrollé algunas de las fórmulas de la llamada ‘función zeta’ de Riemann.”

Richard P. Feynmann en “¿Esta Ud. De broma, Sr. Feynmann?”

II.1 INSTRUMENTACIÓN

Para la obtención de los resultados presentados en los distintos apartados de esta memoria se utilizaron los siguientes instrumentos:

- a) Instrumento de absorción atómica modelo ZEE nit 60, con cámara de grafito de calentamiento transversal y corrector de absorción inespecífica Zeeman. El instrumento está dotado de microprocesador, monitor e impresora y dispone de un dispositivo automático para la introducción de muestras sólidas Analytik Jena SSA 61, que lleva incorporado una balanza Sartorius M2P con precisión de un microgramo. Con este instrumento se utilizaron lámparas de cátodo hueco de Analytik Jena de Cu, Cr, Cd, As, Pb, Sb y Hg.
- b) Instrumento de absorción atómica de alta resolución con fuente continua Analytik Jena modelo ContrAA700. Este instrumento tiene como sistema atomizador un tubo de grafito de calentamiento transversal y dispone también de una microbalanza Sartorius M2P con precisión de un microgramo. Las características esenciales del instrumento de alta resolución con fuente continua (ContrAA 700) se han descrito en el apartado I.2.4.2. de esta memoria (lámpara de xenón, doble monocromador y detector CCD). Este instrumento también está equipado con un accesorio para la introducción de muestras sólidas (SSA 600).
- c) Instrumento de emisión atómica (ICP-OES) Horiba JobinYvon modelo ACTIVA™. El equipo incorpora un montaje óptico Czerny-Turner de 0.64 m de distancia focal. El instrumento está dotado también de un detector CCD con Retro Iluminación. El espectrómetro cubre el rango espectral de 165 a 800 nm. Para los análisis, se han utilizado accesorios estándar (antorcha, nebulizador, cámara de nebulización e inyector), todos de cuarzo, así como accesorios resistentes a la presencia de ácido fluorhídrico (antorcha de alúmina,

nebulizador y cámara de nebulización de politetrafluoroetileno e inyector de poliéter-cetona).

- d) Espectrómetros de masas (ICP-MS) de Perkin Elmer modelos DRC Plus y Nexion X equipados con una celda de reacción para solucionar interferencias espectrales. Para estos equipos se utilizaron cámaras de nebulización ciclónicas de cuarzo.
- e) Horno microondas Ethos One de Milestone Inc. que se usa para la digestión de muestras. El equipo está dotado de un sistema de doble magnetrón con difusor piramidal para distribución homogénea de las microondas en la cavidad, con una capacidad de potencia suministrada de 1500 W, control de temperatura ATC 400CE para medida directa de la temperatura del interior de un vaso de reacción y control de temperatura mediante infrarrojo IRT para medida externa de la temperatura de todos los vasos. El equipo presenta un rotor segmentado de alta presión modelo HPR-1000/10S que está preparado para trabajar con 10 vasos, una presión de 100 bar (1.500 psi) y una temperatura operativa máxima de 260°C (para periodos prolongados de tiempo) o 300°C (por intervalos cortos).

Además de estos instrumentos, también se utilizaron en distintas partes del trabajo:

- Balanza de precisión Sartorius, modelo MC210S con precisión de centésima de miligramo.
- Balanza de precisión Mettler Toledo, modelo AE100, con precisión de décima de miligramo.
- Balanza de precisión Mettler Toledo, modelo AB204, con precisión de décima de miligramo.
- Micropipetas Gilson Pipetman y Micropipetas de Mettler Toledo de distintos volúmenes, utilizadas para la preparación de los patrones de calibrado.

- Estufa de desecación Memmert que permite alcanzar hasta 220° C.
- Placa calefactora fabricada por Bibby modelo B290
- Placa calefactora vitrocerámica de Schott Instruments modelo SLK2
- Equipo de obtención de agua ultrapura Millipore, Modelo Milli-Q Plus. Conductividad, 18 $\mu\text{S cm}^{-1}$.
- Aplicación Excel 2011 para Mac (versión 14.3.2), Microsoft Office Excel 2007 y Aabel (versión 3.0) para el tratamiento estadístico de los datos y la representación de las figuras.

II.2 REACTIVOS Y DISOLUCIONES

II.2.1 Reactivos

Los reactivos utilizados para la realización del trabajo experimental de esta memoria son los siguientes:

- Para la preparación de las disoluciones patrón de los analitos.
Disoluciones patrón comerciales de 1000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Sb, S, Au, Cr, Fe, Al, Ni, Co y multielemental (todas ellas de Merck), As (de Horiba Jobin Yvon), Pb (de Panreac) y Hg de 1008 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (de Inorganic Ventures).
- Para su uso como modificantes químicos.
Polvo de grafito Analytik Jena como modificante para la protección de la plataforma. Disolución patrón comercial de paladio de 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, de rutenio de 1000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (ambas de Merck) sal de permanganato de potasio de Scharlau, ácido nítrico al 65% de Scharlau, polivinilpirrolidona (de Alfa Aesar) y etanol al 90% (de Alfa Aesar).
- Para la disolución de las muestras.

Ácido nítrico al 65%, ácido clorhídrico al 37%, ácido fluorhídrico al 48% y ácido sulfúrico al 96% todos ellos de calidad analítica de Scharlau y agua milli-Q. También se utilizó ácido bórico en polvo de Scharlau.

- Para el análisis mediante ICP-OES

En el caso de análisis de Hg, As y Sb en sílices, se utilizó una ácido clorhídrico al 37% y NaOH y NaBH₄, ambos disponibles como sólidos. Todos ellos fueron suministrados por Scharlau.

II.2.2 Disoluciones patrón

La preparación de las disoluciones patrón se realizó mediante las diluciones adecuadas de las disoluciones patrón comerciales empleando H₂O (S), HNO₃ (Cr, Fe, Al, Ni, Co, As, Pb, Hg, y patrón multielemental) ó HCl (Au y Sb) diluidos al 1%.

II.2.3 Disoluciones de modificantes químicos

Como modificantes químicos se utilizaron los siguientes reactivos:

- Ácido nítrico concentrado al 65%.
- Disoluciones de paladio a distintas concentraciones mediante las adecuadas diluciones de la disolución comercial de 10 g · L⁻¹.
- Disolución de sal de permanganato de potasio de 15 g · L⁻¹.
- Solución de nanopartículas de Pd.

Esta solución se prepara mezclando con agitación y a reflujo durante 3 horas 11 mL de la solución patrón comercial de Pd(NO₃)₂ de 10 g · L⁻¹ con 20 mL de una solución acuosa de polivinilpirrolidona (PVP). Esta última solución de PVP se prepara disolviendo 264 mg de PVP en 100 mL de agua milli-Q con 25 mL de etanol. Este procedimiento viene descrito en TERANISHI *et al.*¹.

- Tratamiento del tubo y plataforma para las determinaciones de S en *nanocomposites*.

Este tratamiento consiste en el recubrimiento con rutenio mediante deposición térmica siguiendo el procedimiento descrito por VALE *et al.*². En este procedimiento, se realizan 10 inyecciones repetitivas de 40 μL de una solución estándar de rutenio de $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Después de cada inyección se lleva a cabo el programa de temperatura descrito en la tabla II.1 (en la página 73). Este procedimiento se repite también cada 20 determinaciones con una inyección de la disolución de rutenio seguida del programa de temperatura.

Tabla II.1 Programa de temperatura usado para la deposición térmica de rutenio

Etapa	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Rampa ($^{\circ}\text{C} \text{ s}^{-1}$)	Mantenimiento (s)	Caudal de gas ($\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$)
Secado	100	7	10	2.0
Secado	130	7	40	2.0
Secado	160	100	60	2.0
Pirólisis	1000	100	20	2.0
Pirólisis	1400	100	5	0.1
Pirólisis	2000	100	5	0.1

II.3 MUESTRAS ESTUDIADAS

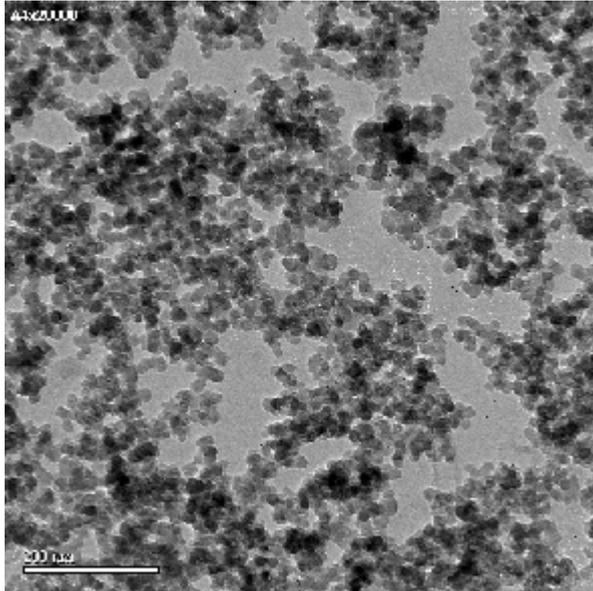
Las muestras que se han utilizado en este estudio, junto con los analitos determinados y sus características más importantes, se presentan en la tabla II.2 (página 78). A continuación, se muestra una breve descripción de cada tipo de muestra:

- Sílice amorfa

Las muestras de sílice amorfa (SAS, *Synthetic amorphous silica*) analizadas presentan un aspecto pulverulento y son un producto comercial manufacturado por la empresa Industrias

Químicas del Ebro (IQE, Zaragoza). Se trata de un material de alta pureza en dióxido de silicio que puede producirse en distintas formas (silica gel, silica pirogénica,...). La sílice precipitada es un material nanoestructurado con partículas primarias entre los 5 y 50 nm. Estas partículas primarias forman agregados de tamaño entre los 100 y 1000 nm y aglomerados entre 1 y 250 μm dependiendo del tipo de sílice.

Figura II.1 Imagen TEM de sílice precipitada amorfa



- Arena

Las muestras de arena fueron suministradas por la empresa Industrias Químicas del Ebro (IQE, Zaragoza) tal y como esta empresa las adquiere a su vez de su proveedor.

- Órganos de ratón expuestos a AuNPs

Las suspensiones de nanopartículas de oro (AuNPs) utilizadas en este estudio fueron suministradas por la empresa Midatech. Esta empresa fabricó las AuNPs siguiendo un procedimiento que permite la producción de pequeños nanocluster (diámetro medio de 1.8 nm medido mediante TEM) solubles en agua mediante su funcionalización con antígenos³ como el citrato,

glucosa, glutatión o lactosa. Las partículas se prepararon mediante la reducción *in situ* de una sal de Au en presencia de un exceso del correspondiente neo-glicoconjugado derivado del tiol. La manipulación del ratio entre la sal de Au y el ligando orgánico permite el control del tamaño y polivalencia de las nanopartículas. Este procedimiento asegura la solubilidad en agua de las nanopartículas resultantes y una alta estabilidad para su almacenamiento, así como la resistencia a su degradación enzimática. Todas las soluciones de nanopartículas de Au (AuNPs) se almacenaron a temperatura ambiente y protegieron de la luz hasta su uso.

Los órganos de ratón analizados (cerebro, corazón, riñones, hígado, pulmones, bazo y sangre) fueron suministrados también por la empresa Midatech tras la realización de un estudio *in vivo* de distribución de nanopartículas de Au.

Para este estudio se utilizaron ratones de la cepa ICR-CD-1 con una edad de entre 8 y 10 semanas y un peso comprendido entre 26 y 30 gramos. Los animales se guardaron en jaulas en condiciones óptimas de luz y temperatura en grupos de tres y se alimentaron *ad libitum*. Se mantuvieron en cuarentena durante una semana antes de su tratamiento con AuNPs. Tras este tiempo, se les administró las suspensiones de AuNPs mediante inyección en la vena del rabo en una dosis de 0.5 g · kg⁻¹. Posteriormente, se sacrificó a dos animales tras cinco periodos de tiempo diferentes (1, 2, 4, 8 y 16 horas). Dos minutos antes del sacrificio, se les anestesió con 50 mg · kg⁻¹ de pentobarbital de sodio. Posteriormente, se les extrajo la sangre mediante una punción cardíaca y se recogió en tubos de EDTA K2E y se guardó a 4°C hasta su centrifugación a 3500 rpm durante 10 min. El plasma obtenido se congeló a -80°C. Finalmente se les diseccionó para obtener los órganos de estudio: cerebro, corazón, riñones, hígado, pulmones y bazo y todos ellos se congelaron a -80°C. Este trabajo se realizó en un laboratorio en Suiza.

Figura II.2 Muestra de SWCNT (muestra D, 2LV-BIO-SWCNT-1) e imagen SEM de la misma



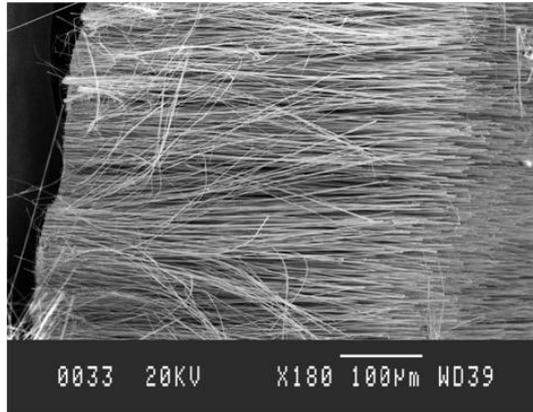
- Nanotubos de carbono

Se analizaron cuatro muestras de nanotubos de carbono. Tres de ellas son muestras comerciales de nanotubos de tipo multiwall (MWCNT):

- Muestra A: de 10-30 nm diámetro externo y 1-2 μm de longitud disponible en Nanostructured & Amorphous Materials, Inc. (Houston, USA)
- Muestra B: de 50-80 nm diámetro externo y 10-20 μm de longitud disponible en Nanostructured & Amorphous Materials, Inc. (Houston, USA)
- Muestra C: de 10 nm diámetro externo y 1.5 μm de longitud disponible en Nanocyl (Sambreville, Belgium)
- La cuarta muestra (Muestra D) son nanotubos de carbono de tipo Single Wall (SWCNT) y se trata de un material candidato a ser material de referencia por National Research Council Canada (2LV-BIO-SWCNT-1). El material, de aspecto pulverulento, está formado por nanotubos de 5-6 μm de longitud y 1.2-1.6 nm de diámetro. Se ha fabricado mediante vaporización laser a partir de carbono renovable usando un catalizador de Ni/Co. Presenta un tamaño de partícula tal que la muestra

atraviesa un tamiz de 400 μm . El material es trasvasado a botes de 100 mg aproximadamente en atmósfera de Ar.

Figura II.2 Imagen TEM de nanohilos de MoS₂



- *Nanocomposites* con nanopartículas MoS₂ y Mo_xS_yI_z

Las tres matrices poliméricas usadas para los *nanocomposites* fueron:

- Polipropileno (PP) isotáctico comercial de Sigma Aldrich de peso molecular medio 340,000.
- Polietilentereftalato (PET) comercial de DSM Arnite DO4 300.
- Poliamida 6 (PA) en su grado estándar suministrada por la empresa SAMCA.

Los nanohilos usados para la mezcla fueron tres:

- MoS₂
- Mo₆S₂I₈
- Mo₆S₃I₆

Los tres fueron suministrados por el Jozef-Stefan-Institute, (Ljubliana, Slovenia). Estos nanorefuerzos fabricados en laboratorio presentan un aspecto pulverulento a simple vista, sin embargo, tienen una estructura en nanohilos, todos con la

misma longitud de $500 \mu\text{m} \pm 10\%$, que se agrupan en paquetes de ancho relativamente uniforme de 200 nm.

Finalmente, los *nanocomposites* analizados fueron cinco en total:

- PA+2%MoS₂
- PA+2%Mo₆S₂I₈
- PP+1.5%MoS₂
- PP+1.5%Mo₆S₂I₈
- PET+3%Mo₆S₃I₆

Estos materiales fueron suministrados por el Instituto Tecnológico de Aragón (ITA) dónde habían sido fabricados a partir de polímeros comerciales y el nanorefuerzo mediante mezcla directa en fundido usando una microextrusora y una microinyectora de DSM.

Tabla II.2 Principales características de las muestras estudiadas

Muestra	Analito	Contenido ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Sílice amorfa (IQE)	As	<0.04
	Cd	<0.002
	Cu	1.30 ± 0.13
	Cr	1.28 ± 0.10
	Hg	<0.03
	Pb	1.17 ± 0.11
	Sb	<0.04
Muestras de Arena (IQE)	Pb	De 0.85 a 2.90
Roca (CRM NCSDC 73304)	As	8.8 ± 0.4
	Cd	0.059 ± 0.003
	Cu	18.6 ± 1.3
	Cr	21.2 ± 1.1
	Pb	7.1 ± 0.4
	Sb	0.57 ± 0.03
Suelo (CRM 021-100 Metals on Soil de RTC)	Hg	5.1 ± 0.3

Muestra	Analito	Contenido ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Orgános de ratón (Midatech)		
Cerebro		De 0.2 a 0.4
Bazo		De 1 a 4
Hígado	Au	De 1 a 64
Riñón		De 9 a 11
Corazón		De 1.4 a 5
Pulmones		De 1 a 8
Sangre		De 1.4 a 5.5
Nanotubos de carbono	Cr	11.5 \pm 2.1
Muestra A (MWCNT) (Nanostructured & Amorphous Materials, Inc.)	Al	6.9 \pm 0.73
	Pb	0.46 \pm 0.06
	Ni	5100 \pm 830
Muestra B (MWCNT) (Nanostructured & Amorphous Materials, Inc.)	Cr	22.7 \pm 2.5
	Al	26.5 \pm 2.6
	Fe	430 \pm 40
	Pb	0.35 \pm 0.06
	Ni	18000 \pm 1400
Muestra C (MWCNT) (Nanocyl)	Fe	3100 \pm 200
	Co	2200 \pm 300
Muestra D (SWCNT) (NRC)	Cr	189 \pm 34
	Al	369 \pm 70
	Fe	2700 \pm 400
	Pb	6.9 \pm 1.3
	Co	18400 \pm 2500
	Ni	18200 \pm 2500
Nanocomposites (ITA)		
PA+2%MoS ₂		6456 \pm 549
PA+2%Mo ₆ S ₂ I ₈	S	1030 \pm 73
PP+1.5%MoS ₂		4003 \pm 470
PP+1.5%Mo ₆ S ₂ I ₈		424 \pm 42
PET+3%Mo ₆ S ₃ I ₆		2867 \pm 130

II.4 PARÁMETROS INSTRUMENTALES

Las condiciones de trabajo utilizadas finalmente para realizar las determinaciones mediante SS-GFAAS ó SS HR-CS GFAAS se presentan en las tablas II.3 a II.13 (páginas 80 a 90).

Tabla II.3 Parámetros instrumentales utilizados para las determinaciones de arsénico en sílice amorfa mediante SS-GFAAS

Instrumento	Jena-ZEE nit 60
Longitud de onda (nm)	197.2
Corrección de absorción inespecífica	Zeeman
Modificador Protección Plataforma	Polvo de grafito
Modificador químico	5 µg Pd
Masa de CRM (mg)	≈ 0.1-0.3
Masa de muestra de sílice (mg)	≈ 1.0
Etapas de secado	
Temperatura (°C)	150
Rampa (°C s ⁻¹)	20
Estancia (s)	30
Caudal de argón (L min ⁻¹)	2
Etapas de pirólisis	
Temperatura (°C)	800
Rampa (°C s ⁻¹)	100
Estancia (s)	20
Caudal de argón (L min ⁻¹)	2
Etapas de atomización	
Temperatura (°C)	2400
Rampa (°C s ⁻¹)	2000
Estancia (s)	4
Caudal de argón (L min ⁻¹)	0
Etapas de limpieza	
Temperatura (°C)	2700
Rampa (°C s ⁻¹)	2000
Estancia (s)	4
Caudal de argón (L min ⁻¹)	2

Tabla II.4 Parámetros instrumentales utilizados para las determinaciones de cadmio en sílice amorfa mediante SS-GFAAS

Instrumento	Jena-ZEEnit 60
Longitud de onda (nm)	228.8
Corrección de absorción inespecífica	Zeeman
Modificante Protección Plataforma	No
Modificante químico	
Masa de CRM (mg)	≈ 0.2-0.5
Masa de muestra de sílice (mg)	≈ 1.0
Etapa de secado	
Temperatura (°C)	150
Rampa (°C s ⁻¹)	20
Estancia (s)	30
Caudal de argón (L min ⁻¹)	2
Etapa de pirólisis	
Temperatura (°C)	600
Rampa (°C s ⁻¹)	100
Estancia (s)	20
Caudal de argón (L min ⁻¹)	2
Etapa de atomización	
Temperatura (°C)	2200
Rampa (°C s ⁻¹)	2000
Estancia (s)	4
Caudal de argón (L min ⁻¹)	0
Etapa de limpieza	
Temperatura (°C)	2700
Rampa (°C s ⁻¹)	2000
Estancia (s)	4
Caudal de argón (L min ⁻¹)	2

Tabla II.5 Parámetros instrumentales utilizados para las determinaciones de cobre en sílice amorfa mediante SS-GFAAS

Instrumento	Jena-ZEEnit 60
Longitud de onda (nm)	327.4
Corrección de absorción inespecífica	Zeeman
Modificante Protección Plataforma	--
Modificante químico	--
Masa de CRM (mg)	≈ 0.1-0.2
Masa de muestra de sílice (mg)	≈ 0.5-1.0
Etapa de secado	
Temperatura (°C)	150
Rampa (°C s ⁻¹)	20
Estancia (s)	30
Caudal de argón (L min ⁻¹)	2
Etapa de pirólisis	
Temperatura (°C)	1000
Rampa (°C s ⁻¹)	200
Estancia (s)	30
Caudal de argón (L min ⁻¹)	2
Etapa de atomización	
Temperatura (°C)	2500
Rampa (°C s ⁻¹)	2000
Estancia (s)	6
Caudal de argón (L min ⁻¹)	0
Etapa de limpieza	
Temperatura (°C)	2700
Rampa (°C s ⁻¹)	2000
Estancia (s)	4
Caudal de argón (L min ⁻¹)	2

Tabla II.6 Parámetros instrumentales utilizados para las determinaciones de cromo en sílice amorfa mediante SS-GFAAS

Instrumento	Jena-ZEEnit 60
Longitud de onda (nm)	427.5
Corrección de absorción inespecífica	Zeeman
Modificante protección plataforma	Polvo de grafito
Modificante químico	15 μ L 65% HNO ₃
Masa de CRM (mg)	\approx 0.2-0.5
Masa de muestra de sílice (mg)	\approx 0.5-1.0
Etapa de secado	
Temperatura (°C)	150
Rampa (°C s ⁻¹)	20
Estancia (s)	30
Caudal de argón (L min ⁻¹)	2
Etapa de pirólisis	
Temperatura (°C)	1000
Rampa (°C s ⁻¹)	300
Estancia (s)	20
Caudal de argón (L min ⁻¹)	2
Etapa de atomización	
Temperatura (°C)	2500
Rampa (°C s ⁻¹)	1200
Estancia (s)	6
Caudal de argón (L min ⁻¹)	1
Etapa de limpieza	
Temperatura (°C)	2700
Rampa (°C s ⁻¹)	2000
Estancia (s)	4
Caudal de argón (L min ⁻¹)	2

Tabla II.7 Parámetros instrumentales utilizados para las determinaciones de plomo en sílice amorfa mediante SS-GFAAS

Instrumento	Jena-ZEEnit 60
Longitud de onda (nm)	283.3
Corrección de absorción inespecífica	Zeeman
Modificante protección plataforma	Polvo de grafito
Modificante químico	--
Masa de CRM (mg)	≈ 0.2-0.5
Masa de muestra de sílice (mg)	≈ 0.5-1.0
Etapas de secado	
Temperatura (°C)	150
Rampa (°C s ⁻¹)	20
Estancia (s)	30
Caudal de argón (L min ⁻¹)	2
Etapas de pirólisis	
Temperatura (°C)	700
Rampa (°C s ⁻¹)	300
Estancia (s)	30
Caudal de argón (L min ⁻¹)	2
Etapas de atomización	
Temperatura (°C)	2400
Rampa (°C s ⁻¹)	2000
Estancia (s)	3
Caudal de argón (L min ⁻¹)	0
Etapas de limpieza	
Temperatura (°C)	2700
Rampa (°C s ⁻¹)	2000
Estancia (s)	4
Caudal de argón (L min ⁻¹)	2

Tabla II.8 Parámetros instrumentales utilizados para las determinaciones de antimonio en sílice amorfa mediante SS-GFAAS

Instrumento	Jena-ZEEnit 60
Longitud de onda (nm)	217.6
Corrección de absorción inespecífica	Zeeman
Modificante protección plataforma	Polvo de grafito
Modificante químico	5 μg Pd
Masa de CRM (mg)	\approx 0.4-0.7
Masa de muestra de sílice (mg)	\approx 1.0
Etapa de secado	
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	150
Rampa ($^{\circ}\text{C s}^{-1}$)	20
Estancia (s)	30
Caudal de argón (L min^{-1})	2
Etapa de pirólisis	
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	1500
Rampa ($^{\circ}\text{C s}^{-1}$)	500
Estancia (s)	10
Caudal de argón (L min^{-1})	2
Etapa de atomización	
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	2500
Rampa ($^{\circ}\text{C s}^{-1}$)	2000
Estancia (s)	2.5
Caudal de argón (L min^{-1})	0
Etapa de limpieza	
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	2700
Rampa ($^{\circ}\text{C s}^{-1}$)	2000
Estancia (s)	4
Caudal de argón (L min^{-1})	2

Tabla II.9 Parámetros instrumentales utilizados para las determinaciones de mercurio en sílice amorfa mediante SS-GFAAS

Instrumento	Jena-ZEEnit 60
Longitud de onda (nm)	253.7
Corrección de absorción inespecífica	Zeeman
Modificante Protección Plataforma	150 μg KMnO_4
Modificante químico	
Masa de CRM (mg)	$\approx 0.4-0.7$
Masa de muestra de sílice (mg)	≈ 1.0
Etapas de secado	
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	150
Rampa ($^{\circ}\text{C s}^{-1}$)	20
Estancia (s)	30
Caudal de argón (L min^{-1})	2
Etapas de pirólisis^a	
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	600
Rampa ($^{\circ}\text{C s}^{-1}$)	1000
Estancia (s)	6
Caudal de argón (L min^{-1})	2
Etapas de atomización	
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	1200
Rampa ($^{\circ}\text{C s}^{-1}$)	2000
Estancia (s)	4
Caudal de argón (L min^{-1})	0
Etapas de limpieza	
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	1700
Rampa ($^{\circ}\text{C s}^{-1}$)	1000
Estancia (s)	4
Caudal de argón (L min^{-1})	2

^aPara la medida de patrones acuosos, la etapa de pirólisis se omitió para evitar pérdidas de analito.

Tabla II.10 Parámetros instrumentales utilizados para las determinaciones de oro en órganos de ratón mediante SS HR-CS GFAAS

Instrumento	ContrAA700
Longitud de onda (nm)	242.795 ^a
Número de píxeles sumados del detector	3 (≈ 4.2 pm)
Modificante químico	2 μg Pd
Masa de muestras de cerebro (mg)	3
Masa del resto de órganos (mg)	≈ 0.3 -1.0
Etapa de secado	
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	160
Rampa ($^{\circ}\text{C s}^{-1}$)	10
Estancia (s)	48
Caudal de argón (L min^{-1})	2
Etapa de pirólisis	
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	1100
Rampa ($^{\circ}\text{C s}^{-1}$)	30
Estancia (s)	30
Caudal de argón (L min^{-1})	2
Etapa de atomización	
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	2200
Rampa ($^{\circ}\text{C s}^{-1}$)	1750
Estancia (s)	5
Caudal de argón (L min^{-1})	0 ^a
Etapa de limpieza	
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	2450
Rampa ($^{\circ}\text{C s}^{-1}$)	500
Estancia (s)	4
Caudal de argón (L min^{-1})	2

^aEn el caso de muestras de riñón (AuNP recubiertas con glucosa) e hígado (AuNP recubiertas con lactosa) se usa la línea 267.595 con el máximo caudal de argón en atomización (2 L min^{-1}).

Tabla II.11 Parámetros instrumentales utilizados para las determinaciones simultáneas de cobalto, hierro, níquel y plomo en nanotubos de carbono mediante SS HR-CS GFAAS

Instrumento	ContrAA700
Longitud de onda (nm)	Co: 283.393 y 283.443 Fe: 283.245 Ni: 283.455 Pb: 283.306
Nº de píxeles sumados del detector	3 ($\approx 4.7 \mu\text{m}$)
Modificante químico	100 ng Pd
Masa de muestra (mg)	$\approx 0.1-0.5$
1ª Etapa de secado	
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	90
Rampa ($^{\circ}\text{C s}^{-1}$)	6
Estancia (s)	20
Caudal de Argón (L min^{-1})	2
2ª Etapa de secado	
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	120
Rampa ($^{\circ}\text{C s}^{-1}$)	5
Estancia (s)	30
Caudal de Argón (L min^{-1})	2
Etapa de pirólisis	
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	800
Rampa ($^{\circ}\text{C s}^{-1}$)	300
Estancia (s)	30
Caudal de Argón (L min^{-1})	2
Etapa de atomización	
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	2500
Rampa ($^{\circ}\text{C s}^{-1}$)	1200
Estancia (s)	10
Caudal de Argón (L min^{-1})	0
Etapa de limpieza	
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	2600
Rampa ($^{\circ}\text{C s}^{-1}$)	500
Estancia (s)	4
Caudal de Argón (L min^{-1})	2

Tabla II.12 Parámetros instrumentales utilizados para las determinaciones simultáneas de cromo y aluminio en CNTs mediante SS HR-CS GFAAS

Instrumento	ContrAA700
Longitud de onda (nm)	Al: 236.705 y Cr: 236.681
Nº de píxeles sumados del detector	4 para Cr (≈ 5 pm) 3 para Al (≈ 3.7 pm) muestra A 2 para Al (≈ 2.5 pm) muestras B y D
Modificante químico	100 ng Pd
Masa de muestra (mg)	≈ 1.0 (para muestras A y B) $\approx 0.1-0.2$ (para muestra D)
1ª Etapa de secado	
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	90
Rampa ($^{\circ}\text{C s}^{-1}$)	6
Estancia (s)	20
Caudal de Argón (L min^{-1})	2
2ª Etapa de secado	
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	120
Rampa ($^{\circ}\text{C s}^{-1}$)	5
Estancia (s)	30
Caudal de Argón (L min^{-1})	2
Etapa de pirólisis	
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	1000
Rampa ($^{\circ}\text{C s}^{-1}$)	50
Estancia (s)	30
Caudal de Argón (L min^{-1})	2
Etapa de atomización	
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	2500
Rampa ($^{\circ}\text{C s}^{-1}$)	2000
Estancia (s)	10
Caudal de Argón (L min^{-1})	0
1ª Etapa de limpieza	
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	2550
Rampa ($^{\circ}\text{C s}^{-1}$)	150
Estancia (s)	10
Caudal de Argón (L min^{-1})	2
2ª Etapa de limpieza	
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	2650
Rampa ($^{\circ}\text{C s}^{-1}$)	150
Estancia (s)	10
Caudal de Argón (L min^{-1})	2

Tabla II.13 Parámetros instrumentales utilizados para las determinaciones de azufre en nanocomposites mediante SS HR-CS GFAAS

Instrumento	ContrAA700
Longitud de onda (nm)	257.958
Nº de píxeles sumados del detector	3 (≈ 4.3 pm)
Modificante Químico Permanente	Ru
Modificante Químico	18 $\mu\text{g Pd}^a$
Masa de muestra (mg)	$\approx 0.1 - 0.8$
Etapas de secado	
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	120
Rampa ($^{\circ}\text{C s}^{-1}$)	4
Estancia (s)	15
Caudal de Argón (L min^{-1})	2
Etapas de pirólisis	
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	800
Rampa ($^{\circ}\text{C s}^{-1}$)	50
Estancia (s)	30
Caudal de Argón (L min^{-1})	2
Etapas de atomización	
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	2500
Rampa ($^{\circ}\text{C s}^{-1}$)	2000
Estancia (s)	5
Caudal de Argón (L min^{-1})	0
Etapas de limpieza	
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	2650
Rampa ($^{\circ}\text{C s}^{-1}$)	1000
Estancia (s)	5
Caudal de Argón (L min^{-1})	2

^aNanopartículas de Pd obtenidas según lo descrito en apartado II.2.2.

II.5 PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS

II.5.1 Procedimientos para realizar las determinaciones tras disolución de las muestras

II.5.1.1 Determinación de As, Cd, Cu, Cr, Hg, Pb y Sb en sílices

El proceso de disolución de las muestras de sílice se realizó según el siguiente procedimiento:

- Se pesaron 500 mg, con exactitud hasta la décima de mg, directamente en uno de los vasos del microondas.
- Se añadieron 1 mL de HCl al 37%, 1 mL HNO₃ al 65% y 4 mL de HF al 48%.
- Se cerró y se sometió a una digestión en el microondas según las condiciones descritas en la tabla II.14 (página 93) y a un posterior enfriamiento.
- Finalmente, el vaso se lavó con agua milli-Q y trasvasó cuantitativamente a un matraz aforado de 50 mL.

El proceso de disolución completo tenía una duración aproximada de unas 2 horas, incluyendo no sólo el programa de microondas sino también las etapas consistentes en pesar la muestra, enfriar la disolución, trasvasar el contenido y aforar los matraces. Se realizaron cuatro disoluciones para cada una de las muestras de sílice analizadas y un blanco en cada proceso de ataque.

En el caso de As, Hg y Sb el proceso de disolución y medida fue ligeramente diferente ya que estos elementos se analizaron en ICP-OES mediante generación de hidruros. Tras la digestión de la muestra según el programa descrito en la tabla II.14 (página 93), se abrieron los vasos y se añadieron 20 mL de una disolución saturada de ácido bórico con el fin de formar complejos con los fluoruros residuales. Esta mezcla se sometió de nuevo al programa de microondas de la tabla II.14 (página 93). Al finalizar, se procedió a su lavado y trasvasado, del mismo modo que el resto de muestras.

Después, se analizó mediante ICP-OES según las condiciones de la tabla II.15 (página 93) pero con la cámara de nebulización ciclónica adecuada para generación de hidruros. Durante el análisis, se debe introducir en la cámara de nebulización junto con la muestra un caudal constante de 10 rpm de ácido clorhídrico al 17% y de una solución de borohidruro de sodio al 1% en NaOH 0.5 M.

A partir de las disoluciones patrón comerciales de As, Hg, Sb y multielemental de $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, se prepararon las oportunas diluciones, para utilizarlas como patrones en los rangos de calibración de 0 a $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ para As y Cd, de 0 a $0.075 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ para Cu, Cr y Pb de 0 a $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ para Hg y Sb. Los patrones se prepararon con la misma proporción de ácidos utilizados en el procedimiento de disolución de muestras en el microondas. Se midió la señal correspondiente a intensidad de radiación emitida en ICP-OES por triplicado para cada patrón. Con el promedio de estas tres réplicas, se construyó la recta de calibrado. Se utilizaron las condiciones descritas en la tabla II.15 (página 93).

Para realizar la determinación de As, Cd, Cu, Cr, Hg y Sb en sílices digeridas se midió, en las mismas condiciones instrumentales, la intensidad de radiación emitida de cuatro disoluciones obtenidas tras la digestión de cuatro réplicas de cada muestra según se ha indicado antes y del blanco del proceso de digestión. Por interpolación de estas medidas en la curva de calibrado se obtuvo el contenido de los analitos en cada muestra y en el blanco. Se obtuvo la diferencia de estos dos últimos y por último, se realizó el promedio de los resultados de las cuatro réplicas para cada muestra.

En el caso de la determinación de Pb, la medida de la muestra disuelta se realizó mediante HR-CS GFAAS debido al alto límite de detección obtenido con ICP-OES. En este caso, los parámetros instrumentales fueron los indicados en la tabla II.16 (página 94). El resultado se obtuvo de forma similar al resto de analitos.

Tabla II.14 Programa de microondas para la disolución de muestra de sílice

Paso	Etapa	tiempo (min)	Temperatura (°C)
1	Rampa de Calentamiento	3	100
2	Rampa de Calentamiento	10	180
3	Rampa de calentamiento	5	220
4	Permanencia	20	220

Tabla II.15 Parámetros instrumentales utilizados para la determinación de As, Cd, Cu, Cr, Hg y Sb en muestras de sílice disueltas en ICP-OES

Potencia del generador	1200 W
Caudal de gas de plasmógeno	14 L min ⁻¹
Caudal de gas de vaina	0.3 L min ⁻¹
Caudal de gas auxiliar	1.2 L min ⁻¹
Caudal de gas del nebulizador	0.02 L min ⁻¹
Presión del nebulizador	1 bar
Velocidad bomba peristáltica	20 rpm
Tipo de nebulizador	Concéntrico de teflón
Cámara de nebulización	Ciclónica de teflón ^a
Antorcha	Alúmina
Tiempo de transferencia	15 s
Tiempo de estabilización	15 s
Rendija de entrada	10 nm
Tiempo de adquisición	5 s
Longitud de onda	
	As 188.893 nm
	Cd 228.802 nm
	Cu 324.754 nm
	Cr 267.716 nm
	Hg 194.163 nm
	Sb 206.833 nm

^aEn el caso del As, Hg y Sb, la cámara de nebulización ciclónica es la adecuada para generación de hidruros (cámara CMA de Horiba Jobin Yvon) y es de cuarzo.

Tabla II.16 Parámetros instrumentales utilizados para las determinaciones de plomo en muestras de sílice disueltas mediante HR-CS GFAAS

Instrumento	ContrAA700
Longitud de onda (nm)	283.306
Nº de píxeles sumados del detector	3 (≈ 4.7 pm)
Modificante Químico	100 ng Pd
Volumen de muestra (μL)	10
1ª Etapa de secado	
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	110
Rampa ($^{\circ}\text{C s}^{-1}$)	5
Estancia (s)	20
Caudal de Argón (L min^{-1})	2
2ª Etapa de secado	
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	150
Rampa ($^{\circ}\text{C s}^{-1}$)	5
Estancia (s)	20
Caudal de Argón (L min^{-1})	2
Etapa de Pirólisis	
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	800
Rampa ($^{\circ}\text{C s}^{-1}$)	50
Estancia (s)	15
Caudal de Argón (L min^{-1})	2
Etapa de atomización	
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	2100
Rampa ($^{\circ}\text{C s}^{-1}$)	3000
Estancia (s)	6
Caudal de Argón (L min^{-1})	0
Etapa de limpieza	
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	2650
Rampa ($^{\circ}\text{C s}^{-1}$)	1000
Estancia (s)	5
Caudal de Argón (L min^{-1})	2

II.5.1.2 Determinación de Au en órganos de ratón

El proceso de disolución de órganos de ratón se realizó según el siguiente procedimiento:

- Se pesaron 25 mg de muestra, con exactitud hasta la décima de mg, excepto para el caso de muestras de cerebro en las que se

pesaron 75 mg y se introdujeron en un matraz Kjeldahl de 50 mL.

- Se añadieron 10 mL de H₂SO₄ 18 M.
- La mezcla se calentó a 400°C durante 45 min en un mechero Bunsen.
- Se dejó enfriar y después se añadieron 5 mL de H₂O₂ 10 M y se volvió a calentar hasta que la disolución se quedó transparente (aproximadamente 5-10 min).
- Se añadió 1 mL de HCl 12 M para asegurar la estabilidad del Au.
- Finalmente, se lavó con agua milli-Q y trasvasó cuantitativamente a un matraz aforado de 25 mL.

El proceso de disolución completo tenía una duración aproximada de 90 min.

Tabla II.17 Parámetros instrumentales utilizados para las determinaciones de oro en muestras disueltas mediante ICP-MS

Potencia del generador	1150 W
Caudal de gas plasmógeno	0.98 L min ⁻¹ de Ar
Caudal de gas auxiliar	15 L min ⁻¹ de Ar
Caudal de gas portador	1.1 L min ⁻¹ de Ar
Velocidad de la bomba peristáltica	24 rpm
Tipo de nebulizador	Concéntrico de cuarzo
Cámara de nebulización	Ciclónica de cuarzo
Modo de escaneo	Salto de pico a pico
Modo de detector	Dual
Autolentes	Si
Tiempo de estancia para cada isótopo	50 ms
Número de barridos por réplica	100
Isotopos medidos	¹⁹⁷ Au ¹⁰³ Rh (estándar interno)

A partir de la disolución patrón comercial de Au de 1000 mg · L⁻¹, se prepararon las oportunas diluciones con HCl al 1%, para obtener los siguientes rangos de calibración:

- Para las muestras de cerebro: 0-1.5 µg · L⁻¹.
- Para el resto de muestras: 0-100 µg · L⁻¹.

Se midió la señal de cada patrón por triplicado en ICP-MS obteniéndose la recta de calibrado. Se utilizaron las condiciones descritas en la tabla II.17 (página 95).

Para la determinación de Au en órganos de ratón se midió, en las mismas condiciones instrumentales, la señal de cinco disoluciones obtenidas tras la digestión de cinco réplicas de cada muestra y un blanco según se ha indicado antes. Por interpolación de estas medidas en la curva de calibrado se obtiene el contenido de Au en la muestra. El resultado de cada muestra se obtuvo como promedio de las cinco réplicas.

II.5.1.3 Determinación de Al, Co, Cr, Fe, Ni y Pb en nanotubos de carbono

El proceso de disolución de nanotubos de carbono está basado en el artículo de DECKER *et al.*⁴ y se realizó según el siguiente procedimiento:

- Se pesaron 25 mg de nanotubos de carbono, con exactitud hasta la centésima de mg, en un vaso de precipitados de 10 mL.
- Se trasvasaron los nanotubos a un vaso de teflón del microondas arrastrándolos con 7 mL de HNO₃ al 65%.
- Se añadieron 2 mL de HNO₃ al 65% y 0.75 mL de H₂O₂.
- Se llevó a cabo una digestión en microondas según las condiciones descritas en la tabla II.18 (página 97).
- Se dejó enfriar durante una noche. Después, se abrieron los vasos y su contenido se filtró con papel cualitativo. Se lavó con

agua milli-Q y trasvasó todo a un vaso de precipitados de 100 mL.

- Se evaporó en placa calefactora hasta sequedad.
- Se añadieron 0.75 mL de HNO₃ al 65%.
- Se lavó con agua milli-Q y trasvasó cuantitativamente a un matraz aforado de 10 mL.

El proceso de disolución completo tenía una duración aproximada de unas 3 horas, incluyendo no sólo el programa de microondas sino también el resto de etapas (pesar la muestra, enfriar y filtrar la disolución, llevar a sequedad, trasvasar el contenido y aforar los matraces). Se realizaron cuatro disoluciones para cada una de las muestras de nanotubos y un blanco en cada proceso de digestión.

Tabla II.18 Programa de microondas para el ataque de nanotubos de carbono

Paso	Etapas	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
1	Rampa de Calentamiento	3	80
2	Permanencia	10	80
3	Rampa de calentamiento	10	150
4	Permanencia	15	150
5	Rampa de calentamiento	10	180
6	Permanencia	15	180
7	Rampa de calentamiento	10	210
8	Permanencia	25	210

Se midió la señal correspondiente a la intensidad de radiación emitida en ICP-OES mediante el método de adiciones estándar. Esto se hizo cuatro veces para cada muestra, correspondiente a las cuatro digestiones de la misma. Se utilizaron las condiciones descritas en la tabla II.19 (página 98).

A partir de la disolución patrón comercial multielemental de 1000 mg·L⁻¹, se añadieron las cantidades oportunas a varias alícuotas de cada una de las muestras disueltas para obtener los siguientes rangos de calibración :

- Para la muestra D (SWCNTs): 0-70 mg ·L⁻¹ para Co, 0-1 mg ·L⁻¹ para Cr, 0-5 mg ·L⁻¹ para Al, 0-60 mg ·L⁻¹ para Ni y 0-10 mg ·L⁻¹ para Fe.
- Para las muestras A, B y C: 0-10 mg ·L⁻¹ para Co, 0-0.1 mg ·L⁻¹ para Cr, 0-0.1 mg ·L⁻¹ para Al, 0-0.1mg ·L⁻¹ para Ni y 0-0.1 mg ·L⁻¹ para Fe.

Se obtuvo el contenido de los analitos en la muestra a partir de las rectas obtenidas mediante adiciones estándar. Por último, se calculó el promedio del resultado para las cuatro réplicas de cada muestra y para las dos longitudes de onda en el caso de Co, Cr, Ni y Fe.

Tabla II.19 Parámetros instrumentales utilizados para las determinación de Co, Cr, Al, Ni y Fe en muestras disueltas de CNTs mediante ICP-OES

Potencia del generador	1000 W
Caudal de gas de plasma	12 L ·min ⁻¹
Caudal de gas de vaina	0,15 L ·min ⁻¹
Caudal de gas auxiliar	0 L ·min ⁻¹
Caudal de gas del nebulizador	1.02 L ·min ⁻¹
Presión del nebulizador	1 bar
Velocidad bomba peristáltica	20 rpm
Tipo de nebulizador	Concéntrico de cuarzo
Cámara de nebulización	Ciclónica de cuarzo
Antorcha	Cuarzo
Tiempo de transferencia	15 s
Tiempo de estabilización	15 s
Rendija de entrada	10 nm
Tiempo de adquisición	5 s
Longitud de onda	
	Al 237.312 nm
	Co 231.160 y 238.892 nm
	Cr 206.149 y 267.716 nm
	Ni 216.556 y 231.604 nm
	Fe 239.563 y 259.940 nm

En el caso de Pb, las muestras de CNT's digeridas se analizaron con ICP-MS mediante el método de adiciones estándar. A partir de la disolución patrón comercial de Pb de $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, se añadieron las cantidades oportunas a varias alícuotas de cada una de las muestras disueltas para obtener los siguientes rangos de calibración:

- Para la muestra D (SWCNT's): $0\text{-}30 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$.
- Para las muestras A y B: $0\text{-}2 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$.

Se obtuvo el contenido de Pb en la muestra a partir de las rectas obtenidas mediante adiciones estándar. Por último, se calculó el promedio del resultado obtenido para las cuatro réplicas de cada muestra.

Tabla II.20 Parámetros instrumentales utilizados para las determinación de Pb en muestras disueltas de nanotubos de carbono mediante ICP-MS

Potencia del generador	1250 W
Caudal de gas plasmógeno	$1.03 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ de Ar
Caudal de gas auxiliar	$18 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ de Ar
Caudal de gas portador	$1.2 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ de Ar
Velocidad de la bomba peristáltica	24 rpm
Tipo de nebulizador	Concéntrico de cuarzo
Cámara de nebulización	Ciclónica de cuarzo
Modo de escaneo	Salto de pico a pico
Modo de detector	Dual
Autolentes	Si
Tiempo de estancia para cada isótopo	50 ms
Número de barridos por réplica	100
Isotopos medidos	^{208}Pb , ^{207}Pb , ^{206}Pb , ^{204}Pb ^{103}Rh (estándar interno)

II.5.1.4 Determinación de Mo y S en nanohilos disueltos

El proceso de disolución de nanohilos se realizó según el siguiente procedimiento:

- Se pesaron entre 20 y 50 mg, dependiendo de la muestra, con exactitud hasta la centésima de mg, directamente en un vaso de precipitados de 100 mL.
- Se añadieron 20 mL de agua regia.
- Se calentaron en placa calefactora hasta total disolución.
- Finalmente, se lavó con agua milli-Q y se trasvasó cuantitativamente a un matraz aforado de 100 mL.

El proceso de disolución completo tenía una duración aproximada de 60 min.

Se midió la señal correspondiente a intensidad de radiación emitida en ICP-OES mediante el método de adiciones estándar. Esto se hizo cuatro veces para cada muestra, correspondiente a las cuatro digestiones de la misma. Se utilizaron las condiciones descritas en la tabla II.21 (página 101).

Las muestras se analizaron diluidas en agua milli-Q en una proporción 1:100 (Mo en las muestras MoS₂ y Mo₆S₂I₈ y S en MoS₂) ó 1:10 (Mo en Mo₆S₃I₆ y S en Mo₆S₂I₈ y Mo₆S₃I₆).

A partir de las disoluciones patrón comerciales de Mo y de S de 1000 mg · L⁻¹, se añadieron las cantidades oportunas a varias alícuotas de cada una de las muestras disueltas para obtener los siguientes rangos de calibración:

- De 0 a 3 mg · L⁻¹ para la determinación de S en MoS₂ y Mo₆S₂I₈ ó de 0 a 20 mg · L⁻¹ para la determinación de S en Mo₆S₃I₆.
- De 0 a 3 mg · L⁻¹ para la determinación de Mo en MoS₂ y Mo₆S₂I₈ ó de 0 a 20 mg · L⁻¹ para la determinación de Mo en Mo₆S₃I₆.

Se obtuvo el contenido de los analitos en la muestra a partir de las rectas obtenidas mediante adiciones estándar. Por último, se calculó el promedio del resultado para las cuatro réplicas de cada muestra y para las dos longitudes de onda.

Tabla II.21 Parámetros instrumentales utilizados para las determinación de Mo y S en muestras disueltas de nanobios mediante ICP-OES

Potencia del generador	1000 W
Caudal de gas de plasma	12 L min ⁻¹
Caudal de gas de vaina	0.15 L min ⁻¹
Caudal de gas auxiliar	0 L min ⁻¹
Caudal de gas del nebulizador	1.02 L min ⁻¹
Presión del nebulizador	1 bar
Velocidad bomba peristáltica	20 rpm
Tipo de nebulizador	Cuarzo
Cámara de nebulización	Ciclónica de cuarzo
Antorcha	Cuarzo
Tiempo de transferencia	15 s
Tiempo de estabilización	15 s
Rendija de entrada	10 nm
Tiempo de adquisición	5 s
Longitud de onda	
	Mo 284.823 y 204.598 nm
	S 180.676 y 181.978 nm

II.5.1.5 Determinación de Mo en *nanocomposites* disueltos

El proceso de disolución de *nanocomposites* se realizó según el siguiente procedimiento:

- Se pesaron entre 60 y 140 mg, dependiendo de la muestra, con exactitud hasta la centésima de mg, directamente en un matraz Erlenmeyer.
- Se añadieron 10 mL de H₂SO₄ al 96%.
- Se calentó en placa calefactora hasta total disolución y se añadió H₂O₂ gota a gota hasta que la disolución se volvió transparente.
- Finalmente, se lavó con agua milli-Q y se trasvasó cuantitativamente a un matraz aforado de 50 mL.

El proceso de disolución completo tenía una duración aproximada de 60 min.

Se midió la señal correspondiente a intensidad de radiación emitida en ICP-OES mediante el método de adiciones estándar. Esto se hizo cuatro veces para cada muestra, correspondiente a las cuatro digestiones de la misma. Se utilizaron las condiciones descritas en la tabla II.21 (página 101).

A partir de la disolución patrón comercial de Mo de 1000 mg · L⁻¹, se añadieron las cantidades oportunas a varias alícuotas de cada una de las muestras disueltas para obtener un rango de calibración de 0 a 16 mg · L⁻¹.

Se obtuvo el contenido de Mo en cada una de las muestras a partir de las rectas obtenidas mediante adiciones estándar. Por último, se calculó el promedio del resultado para las cuatro réplicas de cada muestra y para las dos longitudes de onda.

II.5.2 Preparación de las muestras para realizar las determinaciones directas sobre los sólidos

II.5.2.1 Muestras de sílices

El único tratamiento previo que requirieron las muestras de sílices fue su secado previo en estufa a 105°C durante 24 horas. Tras esta operación se guardaron en desecador hasta su análisis. El contenido en humedad obtenido osciló entre el 3 y el 4%.

II.5.2.2 Materiales de referencia para validar el análisis de sílices

Con las muestras de referencia se llevó también a cabo un secado previo en estufa a 105°C durante 24 horas y, del mismo modo que con las sílices, se guardaron en desecador hasta su análisis. El contenido en humedad obtenido osciló entre el 0.1 y el 0.2%.

II.5.2.3 Órganos de ratón

Los órganos de ratón se secaron en estufa a 85°C durante 48 horas. Al cabo de este tiempo se pesaron y se guardaron en desecador hasta su análisis. Los pesos típicos aproximados de los diferentes órganos fueron los siguientes:

- Cerebro y riñón: 100 mg
- Corazón y pulmón: 30 mg
- Hígado: 400 mg
- Bazo: 20 mg

Todos los resultados se obtuvieron en base a la masa seca de muestra.

Justo antes de su análisis, los órganos se molieron manualmente con un mortero de ágata.

II.5.2.4 Nanotubos de carbono

En la muestra D no se llevó a cabo ningún tratamiento previo. En el resto de muestras de CNT's, el único tratamiento previo a su análisis fue su secado previo en estufa a 105°C durante 24 horas.

II.5.2.5 *Nanocomposites*

Las muestras se secaron también durante 24 horas en estufa a 105°C antes de su análisis.

Las muestras de *nanocomposites* se cortaron manualmente en trozos adecuados para su análisis mediante un cuchillo de cerámica.

II.5.3 Introducción de las muestras sólidas en el horno de grafito

Los dos instrumentos utilizados para el análisis de muestras sólidas, tanto el Jena-ZEEnit 60 como el ContrAA700, disponen de un dispositivo especial para la introducción automática de muestras sólidas en el horno de grafito, desarrollado inicialmente por KURFÜRST para Grün.⁵ Este mecanismo, cuyo funcionamiento se muestra en las figuras II.3 y II.4 (páginas 106 y 107), ha supuesto un avance importantísimo para la determinación directa de elementos sobre muestras sólidas mediante GFAAS.

En ambos instrumentos, la introducción de muestras sólidas se realiza mediante un brazo mecánico con unas pinzas que traslada en primer lugar la plataforma de grafito pirolítico vacía hasta una balanza, incorporada en el dispositivo, en la que se tara, tras lo cual es devuelta a su posición inicial sobre un soporte. Tras depositar sobre ella el sólido que va a ser analizado, el brazo vuelve a introducirla en la balanza con lo que se pesa la muestra. Entonces, el brazo lleva la plataforma hasta el soporte inicial o a la posición de dosificación, donde se permite añadirle a la plataforma, que ya contiene la muestra, algún modificante químico si es necesario. Finalmente, se lleva la plataforma al horno de grafito. Concluido el programa de atomización, el brazo mecánico extrae la plataforma del horno de grafito y la deposita de nuevo en el soporte.

II.5.4 Procedimientos para realizar las determinaciones directas sobre las muestras sólidas

II.5.4.1 Determinación de As, Cd, Cu, Cr, Hg, Pb y Sb en sílices

A partir de las disoluciones patrón comerciales de As, Pb, Hg y multielemental de $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, se prepararon las oportunas diluciones con agua milli-Q, para utilizarlas como patrones con el fin de que cubrieran los siguientes intervalos de trabajo:

- De 0 a 2 ng de As
- De 0 a 0.07 ng de Cd
- De 0 a 6 ng de Cu
- De 0 a 7 ng de Hg
- De 0 a 3 ng de Pb
- De 0 a 1 ng de Sb

Se midió la absorbancia integrada de $10 \mu\text{L}$ de cada una de estas disoluciones por triplicado, en las condiciones que se indican en

las tablas II.3 a II.9 (páginas 80 a 86). Con el promedio de las tres réplicas se obtuvo la curva de calibrado.

Para realizar la determinación de estos elementos en muestras de sílice, se introdujeron sucesivamente en el atomizador cinco fracciones con un peso aproximado a lo indicado en las tablas II.3 a II.9 (páginas 80 a 86) en función del elemento que se deseaba medir y se adicionó el modificante químico correspondiente (si procedía). Se midió la absorbancia integrada de las mismas, atomizando en las mismas condiciones que las disoluciones acuosas. Tras interpolar en la curva de calibrado se tomó como resultado de la determinación el valor de la mediana de las cinco medidas realizadas.⁶ Sin embargo, solo se realizaron tres medidas en los casos en los que claramente no se obtenía una señal de analito por encima del límite de detección.

Tras la atomización de la muestra de sílice, en la plataforma quedaba un residuo que se retiraba con unas pinzas. El análisis de cinco réplicas (una muestra) suponía aproximadamente unos 20 minutos.

II.5.4.2 Determinación de Au en órganos de ratón

A partir de la disolución patrón comercial de Au de 1000 mg·L⁻¹, se prepararon las oportunas diluciones con HCl al 1%, para utilizarlas como patrones con el fin de que cubrieran los intervalos de trabajo adecuados en función de la muestra que se iba a analizar:

- Muestras de cerebro: de 0 a 1 ng de Au
- Resto de muestras: de 0 a 12 ng de Au

Se midió la absorbancia integrada de 10 µL de cada una de estas disoluciones por triplicado en las condiciones que se indican en la tabla II.10 (página 87). Con el promedio de las tres réplicas se obtuvo la curva de calibrado.

Figura II.3 Introducción de la muestra en el atomizador del equipo ZEEmit 60 mediante un dispositivo automático

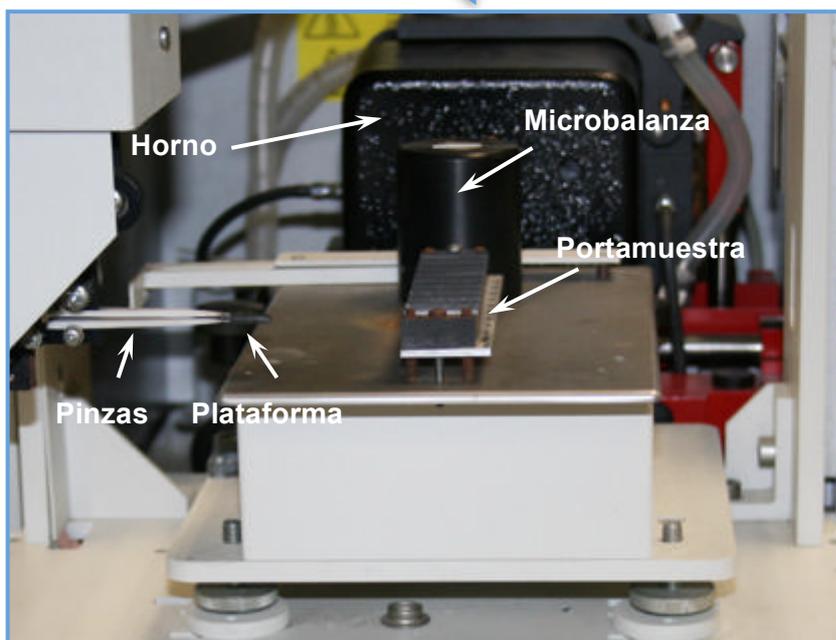
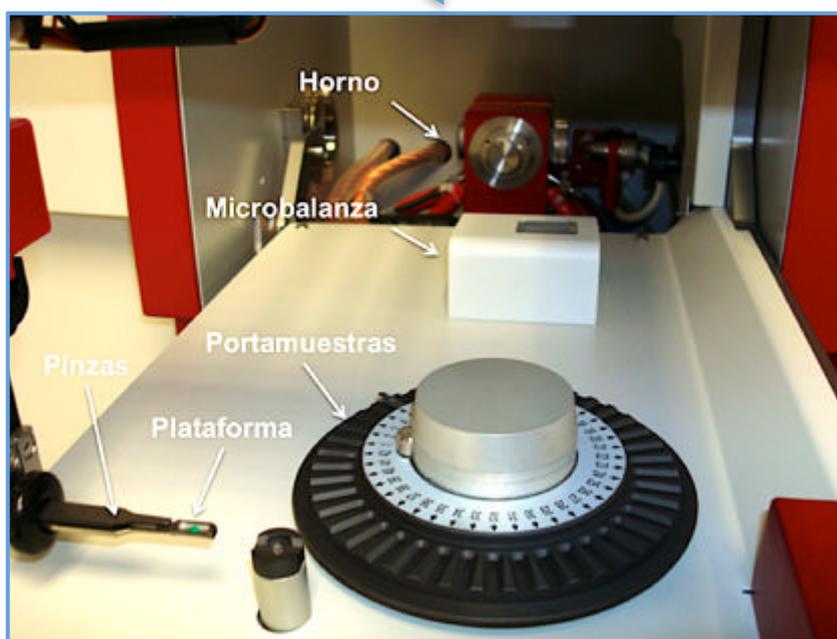
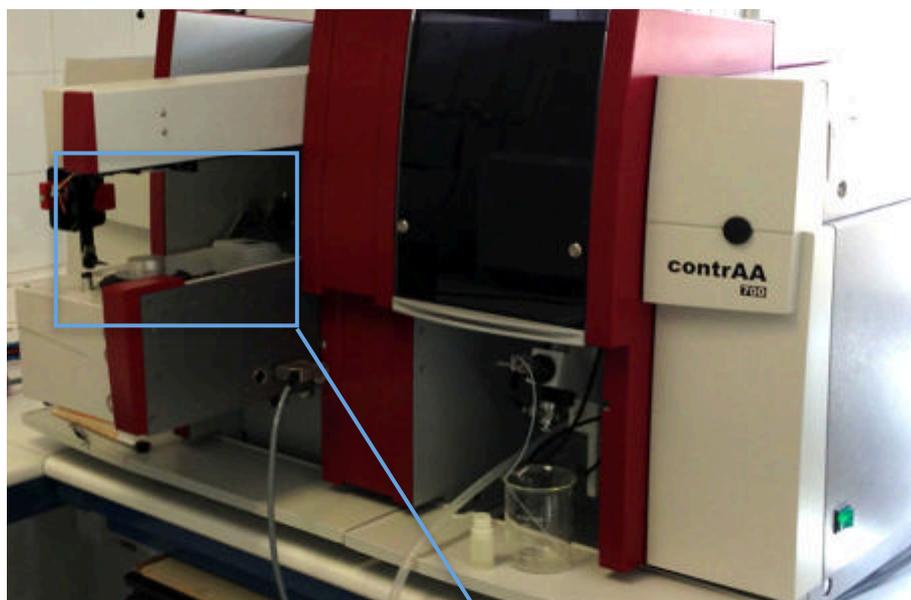


Figura II.4 Introducción de la muestra en el atomizador del equipo ContrAA700 mediante un dispositivo automático



Para realizar la determinación de estos elementos en los órganos de ratón, se introdujeron sucesivamente en el atomizador cinco fracciones con un peso aproximado de 3 mg en el caso de muestras de cerebro y un peso de 0.3 a 1.0 mg en el caso del resto de órganos. Se midió la absorbancia integrada de las mismas, atomizando en las mismas condiciones que las disoluciones acuosas. Tras interpolar en la curva de calibrado se tomó como resultado de la determinación el valor de la mediana de las cinco medidas realizadas para cada órgano⁶ (las cinco medidas suponían aproximadamente unos 15 minutos).

II.5.4.3 Determinación de Al, Co, Cr, Fe, Ni y Pb en nanotubos de carbono

A partir de las disoluciones patrón comerciales de Al, Co, Cr, Fe, Ni y Pb de 1000 mg ·L⁻¹, se prepararon las oportunas diluciones con agua milli-Q, para utilizarlas como patrones con el fin de que cubrieran los siguientes intervalos de trabajo:

- De 0 a 40 ng de Cr y de 0 a 15 ng de Al en el caso de analizar la muestra A de tipo Multi Wall (MWCNT).
- De 0 a 50 ng de Cr y de 0 a 40 ng de Al en el caso de analizar la muestra B de tipo Multi Wall (MWCNT).
- De 0 a 50 ng de Cr y de 0 a 100 ng de Al en el caso de analizar la muestra D de tipo Single Wall (SWCNT).
- De 0 a 3 µg de Co, de 0 a 500 ng de Fe, de 0 a 3 µg de Ni y de 0 a 1 ng de Pb para cualquiera de las muestras analizadas.

Se midió la absorbancia integrada de estas disoluciones por triplicado, en las condiciones que se indicaron en la tablas II.11 (página 88) y II.12 (página 89). Con el promedio de las tres réplicas se obtuvo la curva de calibrado.

Para realizar la determinación de estos elementos en los nanotubos de carbono, se introdujeron sucesivamente en el atomizador cinco fracciones con un peso entre de 0.1 y 1 mg en

función de la muestra analizada y el analito que se determinaba (véase tablas II.11 y II.12, páginas 88 y 89). Se midió la absorbancia integrada de las mismas, atomizando en las mismas condiciones que las disoluciones acuosas. Tras interpolar en la curva de calibrado se tomó como resultado de la determinación el valor de la mediana de las cinco medidas realizadas⁶ (las cinco medidas suponían aproximadamente unos 20 minutos).

Tras la atomización de cada muestra sólida, quedaba un residuo carbonáceo que se eliminaba fácilmente arrastrándolo con una pequeña brocha cada diez réplicas.

II.5.4.4 Determinación de Mo y S en *nanocomposites*

A partir de la disolución patrón comercial de S de 1000 mg · L⁻¹, se prepararon las oportunas diluciones con agua milli-Q, para utilizarlas como patrones con el fin de que cubrieran el intervalo de trabajo de 0 a 1500 ng de S.

Se midió la absorbancia integrada de estas disoluciones por triplicado, en las condiciones que se indican en la tablas II.13 (página 90). Con el promedio de las tres réplicas se obtuvo la curva de calibrado.

Para realizar la determinación de estos elementos en los *nanocomposites*, se introdujeron sucesivamente en el atomizador cinco fracciones con un peso entre de 0.1 y 0.8 mg en función de la muestra analizada. Se midió la absorbancia integrada de las mismas, atomizando en las mismas condiciones que las disoluciones acuosas. Tras interpolar en la curva de calibrado se tomó como resultado de la determinación el valor de la mediana de las cinco medidas realizadas.⁶ El análisis de cinco réplicas (una muestra) suponía aproximadamente unos 15 minutos.

II.6 BIBLIOGRAFÍA

1. T. Teranishi, M. Miyake, *Size control of palladium nanoparticles and their crystal structures*, Chemistry of Materials, 1998, 10, 594-600.
2. M.G.R. Vale, M.M. Da Silva, B. Welz, R. Nowka, *Control of spectral and non-spectral interferences in the determination of thallium in river and marine sediments using solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2002, 17, 38-45.
3. A. G. Barrientos, J. M. de la Fuente, T. C. Rojas, A. Fernández, S. Penadés, *Gold glyconanoparticles: Synthetic polyvalent ligands mimicking glycoalyx-like surfaces as tools for glycobiological studies*, Chemistry- A European Journal, 2003, 9, 1909-1921.
4. J.E. Decker, A.R. Hight Walker, K. Bosnick, C.A. Clifford, L. Dai, J. Fagan, S. Hooker, Z.J. Jakubek, C. Kingston, J. Makar, E. Mansfield, M.T. Postek, B. Simard, R. Sturgeon, S. Wise, A.E. Vladar, L. Yang, R. Zeisler, *Sample preparation protocols for realization of reproducible characterization of single-wall carbon nanotubes*, Metrologia, 2009, 46, 682-692.
5. U. Kurfüst, M. Kempeneer, M. Stoeppler y O. Schuierer, *Theory and instrumentation: An automated solid sample analysis system*, Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 1990, 337, 248-252.
6. M.A. Belarra, M. Resano, J.R. Castillo, 1999, *Theoretical evaluation of solid sampling-electrothermal atomic absorption spectrometry for screening purposes*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 14, 547-552

Capítulo III.

Resultados y discusión

“Results! Why, man, I have gotten a lot of results. I know several thousand things that won't work.”

Thomas A. Edison

III.1 DETERMINACIÓN DE As, Cd, Cu, Cr, Hg, Pb Y Sb EN SÍLICES

III.1.1 Introducción

La sílice amorfa sintética (SAS) es un dióxido de silicio sintético de alta pureza y no cristalino, que puede producirse como sílice precipitada, sílica gel o sílice pirógena.¹ Aunque los métodos de producción de sílice pueden diferir en cierta medida, todos los tipos de sílice son similares en su pureza, en sus propiedades físico-químicas y en sus requisitos toxicológicos,² por lo que a todas ellas se les considera como la misma sustancia.

Se trata de un material nanoestructurado que se usa en una multitud de aplicaciones industriales, principalmente como refuerzo o como agente espesante, debido principalmente a cuatro de sus propiedades:³

- La capacidad de absorción, que está relacionada con la cantidad de sílice que es necesaria para soportar líquidos manteniendo un buen grado de fluidez con poco polvo en el medio.
- La fluidez y la generación de polvo, que vienen determinadas por el tamaño de partícula promedio y por la distribución de tamaños. En general, productos con un bajo porcentaje de partículas con tamaño inferior a 75 micras producen poco polvo y tienen gran fluidez.
- La capacidad reforzante, es decir la capacidad de actuar como refuerzo en un material compuesto (véase definición de refuerzo y material compuesto en apartado III.4.1, página 195), que está directamente relacionada con las propiedades mecánicas que aporta a la mezcla y depende de la porosidad de la sílice y de la distribución del tamaño de los poros.

- La facilidad de procesamiento y dispersión de la sílice en las mezclas, que son dos propiedades críticas que determinan el uso que se le va a dar a la sílice.

Con estas características, la sílice amorfa sintética presenta un amplio espectro de aplicabilidad. Entre estas aplicaciones, cabe destacar las siguientes:³

- Formulaciones industriales de elastómeros

La sílice precipitada se emplea desde hace mucho tiempo como carga reforzante en elastómeros, especialmente en caucho natural y sintético. Pertenece a las llamadas cargas blancas, que permiten colorear las mezclas de goma, a diferencia de la otra carga habitual, el negro de humo. Entre las diferentes cargas blancas la sílice precipitada es la única cuya capacidad de refuerzo puede competir con el negro de humo en mejora de propiedades.

Los llamados “neumáticos verdes”, que emplean como carga sílice en vez de negro de carbono, presentan importantes ventajas sobre los neumáticos tradicionales, no sólo en el aspecto de la seguridad (mejor comportamiento en suelo mojado o nieve) sino sobre todo en el ahorro de combustible, representando un ahorro potencial del 3-5% del consumo del automóvil. Estas ventajas se deben a la particular estructura de la sílice empleada, comparada con las sílices clásicas, que se traduce en una interacción mucho más estrecha con la matriz polimérica y como el nombre indica, una mejor dispersión en la goma.

- Plásticos

En los plásticos, las sílices encuentran aplicación como agente *antiblocking*, para evitar que el plástico se pegue a sí mismo. También tienen aplicación como modificador de textura superficial en productos extruídos, tanto para reducir adhesión como para modificar el aspecto visual.

- Agricultura

En la agricultura la sílice precipitada amorfa, además de su papel como fuente de silicio soluble (el silicio es un oligoelemento necesario en numerosas plantas), permite un control de la humedad en las plantas al compensar sus variaciones de humedad. Además, para determinadas formulaciones, la sílice es una excelente ayuda de molienda, un soporte de principios activos, o un agente fluidificante en productos con mucho efecto de apelmazamiento.

- Industria Farmacéutica

En la industria farmacéutica se utiliza como excipiente al no presentar interacción con los ingredientes activos de los medicamentos. Sus propiedades como agente fluidificante o antiapelmazante mejoran las propiedades en aquellos productos que se dosifican en polvo o en el proceso de preparación de pastillas previo al prensado de los polvos que las constituyen. Para determinados compuestos, puede ser necesaria la absorción del líquido activo sobre la sílice para su posterior peletización.

- Alimentación humana y animal

Los diferentes tipos de sílice sintética amorfa son un excelente soporte de aromas, aditivos o sustancias líquidas (vitaminas, ácidos, entre otros) que se transforman en productos en polvo con una buena fluidez y una fácil dosificación.

La estrecha distribución de tamaño de partícula de algunas sílices y su elevada capacidad de absorción les convierte en inmejorables agentes fluidificantes y antiapelmazantes de productos como la sal, las especias, las sopas y quesos en polvo, el azúcar u otros suplementos alimenticios.

Su uso como aditivo en la alimentación humana y animal está aprobado en la Directiva Europea 95/2/EC, modificación E551.

Esta amplia variedad de usos hace que la demanda de sílice amorfa sintética se haya incrementado enormemente durante los últimos años. Se calcula que la cantidad total anual de nanomateriales en el mercado mundial es de unos 11 millones de toneladas, con un valor de mercado de aproximadamente 20000 millones de euros. El negro de carbón y la sílice amorfa representan, con mucha diferencia, el mayor volumen de los nanomateriales que existen actualmente en el mercado.⁴

En particular, es especialmente importante este uso de sílice sintética amorfa en productos para la alimentación humana, ya que se hace necesario su control en los elementos potencialmente tóxicos. Actualmente, siguiendo la Directiva Europea 2008/84/EC, las sílices sintéticas deben cumplir con límites legales para As, Pb y Hg, que deben estar por debajo de 3, 5 y 1 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente, mientras que la Directiva 2002/32/EC introduce un límite de 2 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Cd.

Los métodos tradicionales para el análisis de impurezas metálicas en sílices se encuentran en los monográficos de sílice del *Food Chemical Codex*⁵ o del JECFA (*Joint Expert Committee on Food Additives*).⁶ Estos procedimientos para la determinación de metales a nivel traza comienzan con la disolución de la muestra, que para este tipo de muestra conlleva el uso de ácido fluorhídrico. Una vez disuelta, los metales (ya en disolución) se determinan mediante las técnicas espectrométricas adecuadas tales como espectrometría de absorción atómica (AAS) o espectrometría de emisión atómica mediante plasma acoplado inductivamente (ICP).

El desarrollo de métodos analíticos que permitan la determinación de metales directamente en las muestras de sílice en estado sólido podría constituir una alternativa muy atractiva para el control de estos materiales ya que sería posible:

- a) Mejorar la sensibilidad (ya que se evita la dilución que supone el proceso de digestión de la muestra).
- b) Analizar un elevado número de muestras.
- c) Minimizar el riesgo de contaminación y/o pérdidas.

- d) Implementar métodos analíticos más respetuosos con el medioambiente, debido a la baja o nula producción de residuos.⁷⁻⁹

Hay diferentes técnicas analíticas que se pueden usar con este propósito, pero la mayoría de ellas requieren algún tipo de pretratamiento de muestra (por ejemplo, en la fluorescencia de rayos X se suele realizar una fusión con borato)¹⁰⁻¹² y se presupone la disponibilidad de patrones sólidos adecuados para la calibración.¹³ En contraste con estas técnicas, la espectrometría de absorción atómica mediante horno de grafito (GFAAS) muestra ciertas ventajas como son su potencial para el análisis directo, una excelente sensibilidad y selectividad, y la posibilidad de usar patrones acuosos para la calibración.¹⁴⁻¹⁶

En la bibliografía se encuentran varios trabajos previos con buenos resultados para el análisis de suelos y otras muestras geológicas al menos para varios elementos.¹⁸⁻²⁵ Otro trabajo describe el uso de suspensiones para el análisis de cuarzo de alta pureza que muestra una precisión adecuada y bajos límites de detección para un amplio número de analitos.²⁶ Sin embargo, no se han encontrado trabajos previos en el uso de espectrometría GFAAS para muestras de sílice.

III.1.2 Objetivo del trabajo

El objetivo de este trabajo es evaluar el potencial del análisis directo por espectrometría de absorción atómica con horno de grafito (SS-GFAAS) en muestras de sílice en cooperación con una empresa fabricante de sílices que requiere el control de los analitos: As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb y Sb. El objetivo final es el desarrollo de procedimientos de análisis sencillos para su uso rutinario en el control de los diferentes lotes de producción de sílice empleando soluciones acuosas para la calibración.

III.1.3 Desarrollo del método

III.1.3.1 Selección de muestras de referencia

Para el desarrollo y validación del método de análisis, se seleccionaron dos materiales certificados de referencia (CRM). Debido a que no existían muestras certificadas de sílice, se eligieron las siguientes muestras:

- CRM NCSDC 73304: se trata de un material de tipo roca con un contenido aproximado de 90% de SiO₂. Esta muestra se utilizó como material de referencia para los analitos: As, Cd, Cr, Cu, Pb y Sb. Debido su bajo contenido en Hg (0.008 µg·g⁻¹), esta muestra no se utilizó como referencia para este analito.
- CRM 021-100 *Metals on Soil de RTC*: se trata de un suelo con un contenido aproximado de 52% de SiO₂. Esta muestra se utilizó como material de referencia para la determinación de Hg (4.7 µg·g⁻¹).

III.1.3.2 Ajuste de la sensibilidad

Para As, Cd, Hg y Sb se seleccionaron las condiciones de máxima sensibilidad ya que su determinación está por debajo de µg·g⁻¹. Esto significa que se usaron las longitudes de onda más sensibles y durante la atomización se detuvo el caudal de argón.

La sensibilidad se puede ajustar un poco más controlando la masa de la muestra que se analiza, aunque no se recomienda usar grandes cantidades para este tipo de muestra, ya que esto suele ofrecer señales de absorción inespecífica elevadas y también se acelera el deterioro de la plataforma.

Tanto en el material de referencia como en las muestras se esperaban niveles de concentración algo mayores para el Cu, Cr y Pb. Por esa razón, para el Cu y Pb se utilizaron unas líneas algo menos sensibles (aproximadamente en un factor de 2) que la línea principal

(283.3 nm en lugar de 217.0 nm para el Pb y 327.4 nm en lugar de 324.7nm para el Cu).

Para el Cr, debido a su alta sensibilidad mediante esta técnica, se seleccionó una línea cuatro veces menos sensible que la línea principal (427.5nm en lugar de 357.9nm). También se utilizó caudal medio de argón durante la atomización (1 L min^{-1}). Este analito constituyó el más complicado de los analizados en una matriz refractaria debido a su baja volatilidad.²⁷ En este caso se optó por el mantenimiento de caudal de argón durante la atomización, ya que es conocido que este factor puede ayudar a reducir la condensación de partículas en los extremos del tubo, en los que la temperatura siempre es menor, minimizando así el fenómeno de radiación dispersada.^{19,28}

III.1.3.3 Atomización de los analitos en el CRM

La optimización de las condiciones de atomización se investigó de acuerdo con los siguientes puntos:

- a) La baja volatilidad de la matriz (SiO_2), lo que hacía pensar que no se iba a conseguir la eliminación de la matriz durante la etapa de pirólisis, por lo que esta etapa no se considera crítica.¹⁵
- b) La señal de absorción inespecífica, que suele ser menor para longitudes de onda más elevadas porque la dispersión de la radiación es menos importante y hay una menor cantidad de especies diatómicas que absorban. De este modo, estos problemas se reducían para Cr y Cu. Para el resto de analitos, la probabilidad de vaporización de la matriz (SiO_2) a la vez que el analito era mayor cuanto mayores eran las temperaturas de atomización. Por esta razón, la temperatura de atomización era importante para minimizar estos problemas.
- c) Otro aspecto a tener en cuenta es que la matriz de la muestra retiene en cierto modo a los analitos, haciendo necesario el uso de temperaturas de atomización altas en comparación con las utilizadas para soluciones. Por lo tanto, la matriz en sí misma

actuaba como un modificante químico, lo que en muchos casos hacía redundante el uso de modificantes químicos para algunos elementos. Como el objetivo de este trabajo era desarrollar métodos de análisis lo más sencillos posible, solo se utilizaron modificantes químicos cuando se consideraron indispensables.

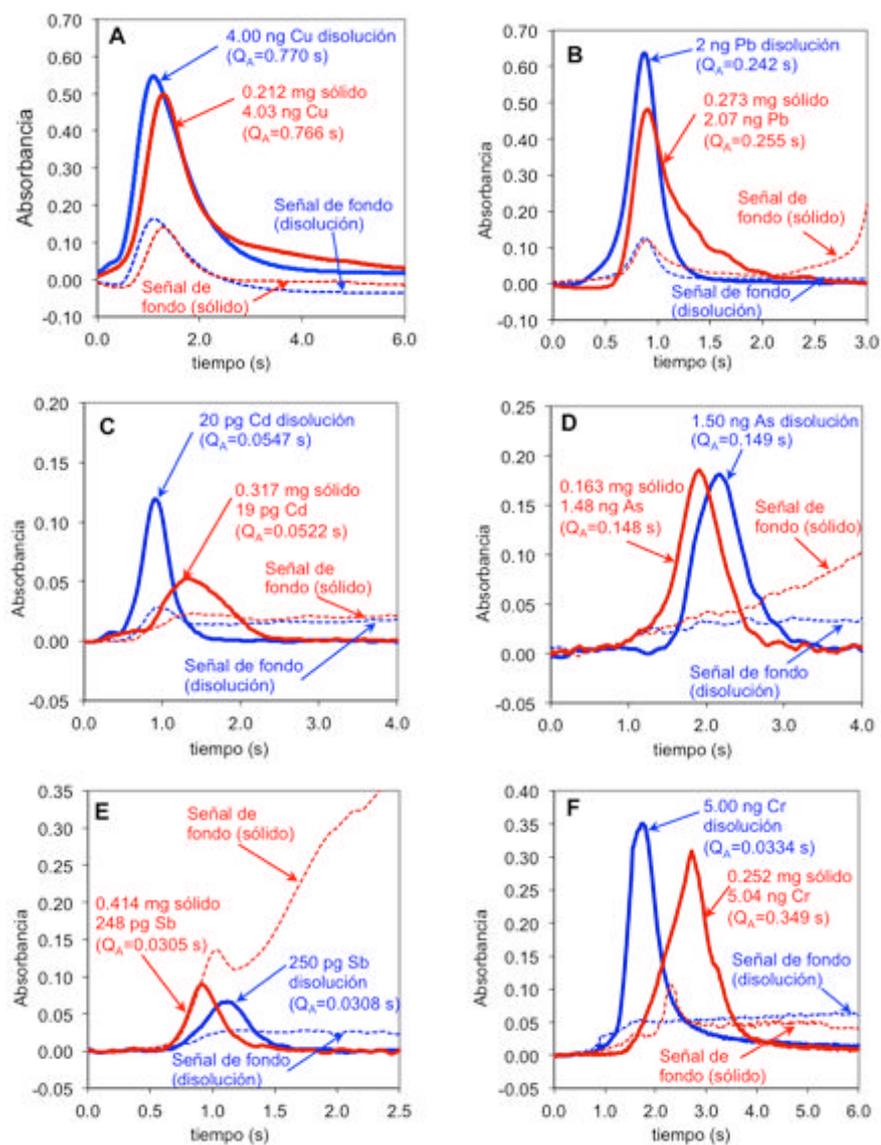
d) Normalmente para este tipo de muestra, el proceso de atomización para la muestra sólida y para una solución acuosa no es exactamente el mismo y ofrece diferencias en el perfil de la señal obtenido. Aún en este caso, siempre que la atomización del analito sea completa y que la temperatura no varíe de forma significativa durante este proceso, el empleo del área integrada de la señal puede permitir el uso de patrones acuosos en la calibración.²⁹⁻³¹

- Cobre y Plomo

En el caso de la atomización de Cu y Pb en la muestra de referencia, la temperatura de pirólisis tenía poca influencia en la señal. No era necesario el uso de modificantes químicos para estabilizar los analitos ya que el uso de temperaturas de pirólisis suficientemente bajas evitaba las pérdidas de analito. Sin embargo, la temperatura de atomización óptima era unos 300°C más elevada que la que normalmente se esperaba para soluciones. No obstante, las condiciones de ensayo tomadas finalmente (tablas II.5 y II.7, páginas 82 y 84), permitían obtener señales para el Cu prácticamente idénticas para muestras sólidas y para soluciones patrón acuosas (véase figura III.1A, página 121). En el caso del Pb, estas señales eran también bastante similares (si bien, la señal es un poco más ancha para el sólido) (véase figura III.1B, página 121). En ambos casos, las áreas de las señales eran comparables para muestras sólidas y para soluciones acuosas. La señal de Pb obtenida para el CRM mostraba una señal de absorción inespecífica alta, pero se encontraba retrasada con respecto a la señal del analito. El tiempo de integración se restringió a 3 s

para el Pb, para minimizar la posible influencia en la absorbancia de fondo.

Figura III.1 Señales obtenidas en la muestra de referencia NCS DC73304 en comparación con las obtenidas para disolución patrón acuosa



- Cadmio

El Cd mostró un comportamiento similar al del Pb, salvo en el efecto estabilizante de la matriz que se observó muy claramente

con este analito. Para este analito se suelen utilizar temperaturas de atomización por debajo de 2000°C, incluso para análisis directo en sólidos.^{23,32-36} Sin embargo, fue necesario utilizar una temperatura de al menos 2200°C para obtener una señal bien definida a partir de la muestra de referencia. Aún así se obtuvo una señal retrasada (0.5 s) y más ancha comparada con las soluciones patrón acuosas (véase figura III.1C, página 121). No obstante, las áreas de la señal eran análogas. No fue necesario el uso de modificante químico para este analito.

- **Arsénico**

La atomización del As se podía llevar a cabo, en principio, directamente sin ayuda de modificante químico. Se obtuvieron áreas comparables de las señales obtenidas para el CRM y los patrones acuosos (la señal del sólido aparecía un poco antes que la del patrón acuoso, véase figura III.1D en página 121). Las señales de absorción inespecífica que se obtuvieron eran similares a las descritas para el Pb, aunque no se incrementaban significativamente hasta los 4 s.

Sin embargo, bajo estas condiciones de trabajo, y a pesar de la excelente definición de la señal obtenida, se obtuvo baja precisión para este elemento y se detectó una deriva de sensibilidad con el número de atomizaciones de muestras sólidas. Este efecto se evitó mediante el uso de Pd como modificante químico.

Las condiciones de atomización no cambiaron con la adición de Pd y las señales obtenidas fueron muy similares, pero retrasadas 0.2 s, lo que demostraba la interacción del analito con el modificante.

- **Antimonio**

Para el Sb sucedió algo similar a lo observado para As. Para este elemento, se obtenía mejor repetitividad cuando se usaba

Pd como modificante. La señal de absorción inespecífica aumentaba significativamente con el tiempo (véase figura III.1E, página 121) como consecuencia de la alta temperatura de atomización que fue necesaria usar (2500°C) y la baja longitud de onda. Así el tiempo de integración se restringió a 2.5 s. Con estas condiciones de trabajo, el uso de patrones acuosos se hizo factible al obtener señales idénticas para muestras sólidas y soluciones patrón.

- Cromo

La determinación de Cr presentó una especial dificultad. Aunque normalmente para disoluciones patrón acuosas o incluso con muestras digeridas se obtienen señales bien definidas y con un único pico para temperaturas de atomización de 2400-2500°C, en este caso para el análisis directo de muestra sólida se obtuvieron señales bajas, mal definidas y poco reproducibles. La optimización de la temperatura de atomización no ofreció ninguna mejora, incluso utilizando la mayor temperatura posible (2700°C). Este hecho estaba de acuerdo con un trabajo previo en el cual fue necesario llevar a cabo una micro-fusión directamente en el horno de grafito para conseguir una atomización adecuada del Cr de un lodo con un alto contenido en silicatos.²⁷ En otro trabajo, sin embargo, se propuso otro método.²⁰ En el caso de la muestra estudiada en la presente tesis, la adición de 15µL de HNO₃ al 65% como modificante químico permitió la liberación del Cr de la matriz. La señal se encontraba claramente retrasada (aproximadamente 1.5 s) en comparación con la de la solución patrón acuosa (véase figura III.1F, página 121) y además, aparecía con una señal de absorción inespecífica mucho mayor, sin embargo estaba bien definida, era reproducible y mostraba un área comparable a la de la solución patrón acuosa.

- Mercurio

Como se ha discutido anteriormente, el bajo nivel de Hg en el CRM NCSDC 73304 hizo aconsejable la selección de otro CRM para estudiar el hg. Se escogió el CRM 021-100 *Metals on soils* con un nivel de Hg de $4.7 \mu\text{g g}^{-1}$.

La principal limitación para la determinación del Hg es su elevada volatilidad y la de sus compuestos. Por esta razón, fue necesario el uso de un modificante químico con el objetivo de estabilizar el analito antes de su atomización en el horno de grafito. Varios trabajos anteriores proponían el uso de paladio u otros elementos del grupo del platino.³⁸ Sin embargo, se obtuvieron mejores resultados siguiendo las indicaciones de RESANO *et al.*³⁷ usando una disolución de KMnO_4 que actuaba como agente oxidante evitando así pérdidas debidas a la reducción del Hg (propiciada por el grafito) hasta Hg metálico que es más volátil.

Se pudo atomizar eficazmente el analito desde las muestras sólidas a temperaturas entre 900°C y 1000°C , aunque es aconsejable el uso de temperaturas ligeramente superiores (1200°C) para obtener señales mejor definidas (menor cola). La elevada volatilidad del analito normalmente permitiría la atomización directa sin pirólisis previa. En el caso de la CRM021 100 Lot No: EO21 se utilizó una etapa previa de pirólisis a 600°C de corta duración (6 s) para eliminar la posible materia orgánica. En estas condiciones, los perfiles obtenidos en las muestras sólidas en estas condiciones son muy similares a los obtenidos en disolución (véase figura III.2, página 125), y por lo tanto, los valores obtenidos para la integración de las señales son comparables entre sólidos y disoluciones.

Figura III.2 Señal obtenida del mercurio para la muestra certificada CRM 021-100 (Metals on Soil de RTC) en comparación con la obtenida para disolución patrón acuosa

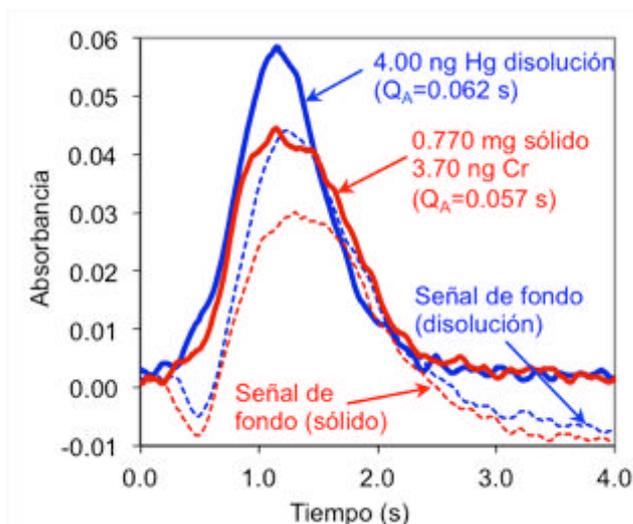
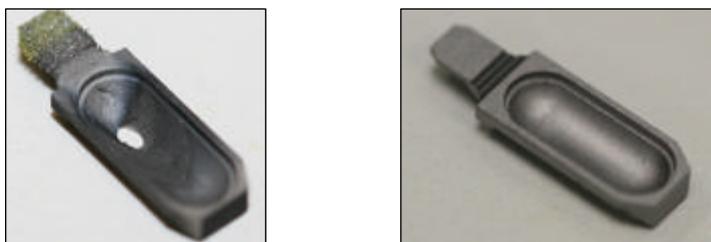


Figura III.3 Comparación de una plataforma nueva con una plataforma usada tras 23 análisis sin grafito



III.1.3.3 Protección de la plataforma

Durante la optimización del método, se observó que la vida útil de las plataformas era especialmente corta para la determinación de aquellos elementos cuya temperatura de atomización era igual o superior a 2400°C (todos excepto el Cd y Hg). Después de 20-30 análisis de muestras sólidas, el deterioro de la plataforma era evidente y solía terminar produciéndose un agujero en la plataforma (véase figura III.3, página 125), muy probablemente como consecuencia de la reacción de SiO_2 y el C (reducción a alta temperatura) de una forma similar a la descrita para análisis directo de alumina.³⁹ La masa de muestra también jugaba un papel importante. Una mayor cantidad de

muestra aceleraba el deterioro. Como consecuencia de ello y con el objetivo de aumentar la vida útil de la plataforma, se utilizó la adición de polvo de grafito. Esta adición no influía en la forma o la magnitud de las señales obtenidas y descritas anteriormente y sin embargo, permitía alargar la vida de la plataforma hasta 50-60 análisis (para masas de muestras de hasta 1 mg).

III.1.3.4 Análisis de las CRM. Desempeño del método.

El análisis de las muestras certificadas NCS DC73304 y CRM 021-100 se llevó a cabo mediante análisis directo de sólidos con GFAAS y según las condiciones descritas en las tablas II.3 a II.9 (páginas 80 a 86). El procedimiento se describe en el apartado II.5.4.1 (página 104). En todos los casos, la curva de calibración se construyó con soluciones acuosas estándar. Para cada determinación se realizaron cinco análisis de la muestra, y se tomó la mediana de estos cinco valores como valor representativo en lugar del promedio para minimizar la influencia de los valores anómalos.⁴⁰ Los resultados de las determinaciones se muestran en la tabla III.1 (página 127) en comparación con el valor de referencia. Se realizaron entre 8 y 10 determinaciones por elemento que se llevaron a cabo en, al menos, tres días diferentes.

Como puede observarse, se obtuvieron buenos resultados para todos los analitos en términos de exactitud ya que no se observaron diferencias significativas con los valores de referencia, lo que confirma que el uso de soluciones patrón acuosas para la recta de calibrado es adecuado. La precisión obtenida mediante SS-GFAAS (entre el 6 y el 9% de RSD) fue suficiente para el objetivo que se perseguía con este estudio. Los límites de detección resultan adecuados, ya que contenidos menores de $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ cumplen con los requisitos legales. El límite de detección obtenido para el Cd fue muy bajo debido a la excelente sensibilidad de la técnica para este elemento. Además, los resultados del Cd en términos de precisión y exactitud eran comparables a los obtenidos para el resto de analitos, aún cuando la muestra presentaba solo 15-30 pg de Cd (con la masa de muestra

introducida) (véase figura III.1C, página 121). Este aspecto prueba el potencial que presenta la técnica SS-GFAAS para análisis de ultratrazas. También es necesario mencionar que para el Cu, Pb y especialmente para Cr, los límites de detección podrían reducirse mediante el uso de líneas más sensibles.²⁷ No obstante, esto no se consideró necesario en el contexto de esta aplicación.

Tabla III.1 Resultados obtenidos para las muestras de referencia analizadas mediante GFAAS (n=8-10)

Analito	Referencia	Resultados mediante SS-GFAAS		
	Valor según certificado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Resultado \pm Int. Conf. 95% ($\mu\text{g g}^{-1}$)	RSD (%)	LOD ^a (ng g^{-1})
As	9.1 \pm 1.2	8.8 \pm 0.4	6.6	441
Cd	0.060 \pm 0.016	0.059 \pm 0.03	7.8	2
Cu	19 \pm 2	18.6 \pm 1.1	8.6	26
Cr	20 \pm 3	21.2 \pm 1.0	6.5	70
Pb	7.6 \pm 0.8	7.1 \pm 0.4	6.5	18
Sb	0.60 \pm 0.11	0.57 \pm 0.04	8.7	43
Hg	4.7 \pm 0.4	5.1 \pm 0.3	9.4	50

^aLos LODs se calcularon para una masa de muestra de 1 mg, excepto el del Hg que se calculó para 3 mg.

III.1.2.5 Análisis de muestras de sílice (SAS)

Tras la optimización y validación del método con la CRM, se utilizó la metodología desarrollada para el análisis y control de muestras reales de sílice producidas por la empresa Industrias Químicas del Ebro (IQE) durante un periodo de tiempo de 2 años en el que se analizaron más de 100 muestras. Durante este periodo de tiempo, se comprobó la robustez y consistencia del método de análisis. Los resultados obtenidos para una muestra representativa se muestran en la tabla III.2 (página 128).

Como puede observarse, el primer dato que salta a la vista es que los resultados de As, Sb, Hg y Cd se encontraban por debajo del

límite de detección. Estos resultados se obtuvieron para todas las muestras analizadas. Los técnicos analistas se encuentran con esta situación muy a menudo en su trabajo diario, cuando es necesario verificar que una muestra no contiene niveles detectables de algunos de los elementos considerados como peligrosos, que según la experiencia del fabricante, se espera que no estén presentes. El uso de la técnica SS-GFAAS es particularmente ventajosa para este caso ya que en 10 minutos por analito (si la señal no se detecta se realizan 3 réplicas por muestra, en lugar de 5) puede analizarse una muestra, evitándose así el tiempo y esfuerzo necesarios para la disolución de la misma. Mas aún, la SS-GFAAS garantiza unos límites de detección suficientemente bajos, con lo que la muestra, una vez analizada, está lista para su uso, tanto si va a ser destinada para la industria de la alimentación humana como aditivo (con los requisitos más estrictos) como si va a usarse en otros contextos (véase introducción en el apartado III.1.1, página 113).

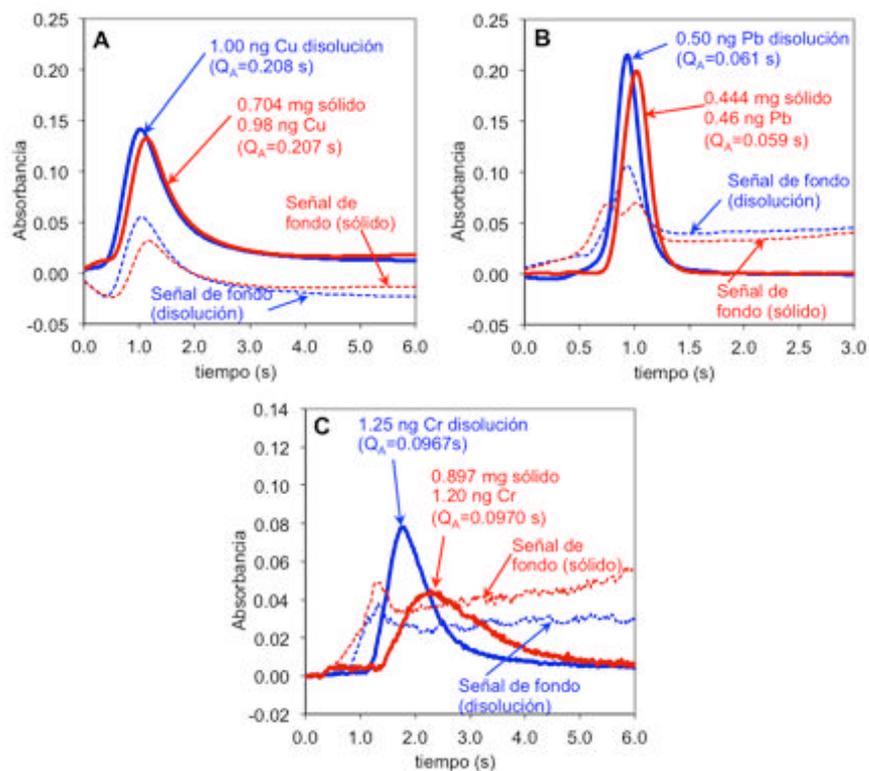
Tabla III.2 Resultados obtenidos para muestras de sílice (EBROSIL 001) analizadas mediante GFAAS (n=8-10)

	Resultados Digestion + ICP-OES		Resultados mediante SS-GFAAS		Ensayo de recuperación SS-GFAAS	
	Resultado ± Int. Conf. 95% (µg g ⁻¹)	RSD (%)	Resultado ± Int. Conf. 95% (µg g ⁻¹) ¹	RSD (%)	Analito añadido (pg)	Resultado tras ensayo (pg)
As	< 0.5		< 0.04		1000	943 ± 87
Cd	< 0.02		< 0.002		100	102 ± 9
Cu	1.39 ± 0.14	10.3	1.30 ± 0.11	8.3		
Cr	1.34 ± 0.21	9.5	1.28 ± 0.10	6.5		
Hg	<0.4		<0.03		1000	975 ± 61
Pb	1.04 ± 0.14 ^a	8.5	1.17 ± 0.11	7.8		
Sb	< 0.4		< 0.04		1000	993 ± 75

^a Para el Pb las medidas no se realizaron con ICP-OES debido a su alto límite de detección con esta técnica. Las medidas se realizaron tras su digestión con espectrometría de absorción atómica con cámara de grafito con fuente continua de alta resolución (HR-CS GFAAS).

En los elementos, cuyo resultado fue inferior al límite de detección, se realizaron ensayos de recuperación con el objetivo de validar esta metodología. De este modo se dopó la muestra (Ebrosil 001) con cantidades conocidas de As, Cd, Hg y Sb para obtener aproximadamente $1 \mu\text{g g}^{-1}$ de As, Hg y Sb y $0.1 \mu\text{g g}^{-1}$ de Cd. Se obtuvieron resultados satisfactorios en el ensayo de recuperación tal y como puede observarse en la tabla III.2 (página 128).

Figura III.4 Señales obtenidas para muestras de sílice en comparación con las obtenidas para disoluciones acuosas para Cu (A), Pb (B) y Cr (C)



Los otros tres elementos fueron determinados en todas las muestras. Las señales obtenidas para estos elementos se muestran en la figura III.4. La forma de la señal es muy similar a la obtenida para el CRM. Esto confirma que el CRM era adecuado para la validación. En todos los casos, se obtuvieron señales bien definidas con un único pico. Los valores obtenidos para Ebrosil 001 y mostrados en la tabla

III.2 (página 128) pueden considerarse representativos en términos de precisión y concentración del analito.

La precisión obtenida también es similar a la obtenida para el CRM, 6-9% RSD, y entra dentro de los valores esperados para la técnica SS-GFAAS.¹⁵ Este parámetro (RSD) se suele reseñar como un punto débil de la técnica SS-GFAAS, debido a las bajas masas de muestra que se analizan. Sin embargo, para muestras complejas con niveles de concentración de $1 \mu\text{g g}^{-1}$ o por debajo, resulta complicado mejorar estos valores de RSD incluso cuando se lleva a cabo disolución de la muestra (como puede observarse en la tabla III.2, página 128).

Las concentraciones de analito varían para diferentes muestras en el rango de 0.7 a $1.2 \mu\text{g g}^{-1}$ para el Cu, de 1.0 a $1.3 \mu\text{g g}^{-1}$ para el Cr y de 1.1 a $2.2 \mu\text{g g}^{-1}$ para el Pb. De estos elementos, probablemente el que mayor preocupación causa por su toxicidad y las regulaciones impuestas es el Pb. Además, este elemento no podría determinarse mediante digestión y análisis por ICP-OES con la concentración que presentan estas muestras. Esta es la razón por la que el valor de referencia de la tabla III.2 (página 128) se obtuvo con HR-CS GFAAS después de la digestión de la muestra.

La rápida detección de As, Cd, Hg y Sb y la determinación directa de Pb a niveles de concentración de $\mu\text{g g}^{-1}$, hacen de la SS-GFAAS una técnica óptima para el análisis de sílice amorfa sintética, aunque presente alguna desventaja, como la imposibilidad de realizar análisis multielementales, que se ve compensada por la rapidez del método.

Dado que una de las materias primas en la síntesis de la sílice amorfa es arena, se consideró que ésta podría ser el origen del Pb encontrado en la sílice. Para verificar esta hipótesis, se realizaron determinaciones de Pb en tres tipos de arenas (procedentes de tres proveedores distintos), en las que se obtuvieron niveles de Pb significativos. De esta forma quedó demostrado, que el método desarrollado para la sílice puede utilizarse también para otras muestras

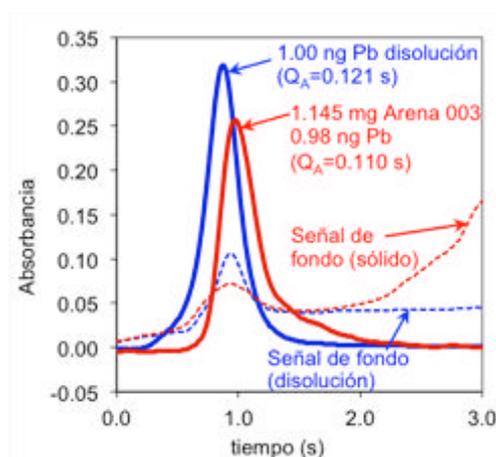
de naturaleza inorgánica similar, como demuestra la tabla III.3. La señal obtenida para el Pb en esta muestra era muy similar a las obtenidas para sílices.

Tabla III.3 Resultados de Pb obtenidos para tres muestras de arena

Muestra	Valor de referencia ^a Resultado \pm Int. Conf 95% ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	SS-GFAAS Resultado \pm Int. Conf 95% ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
Arena 001	2.79 ± 0.25	2.90 ± 0.27
Arena 002	1.33 ± 0.13	1.38 ± 0.06
Arena 003	0.94 ± 0.12	0.85 ± 0.10

^a Los valores de referencia se obtuvieron con HR-CS GFAAS tras digestión de la muestra (n=4)

Figura III.5 Señal de Pb obtenida para una muestra de arena en comparación con la obtenida para disolución acuosa



III.1.4 Conclusiones

Se han demostrado las posibilidades de la técnica SS-GFAAS para el análisis directo de muestras de sílice. El método desarrollado combina las ventajas inherentes a la mayoría de métodos de análisis directo de sólidos (buena sensibilidad, rapidez, evita el uso de reactivos peligrosos) con la posibilidad de obtener resultados exactos mediante el calibrado con soluciones patrón acuosas ofreciendo unos

resultados con una precisión adecuada (por debajo del 10% de RSD) para el objetivo de los análisis.

En este sentido, es posible llevar a cabo los análisis de las muestras de un modo efectivo, evitando procesos de digestión normalmente laboriosos que requieren el uso de reactivos peligrosos (por ejemplo el HF) y ofreciendo límites de detección que son suficientemente bajos para cumplir con los requisitos legales, con lo que se ajusta bien a los requisitos buscados por los laboratorios industriales.

III.1.5 Bibliografía

1. R.K. Iler, *The Chemistry of silica: solubility, polymerization, colloids and surface properties and biochemistry of silica*, Wiley-Interscience, New-York, 1979.
2. Synthetic Amorphous Silica (CAS No 7631-86-9), *Joint Assessment of Commodity Chemicals Report No 51*, European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Brussels, 2006, pp. 1-237.
3. www.iqe.es, accedida por última vez en Junio, 2013.
4. Comunicación de la Comisión al Parlamento Europeo, al Consejo y al Comité Económico y Social Europeo, *Segunda revisión de la normativa sobre los nanomateriales* COM/2012/0572 .
5. *Food Chemicals Codex*, 7th ed. United Book Press Inc, Baltimore, 2010.
6. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, *Combined Compendium of Food Additive Specifications*, Volume 4 Analytical Methods, Test Procedures and Laboratory Solutions Used by and Referenced in the Food Additive Specifications. Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations, 2006. Roma.
7. M. Resano, E. García-Ruiz, M.A. Belarra, F. Vanhaecke, K.S. McIntosh, *Solid sampling in the determination of precious metals at*

- ultratrace levels*, Trends in Analytical Chemistry, 2007, 26, 385-395.
8. M. de la Guardia, *Green analytical chemistry*, Trends in Analytical Chemistry, 2010, 29, 577.
 9. S.L.C. Ferreira, M. Miró, E.G.P. Da Silva, G.D. Matos, P.S. Dos Reis, G.C. Brandao, W.N.L. dos Santos, A.T. Duarte, M.G.R. Vale, R.G.O. Araujo, *Slurry sampling-an analytical strategy for the determination of metals and metalloids by spectroanalytical techniques*, Applied Spectroscopy Reviews, 2010, 45, 44-62.
 10. M.H. Ramsey, P.J. Potts, P.C. Webb, P. Watkins, J.S. Watson, B.J. Coles, *An objective assessment of analytical method precision: comparison of ICP-AES and XRF for the analysis of silicate rocks*, Chemical Geology, 1995, 124, 1-19.
 11. J. Enzweiler, P.C. Webb, *Determination of trace elements in silicate rocks by X-ray fluorescence spectrometry on 1:5 glass discs: comparison of accuracy and precision with pressed powder pellet analysis*, Chemical Geology, 1996, 130, 195-202.
 12. R. Falcone, S. Hreglich, M. Vallotto, M. Verità, *X-ray fluorescence analysis of raw materials for the glass and ceramic industries*, Glass Technology, 2002, 43, 39-48.
 13. M. Pouzar, T. Kratochvíl, L. Capek, L. Smoláková, T. Cernohorský, A. Krejcová, L. Hromádka, *Quantitative LIBS analysis of vanadium in samples of hexagonal mesoporous silica catalysts* Talanta, 2011, 83, 1659-1664.
 14. B. Welz, M.G.R. Vale, D.L.G. Borges, U. Heitmann, *Progress in direct solid sampling analysis using line source and high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007, 389, 2085-2095.
 15. M.A. Belarra, M. Resano, F. Vanhaecke, L. Moens, *Direct solid sampling with electrothermal atomization/vaporization. What for and how?*, Trends in Analytical Chemistry, 2002, 21, 828-839.
 16. M.G.R. Vale, N. Oleszczuk, W.N.L. dos Santos, *Current status of direct solid sampling for electrothermal atomic absorption spectrometry—A*

- critical review of the development between 1995 and 2005*, Applied Spectroscopy, 2006, 41, 377-400.
17. M. Resano, F. Vanhaecke, M.T.C. de Loos-Vollebregt, *Electrothermal vaporization for sample introduction in atomic absorption, atomic emission and plasma mass spectrometry - a critical review with focus on solid sampling and slurry analysis*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry., 2008, 23, 1450-1475.
 18. M. Resano, M. Aramendía, E. Garcia-Ruiz, C. Crespo, M.A. Belarra, *Solid sampling - graphite furnace atomic absorption spectrometry for the direct determination of silver at trace and ultratrace levels*, Analytica Chimica Acta, 2006, 571, 142-149.
 19. M.A. Belarra, C. Crespo, M.P. Martínez-Garbayo, M. Resano, *Direct determination of cobalt and zinc in samples of different volatility by means of solid sampling – graphite furnace atomic absorption spectrometry*, Spectrochimica Acta Part B, 2003, 58, 1847-1858.
 20. P. Török, M. Zemberyová, *A study of the direct determination of Cd, Cr, Cu, Pb and Zn in certified reference materials of soils by solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry*, Spectrochimica Acta Part B, 2011, 66, 93-97.
 21. P. Török, M. Zemberyová, *Utilization of W/Mg(NO₃)₂ modifiers for the direct determination of As and Sb in soils, sewage sludge and sediments by solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry*, Spectrochimica Acta Part B, 2010, 65, 291-296.
 22. I.M. Dittert, D.L.G. Borges, B. Welz, A.J. Curtius, H. Becker-Ross, *Determination of silver in geological samples using high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry and direct solid sampling*, Microchimica Acta, 2009, 167, 1-6.
 23. L.F. Rodrigues, J.C.P. de Mattos, V.L. Dressler, D. Pozebon, E.M.M. Flores, *Determination of cadmium, copper and lead in alumina based catalysts by direct solid sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry*, Spectrochimica Acta Part B, 2007, 62, 933-938.

24. R.C. Bolzan, L.F. Rodrigues, J.C.P. de Mattos, V.L. Dressler, E.M.M. Flores, *Chromium determination in pharmaceutical grade barium sulfate by solid sampling electro-thermal atomic absorption spectrometry with Zeeman-effect background correction*, *Talanta*, 2007, 74, 119-124.
25. M.G.R. Vale, M.M. Silva, B. Welz, R. Nowka, *Control of spectral and non-spectral interferences in the determination of thallium in river and marine sediments using solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2002, 17, 38-45.
26. S. Hauptkorn, V. Krivan, *Solution and slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry for the analysis of high purity quartz*, *Spectrochimica Acta Part B*, 1996, 51, 1197-1210.
27. M. Resano, E. Garcia-Ruiz, F. Vanhaecke, C. Crespo, M.A. Belarra, *High-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry: Is it as good as it sounds? A critical review*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2004, 19, 958-965.
28. M.A. Belarra, C. Crespo, M. Resano, J.R. Castillo, *Direct determination of copper and lead in sewage sludge by solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry-study of the interference reduction in the gaseous phase working in non-stop flow conditions*, *Spectrochimica Acta Part B*, 2000, 55, 865-874.
29. M. Resano, J. Briceño, M. Aramendía, M.A. Belarra, *Solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry for the direct determination of boron in plant tissues*, *Analytica Chimica Acta*, 2007, 582, 214-222.
30. M. Resano, M. Aramendía, E. Garcia-Ruiz, M.A. Belarra, *Solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry for the direct determination of Au in samples of various natures*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2005, 20, 479-481.
31. M. Resano, E. Garcia-Ruiz, C. Crespo, F. Vanhaecke, M.A. Belarra, *Solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry*

- for palladium determination at trace and ultratrace levels*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2003, 18, 1477-1484.
32. F. Vignola, D.L.G. Borges, A.J. Curtius, B. Welz, H. Becker-Ross, *Simultaneous determination of Cd and Fe in sewage sludge by high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry with slurry sampling*, Microchemical Journal, 2010, 95, 333-336.
 33. A. Detcheva, K.H. Grobecker, *Determination of trace elements in aquatic plants by means of solid sampling Zeeman atomic absorption spectrometry (SS-ZAAS)*, Environmental Chemical Letters, 2008, 6, 183-187.
 34. M.G.R. Vale, M.M. Silva, B. Welz, É.C. Lima, *Determination of cadmium, copper and lead in mineral coal using solid sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry*, Spectrochimica Acta Part B, 2001, 56, 1859-1873.
 35. M.A. Belarra, M. Resano, S. Rodríguez, J. Urchaga, J.R. Castillo, *The use of chemical modifiers in the determination of cadmium in sewage sludge and tin in PVC by solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry*, Spectrochimica Acta Part B, 1999, 54, 787-795.
 36. I. López-García, P. Viñas, J. Arroyo-Cortéz, M. Hernández-Córdoba, *Rapid determination of lead and cadmium in sewage sludge samples using electrothermal atomic absorption spectrometry with slurry sample introduction*, Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 2000, 367, 727-732.
 37. M. Resano, E. García-Ruiz, M. Aramendía, M.A. Belarra, *olid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry for Hg monitoring in soils. Performance as a quantitative and as a screening method*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry., 2005, 20, 1374-1390.
 38. A.F. Da Silva, B. Welz, A.J. Curtius, *Noble metals as permanent chemical modifiers for the determination of mercury in environmental reference materials using solid sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry and calibration against aqueous standards*, Spectrochimica

Acta Part B, 2002, 57, 2031-2045.

39. M. Lucic, V. Krivan, *Solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry for analysis of aluminium oxide powders*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry., 1998, 13, 1133-1139.
40. M.A. Belarra, M. Resano, J.R. Castillo, *Theoretical evaluation of solid sampling- electrothermal atomic absorption spectrometry for screening purposes*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 1999, 14, 547-552.

III.2 MONITORIZACIÓN DE LA BIODISTRIBUCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO EN TEJIDOS DE RATÓN

III.2.1 Introducción

El oro (Au), considerado como el metal precioso por excelencia desde hace milenios, interesa cada vez más al mundo científico por sus cualidades funcionales. Los atributos clásicos del Au consistían fundamentalmente en que es inerte, inoxidable (razón por la que se viene utilizando con fines médicos prácticamente desde siempre), buen conductor de la electricidad, interesante por sus variaciones cromáticas y su capacidad de unirse con moléculas orgánicas.

Pero si se desciende al nivel de sus nanopartículas, el metal precioso revela unas aptitudes insospechadas hasta hace poco. Las nanopartículas de oro (AuNPs) combinan una elevada relación superficie/volumen con una elevada reactividad superficial y una cualidad no-oxidativa, lo que se traduce en una elevada estabilidad. Estas nanopartículas muestran, además, unas propiedades ópticas, biológicas, magnéticas y electrónicas que se pueden ajustar en función del objetivo deseado y que dependen del tamaño de nanopartícula. Esto hace que las AuNPs y sus productos derivados sean muy apreciados en aplicaciones médicas y biológicas.¹ Entre su multitud de

aplicaciones cabe destacar tecnologías terapéuticas, pruebas de diagnóstico rápidas y nuevos métodos de detección en patologías.^{2,3}

Las AuNPs interactúan específicamente con algunas proteínas inhibiendo su actividad. Este hecho abre un camino prometedor en la investigación para la cura de muchas enfermedades como el cáncer, artritis, degeneración macular, etc. y todas aquellas que sean inducidas por una proteína. BHATTACHARYA y MUKHERJEE⁴ han realizado una recopilación de las aplicaciones de las AuNPs en el tratamiento contra el cáncer. Las AuNPs pueden combinarse, además, con numerosos productos químicos y bioquímicos para producir un amplio espectro de productos híbridos.^{3,5} Éstos se producen mediante el recubrimiento de la superficie de las nanopartículas con biomoléculas específicas⁶ (por ejemplo proteínas de anticuerpos o antígenos), lo que actualmente se conoce como biofuncionalización. Debido a la nanoescala de estas formulaciones, estas nanopartículas recubiertas o funcionalizadas se usan como nano-fármacos con multitud de usos, por ejemplo para el diagnóstico por imagen no invasivo⁵ o para conseguir que un fármaco se dirija a un órgano específico. En este último caso, las AuNPs funcionalizadas, cuando se inoculan en el cuerpo, se fijan en sitios específicos que se corresponden a las proteínas a las que van unidas. Reducidas a dimensiones muy específicas (de 5 a 10 nm), las AuNPs reaccionan a las emisiones láser de la gama infrarroja reflejando una parte de la energía en forma de radiación luminosa mientras que la otra parte se convierte en calor. De esta manera, calentando las AuNPs con radiación infrarroja se pueden detectar, e incluso destruir, las células cancerosas.⁷

A pesar de los potenciales beneficios derivados del uso de AuNPs, existe también una preocupación creciente por la seguridad y la biocompatibilidad de estos nanomateriales. Las AuNPs han sido consideradas inertes porque el Au como materia prima es prácticamente inerte. Sin embargo, conforme el tamaño se reduce a dimensiones en el rango de la nanoescala, el Au puede comportarse de un modo muy diferente. Como señalan AILLON *et al.*, las mismas propiedades que hacen que estas partículas sean tan atractivas para

aplicaciones médicas (su pequeñísimo tamaño con potencial para cruzar la barrera cerebro-sangre) hacen también que sean potencialmente tóxicas.⁸ Actualmente todavía no hay suficiente información sobre su impacto¹ en sus efectos en la salud humana y el medio ambiente. Existen algunos estudios pero se centran solo en una exposición local y accidental a las nanopartículas (por ejemplo contacto con la piel o inhalación).^{5,8}

Como consecuencia de esta situación, es necesario llevar a cabo más estudios *in vivo* con nanopartículas. En bibliografía, se encuentran referencias donde se muestra la necesidad de validación de métodos analíticos para determinar la concentración de nanopartículas bien con el objetivo de estudiar su aplicación para usos terapéuticos o bien para estudiar su toxicidad.⁸ La evaluación de estas nanopartículas debe incluir tanto la caracterización físico-química y la evaluación de su esterilidad y pirogenicidad (propiedad que tiene una sustancia, que al inyectarse en el organismo causa una subida de temperatura) como estudios de biodistribución. Así, el desarrollo de capacidades para detectar concentraciones de nanopartículas a niveles naturales (niveles habituales presentes en fármacos) es una prioridad en el futuro inmediato de la investigación.⁹ En este sentido, un trabajo reciente analizaba las posibilidades de la espectrometría de masas inorgánica.¹⁰

Hasta la fecha de realización de este trabajo, se habían realizado algunos estudios previos de toxicidad *in vivo* usando espectrometría de masas mediante plasma acoplado inductivamente (ICP-MS)¹¹⁻¹³ o mediante espectrometría de absorción atómica con horno de grafito (GFAAS) tras digestión previa de los tejidos.¹⁴ Sin embargo, no se encontraron referencias al uso de la técnica de GFAAS con análisis directo de sólidos (SS-GFAAS) para investigar la biodistribución de AuNPs en estudios toxicológicos *in vivo*.

El desarrollo de métodos analíticos fiables capaces de realizar una determinación cuantitativa de Au en muestras sólidas con bajos niveles de concentración (la abundancia de este elemento en materiales geológicos o biológicos normalmente se encuentra en el rango de $\mu\text{g g}^{-1}$ a ng g^{-1}) es un problema analítico que actualmente

supone un gran desafío. Con frecuencia éste implica el uso de procedimientos de disolución tediosos, seguidos de etapas de pre-concentración para minimizar la influencia de la matriz y/o de las interferencias espectrales¹⁵⁻¹⁸ incluso cuando se usan técnicas muy sensibles, tales como ICP-MS o GFAAS.¹⁹⁻²¹ En el caso particular de la determinación de Au en materiales biológicos, el uso del método de adiciones estándar ha sido crucial para conseguir resultados precisos en algunas situaciones.²² Obviamente, mientras estos métodos pueden proporcionar resultados fiables, normalmente son más lentos y pueden sufrir problemas de contaminación o, al menos, requieren el uso de ácidos de elevada pureza ya que el grado de calidad analítica ($0.05 \text{ mgAu} \cdot \text{L}^{-1}$) normalmente no es suficiente para asegurar blancos que sean suficientemente bajos.

Por estas razones, la determinación de Au, y de los metales nobles en general, es una de las áreas del análisis elemental en las cuales el uso del análisis directo de sólidos podría ser más ventajoso.²³ En particular, el uso de SS-GFAAS parece prometedor debido al potencial que esta técnica presenta para analizar directamente muestras biológicas con una preparación mínima de los tejidos, mostrando suficiente sensibilidad para el análisis de pequeñas cantidades de órganos, en los cuales el analito se encuentra en concentraciones muy bajas (a niveles de $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$).²⁴ Este potencial se ha mejorado más aún con la llegada de la fuente continua de alta resolución (HR-CS GFAAS),^{25,26} la que, como ya se ha comentado en capítulos anteriores, entre otras características, ofrece un desempeño mejorado para la corrección de las posibles interferencias espectrales, lo que puede hacer factible el uso de calibraciones sencillas (construcción de la curva de calibración con patrones acuosos).

Debe resaltarse que el uso de un protocolo sencillo es particularmente importante en el contexto de la investigación biomédica, ya que el número de muestras para análisis suele ser muy elevado.

III.2.2 Objetivo del trabajo

En este trabajo se exploraron las capacidades de la técnica HR-CS GFAAS para la determinación directa de Au en diferentes tejidos de órganos de ratón a los que previamente se les había expuesto a AuNPs. El objetivo fue desarrollar una metodología rápida y sencilla que permitiera el uso de patrones acuosos para una calibración directa. Las AuNPs se habían preparado de forma que presentaban un tamaño aproximado de 2 nm, en un intento de maximizar su capacidad para penetrar dentro de los tejidos. Además, las AuNPs se habían funcionalizado bien con glucosa o bien con lactosa, para evaluar posibles diferencias en su comportamiento (véase apartado II.3, en la página 73, donde se describen las muestras estudiadas).

Anteriormente a este trabajo, la técnica SS-GFAAS se había utilizado rara vez para la determinación de Au²⁷⁻²⁹ y no se encontraron trabajos recientes sobre su uso para el análisis de muestras biológicas. Sin embargo, de acuerdo con algunos resultados anteriores obtenidos para analitos similares tales como la plata,³⁰ se esperaba que pudiera ofrecer un desempeño adecuado, como ya se ha comentado en la introducción de esta sección (apartado III.2.1, página 137), teniendo en cuenta las mejoras introducidas con la llegada de la tecnología de la fuente continua de alta resolución resolución resolución.

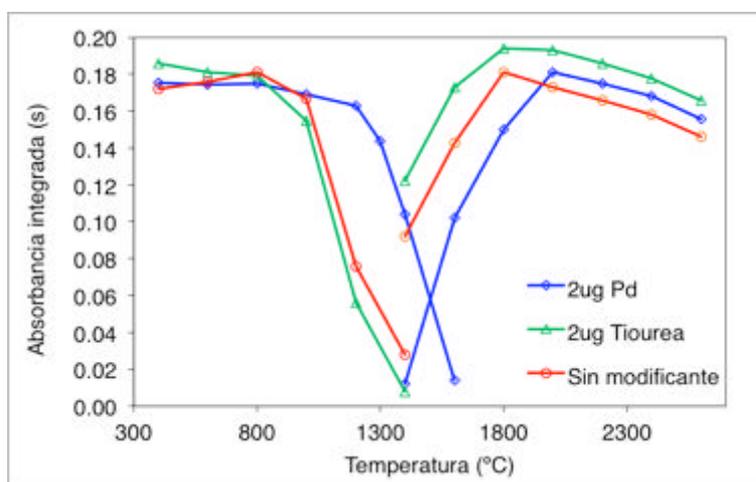
III.2.3 Desarrollo del método

III.2.3.1 Optimización de las condiciones para la atomización del Au

La monitorización del Au mediante GFAAS normalmente se suele llevar a cabo en presencia de un modificante químico, que ayuda a estabilizar el analito durante la pirólisis, así como a prevenir la posible aparición de señales con dos picos lo que ocurre cuando el tubo de grafito se envejece²⁹ o en presencia de una gran cantidad de compuestos orgánicos³¹ y que puede conducir a una baja reproducibilidad. El Pd^{29,32} y a veces compuestos con base S tales como la tiourea³³ son los modificantes que más frecuentemente se usan para la determinación este analito.

Con ambos modificantes se obtuvieron señales de Au bien definidas con un único pico y con una sensibilidad similar. Sin embargo, se prefirió el Pd frente a la tiourea ya que esta última no ayudaba mucho a estabilizar el Au durante la pirólisis (véase figura III.6. El Pd, por otro lado, permitía el uso de temperaturas de pirólisis de hasta 1200°C sin perjuicio de la sensibilidad, lo que parecía ser suficiente para conseguir una eliminación eficiente de la matriz biológica antes de la atomización del Au, minimizando así los efectos de matriz. Los blancos obtenidos con Pd fueron siempre satisfactorios (normalmente $Q_A \leq 0.001$ s), indicando la ausencia de contaminación a los niveles de concentración usados.

Figura III.6 Curvas de atomización (con temperatura de pirólisis de 1000°C) y curvas de pirólisis (con temperatura de atomización de 2100°C) para 300 µg de Au y 242.795 nm



En cuanto a las líneas atómicas disponibles y su uso analítico, la tabla III.4 (página 143) muestra un resumen de los resultados obtenidos usando tres píxeles de detección para la cuantificación de la señal, ya que esta configuración normalmente es la recomendada para obtener los mejores límites de detección (LODs).³⁴ Las líneas más sensibles del Au son 242.795 nm y 267.595 nm. Teniendo en cuenta el pequeño contenido de Au que se esperaba en todas las muestras de esta investigación, se consideró que la línea más adecuada para el análisis era la línea más sensible, con la posible excepción de los

tejidos de hígado y riñón (las nanopartículas de Au se acumulaban de forma preferente en estos órganos), para los que se seleccionó la línea de 267.595 nm con mantenimiento de caudal de Ar durante la atomización (con lo que se consiguió una pérdida de sensibilidad de aproximadamente unas 10 veces) ya que la sensibilidad de la otra línea alternativa localizada a 312.278 nm era demasiado baja.

Tabla III.4 Desempeño analítico de las diferentes líneas atómicas para la monitorización de Au usando HR-CS GFAAS

Línea atómica (nm)	Rango lineal ^a (ng Au)	Sensibilidad ^a (ng s ⁻¹)	Masa Característica ^a (pg)
242.795	0.02 - 1.5	0.55	7.5
267.595	0.05 - 3.0	0.25	16.6
312.278	100 - 5000	1.50 10 ⁻⁴	27600

^aLa sensibilidad disminuye en un factor de aproximadamente 10 si durante la etapa de atomización se utiliza el caudal máximo en lugar de no utilizar caudal de Ar. El rango lineal y la masa característica también se ven afectados.

Debe resaltarse que, en este caso en particular, el uso de la instrumentación HR-CS GFAAS no aportó una ventaja significativa en términos de sensibilidad en comparación con la instrumentación tradicional de fuente de línea (LS GFAAS), lo cual concuerda con varios trabajos previos.^{35,36} En uno de ellos, en el que se habían utilizado condiciones muy parecidas (tubo de grafito similar con calentamiento transversal, Pd como modificante y el mismo programa de temperatura) para la determinación de Au en un instrumento de LS-GFAAS equipado con corrección de D₂,²⁸ los valores de sensibilidad reportados fueron totalmente análogos a los mostrados en la tabla III.4. La técnica HR-CS GFAAS mostró la posibilidad de mejorar un poco más la sensibilidad mediante el incremento del número de píxeles en la detección a 7 (lo que significa utilizar prácticamente todo el perfil de la señal incluyendo las alas y no solo el área central), pero finalmente esta configuración no fue la seleccionada ya que la señal solo se incrementó un 20% y normalmente el límite de detección se ve deteriorado en un factor de

casi 2, debido a que los píxeles de las alas contribuyen a un mayor nivel de ruido.^{34,35}

A cambio, las dos ventajas principales de la instrumentación HR-CS GFAAS para esta aplicación fueron las derivadas de la alta resolución del monocromador y del proceso simultáneo de medida. Como ya ha sido discutido por WELZ,³⁶ este instrumento usa una matriz CCD con 588 píxeles independientes, 200 de los cuales se usan normalmente con fines analíticos, y todos se iluminan y se leen simultáneamente. Como solo unos pocos de estos píxeles se usan para la medida de la absorción atómica, el resto de ellos pueden usarse con otros propósitos, tales como corregir interferencias espectrales no deseadas que tienen lugar simultáneamente en todos los píxeles (por ejemplo el ruido de parpadeo de la lámpara). Además, la mayor intensidad y estabilidad de la lámpara se traduce en mejores límites de detección. De hecho, se había obtenido ya un límite de detección de 15 pg para LS-GFAAS,²⁹ mientras que en este trabajo se obtuvo un límite de detección de 3 pg para las condiciones más sensibles.

La segunda ventaja esperada y más importante para esta aplicación fue que se consiguió una mayor selectividad. Para la línea atómica 242.795 nm, el intervalo de longitud de onda cubierto por cada uno de los 200 píxeles de detección fue aproximadamente 1.4 pm. Este nivel de resolución y el hecho de que todo el entorno espectral alrededor del píxel central (aproximadamente se cubrían 0.28 nm en este caso) se midió simultáneamente, permitieron la detección de interferencias potenciales que pueden corregirse de una forma mucho más eficiente que con los instrumentos LS GFAAS, que no podrían corregir fondos que cambian rápidamente, como se demostrará en el apartado III.2.3.3 (página 147).

III.2.3.2 Control de las soluciones de AuNPs

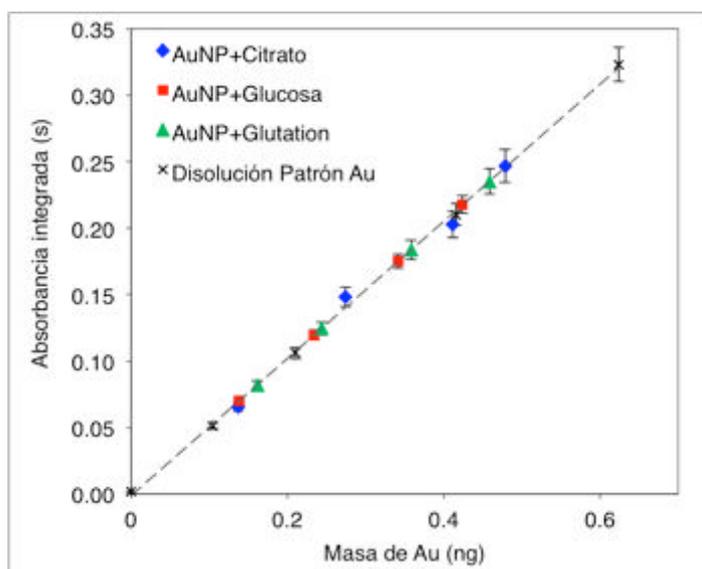
Puesto que el propósito de este trabajo fue desarrollar un procedimiento para la monitorización de AuNPs en tejidos biológicos, era necesario comprobar que la señal analítica de las AuNPs era comparable a la obtenida con soluciones de Au patrón acuosas, con el

objetivo de utilizar un procedimiento de calibración sencillo. En principio, esta condición no debería ser difícil de cumplir, particularmente para un metal noble como el Au, que tiene una alta probabilidad de ser reducido a su estado metálico (y así, sería de esperar que formara AuNPs) en el horno de grafito durante las etapas de pirólisis y secado. Sin embargo, en la práctica el mecanismo de atomización del Au puede ser no tan simple³² y además las AuNPs normalmente no se usan tal cual, sino que normalmente se funcionalizan con algunos compuestos orgánicos, lo que podría afectar al modo en el que el Au interactúa con el modificante químico y se atomiza.

Así, una vez se determinaron las condiciones óptimas para las soluciones patrón acuosas de Au, se decidió investigar si se obtenía una respuesta similar para las soluciones de AuNPs en las mismas condiciones de análisis, antes de pasar a las muestras sólidas. Para esto, se prepararon tres lotes de AuNPs funcionalizadas con citrato, glucosa y glutatión, respectivamente como se describe en el apartado II.3 (página 73). Se disponía de una suspensión madre concentrada de estas nanopartículas (aproximadamente $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). Para determinar de forma precisa la cantidad de Au, se realizó una digestión con agua regia de una alícuota de cada una de estas suspensiones, posteriormente se diluyó en HCl 0.12M para asegurar la estabilidad de los iones Au y se analizaron mediante espectrometría de absorción atómica por llama. Una vez que se obtuvo la concentración de Au, se diluyeron distintas alícuotas de la suspensión madre para construir curvas de calibración con niveles por debajo del ng de Au. La figura III.7, en la página 146, muestra los resultados obtenidos. Como puede observarse, la sensibilidad obtenida es prácticamente idéntica para todas las soluciones de AuNPs y también para las soluciones patrón acuosas de Au. La máxima variación en las pendientes de las rectas de calibración fue solo de un 2% aproximadamente, lo que está dentro de la incertidumbre de las medidas de GFAAS a estos niveles de concentración (3-5% RSD). Estos resultados abren la posibilidad de determinar Au en tejidos biológicos y calibrar con patrones acuosos,

independientemente de la forma en la que el Au se encuentre en la muestra, ya que todavía no se conoce bien si cuando se inocula el Au en los tejidos, permanece en forma de nanopartículas o si el organismo lo asimila en forma iónica. En cualquiera de estos casos, la señal de absorción atómica no debería verse afectada.

Figura III.7 Comparación de la respuesta analítica de la solución patrón de Au y de las AuNPs funcionalizadas con distintos compuestos (condiciones de tabla II.10, página 87). La línea discontinua representa la curva de calibración.



Aunque no es prioritario para el presente trabajo, debe mencionarse que la determinación exacta de la cantidad de Au presente en las suspensiones de AuNPs es un aspecto de interés para los fabricantes de nanopartículas ya que les ayuda a calcular la eficiencia de sus procedimientos de fabricación. Los resultados de este experimento sugieren que el empleo de GFAAS permite realizar un análisis sencillo de las nanopartículas simplemente diluyendo las muestras, mientras que para la mayoría de las otras técnicas se necesita normalmente una digestión previa de las mismas.

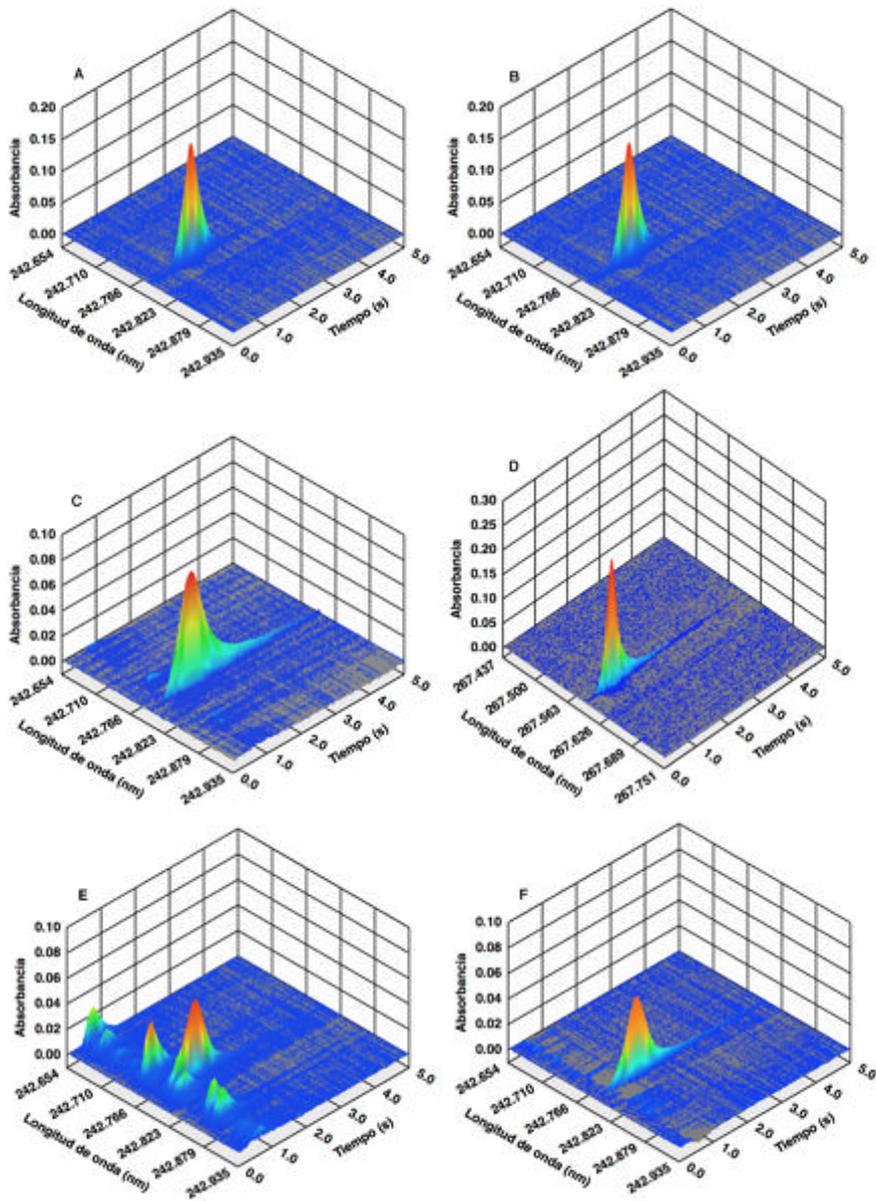
III.2.3.3 Análisis de la muestra mediante análisis directo de sólidos HR-CS GFAAS. Solución a las interferencias espectrales.

Finalmente, se llevó a cabo el análisis de las muestras sólidas usando las condiciones mostradas en la tabla II.10 (página 87). En principio, las muestras biológicas son matrices complejas y en la bibliografía a veces se propone para este tipo de muestras la adición de una etapa de pirólisis extra en la que se añade oxígeno para una eliminación más eficiente de la matriz. Sin embargo, en este caso, la estabilidad térmica del Au en presencia de Pd posibilitó el uso de una temperatura de pirólisis suficientemente alta para maximizar la vaporización de la matriz biológica. No se encontraron residuos carbonosos en la plataforma tras el análisis. De este modo, se prefirió un programa de temperatura rápido y sencillo, como el descrito en la tabla II.10 (página 87).

La señal obtenida para la mayoría de tejidos biológicos estaba bien definida y presentaba un único pico. El espectro 3D no mostraba interferencias potenciales salvo una única excepción (véase figura III.8E, página 148 y figura III.9C, página 149), que se observó para los tejidos de cerebro.

Las razones para este comportamiento estuvieron relacionadas fundamentalmente con el contenido del analito. En particular en esta muestra, el Au se encontraba en sus niveles más bajos (normalmente en el rango entre 50 y 300 ng · g⁻¹, mientras que para el resto de tejidos se encontraba normalmente a niveles de µg · g⁻¹). Por lo tanto, se seleccionó una masa de muestra de alrededor de 3 mg para el análisis de muestras de cerebro con el objetivo de obtener una señal suficiente para garantizar una cuantificación precisa así como para mejorar la fiabilidad de los resultados ya que los problemas derivados de la heterogeneidad de la muestra normalmente se vuelven más serios conforme descienden los niveles de analito. En esta situación de bajos niveles de Au y grandes cantidades de masa de muestra, obviamente la posibilidad de encontrar interferencias aumenta. En particular, para esta muestra, se observó la aparición de un sistema de absorción estructurado, que se superponía de alguna manera con el comienzo de

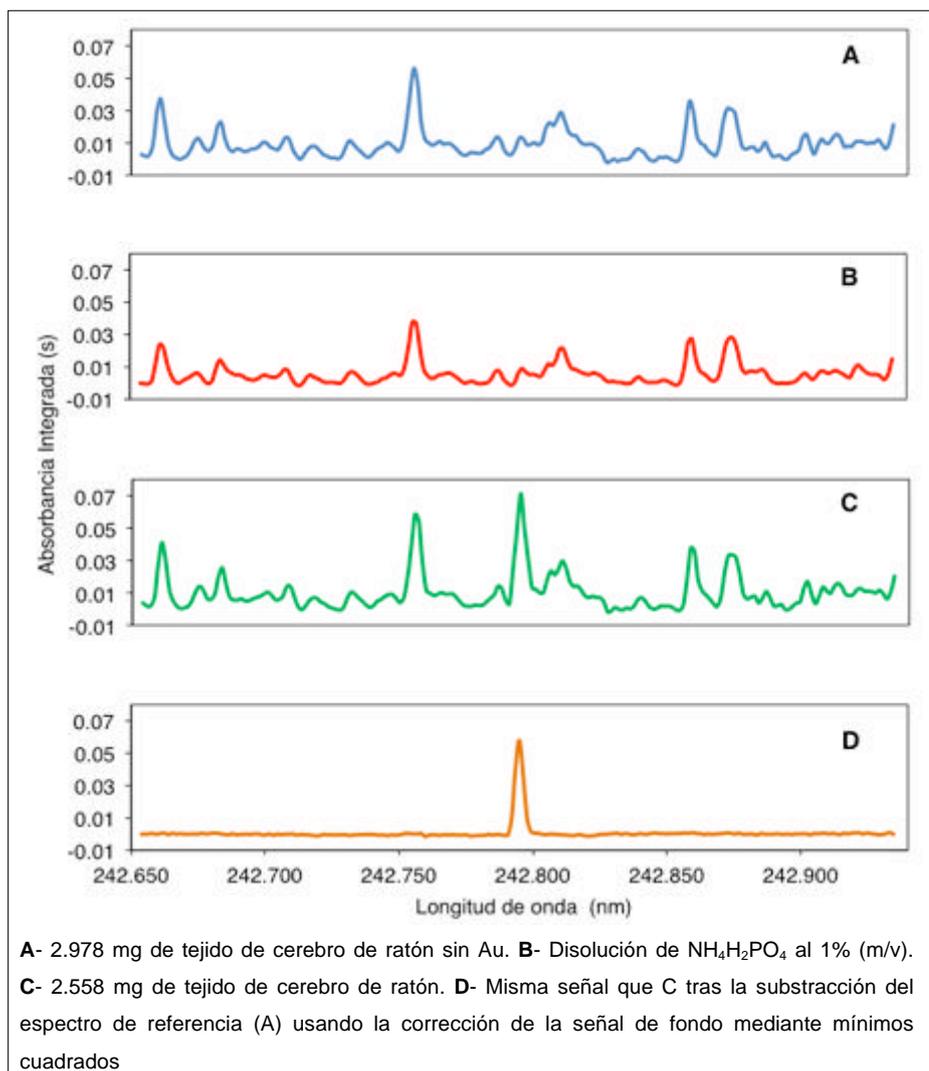
Figura III.8 Comparación de los distintos espectros 3D obtenidos para la atomización del Au



la señal de absorción atómica del Au independientemente del número de píxeles usados para la detección. Aunque la influencia exacta de este solapamiento dependía de la cantidad de Au en cada muestra y de la masa de muestra analizada, su influencia podía ser significativa, alcanzando el 10% de la señal de 200 pg de Au en las condiciones

usadas para el análisis (véase tabla II.10, página 87). Para intentar reducir este solapamiento, se llevó a cabo una modificación del programa de temperatura pero no se consiguió ninguna mejora significativa. Afortunadamente, como se mostró en el apartado I.2.4.3 (página 30), una de las principales ventajas de la HR-CS AAS es que es una técnica mucho más adecuada para superar este tipo de interferencias que la tradicional de LS-AAS al poder medir simultáneamente el entorno de la longitud de onda de interés.

Figura III.9 Espectros obtenidos tras la medida de HR-CS GFAAS



La figura III.9A muestra el espectro de un tejido de cerebro de ratón al que no se le había inoculado AuNPs (lo que supondría un blanco ideal) y la figura III.9B un espectro obtenido tras la vaporización de una solución de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. Como puede observarse, ambos espectros mostraron un excelente grado de similitud, confirmando que la interferencia se produjo por el solapamiento con las “líneas” de absorción molecular del PO (el espectro hiperfino rotacional correspondiente a la transición electrónica de $X^2\pi \rightarrow A^2\Sigma^+ \text{PO}^{38}$). La estructura rotacional de las bandas de absorción del PO normalmente muestra perfiles estrechos con una semianchura en el rango de 5 pm, lo que es comparable con el ancho de las líneas de absorción atómicas, tanto que el uso de estas “líneas” moleculares puede ser la base para la determinación de P mediante HR-CS AAS.^{38,39} La aparición del solapamiento del espectro del PO con la señal de absorción del analito no es raro para el caso de muestras biológicas.⁴⁰ En este caso, se puede usar un algoritmo de mínimos cuadrados que se implementa en el software del instrumento para la corrección de la señal de fondo. Este proceso viene descrito en bibliografía⁴¹ y está basado en los siguientes puntos:

- a) Se mide un espectro de referencia de la interferencia sola (en este caso podía tomarse, bien un espectro con una disolución de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, o bien un espectro de un blanco de la muestra).
- b) La relación entre las intensidades de todas las líneas del PO deberían ser siempre constantes (solo están sujetas a una mínima variación experimental).
- c) De este modo, basándose en las señales obtenidas para las líneas del PO que no se solapan con la línea atómica principal del Au, se puede restar proporcionalmente la porción de la señal de PO que se superpone con la señal de Au atómica para cada muestra.

Las ventajas de esta corrección pueden apreciarse en las figuras III.8F (página 148) y III.9D (página 149). Como puede observarse,

tras la corrección se obtuvo una señal de Au muy bien definida rodeada de un entorno espectral limpio, mostrando una línea base excelente. Puesto que no había material de referencia biológico con un valor de Au certificado a niveles de traza, se realizaron experimentos adicionales para validar este procedimiento. De este modo, los tejidos de cerebro de animales que no se habían expuesto al contacto con Au se doparon con cantidades conocidas de este elemento. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla III.5 (página 152). Como se aprecia en esta tabla, si no se realizaba la corrección, los resultados que se obtenían para muestras con niveles de Au de 200 pg o menores se desviaban significativamente hacia contenidos de Au mayores. Sin embargo, mediante el método de corrección de fondo descrito anteriormente, se obtuvieron resultados precisos para niveles de hasta 20 pg. Los blancos obtenidos tras la corrección de fondo según este procedimiento fueron muy similares a los blancos obtenidos para soluciones de agua Milli-Q (valores de absorbancia integrada menores que 0.001 s), lo que ofreció como resultado un límite de detección de 5 pg. Este valor se traduce en un límite de cuantificación de 16 pg, que para una masa de muestra de 3 mg, supone que se podía cuantificar Au desde niveles desde 5 ng g⁻¹. Así, fue factible cuantificar varias decenas de ng g⁻¹, como requerían los análisis de cerebro, y en particular los de AuNPs funcionalizadas con lactosa.

El resto de las muestras no presentaron problemas significativos. En la figura III.8 (B,C y D), en la página 148, se muestran varios ejemplos de señales. En la mayoría de los casos, los perfiles de la señal mostraron un poco más de cola en comparación con la misma cantidad de Au introducida como disolución (véase figura III.10, página 152), como ocurre normalmente para análisis directo de sólidos en GFAAS de muestras biológicas,³⁹ pero el área integrada de la señal es siempre comparable (si se toman como referencia los valores obtenidos tras digestión de la muestra, como se muestra en el próximo apartado). Así, parece factible realizar los análisis de las muestras usando una calibración simple con patrones acuosos.

Tabla III.5 Resultados de los experimentos de recuperación llevados a cabo dopando muestras de tejido de cerebro sin AuNPs con cantidades conocidas de Au

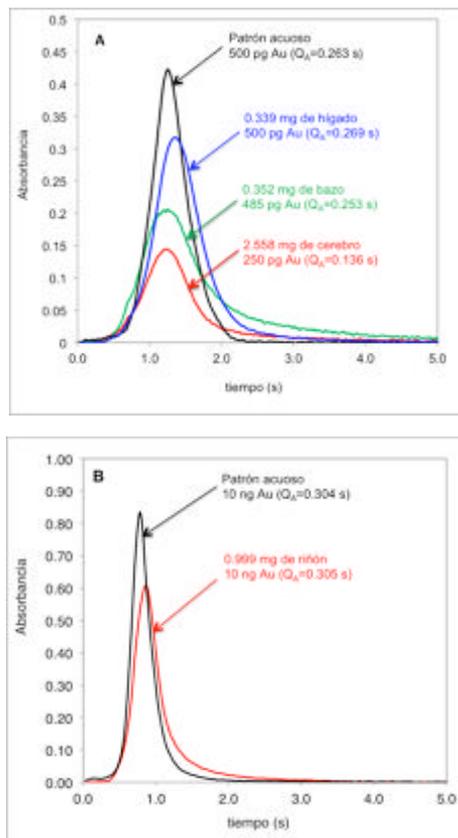
Experimento ^a	Au añadido (pg)	SS-GFAAS sin Corrección Au (pg) ^c	SS HR-CS GFAAS tras corrección ^b Au (pg) ^c
1	20	56.7 ± 14.5	17.7 ± 6.0
2	50	79.8 ± 19.9	50.7 ± 12.0
3	100	148.8 ± 32.5	103.8 ± 15.5
4	200	217.4 ± 13.2	197.4 ± 11.1

^a Cada experimento está formado por un total de 5 réplicas. Se utilizaron las condiciones mostradas en la tabla II.10, página 87.

^b La corrección se ha realizado restando el espectro de PO mediante un algoritmo de mínimos cuadrados, usando el tejido de cerebro de ratón sin AuNPs como espectro de referencia.

^c Las inceridumbres se expresan como el intervalo de confianza al 95%.

Figura III.10 Señal de absorbanza obtenida a 242.795 nm (suma de los 3 píxeles centrales)



III.2.3.4 Resultados del análisis de la muestra

Se llevó a cabo el análisis de muestras obtenidas de diferentes tejidos de ratones a los que previamente se les había inoculado de forma intravenosa AuNPs funcionalizadas con glucosa o lactosa y que posteriormente fueron sacrificados en parejas tras diferentes tiempos de exposición a las AuNPs. Los experimentos con ratones han sido descritos en el apartado II.3.

Todos los órganos se congelaron a -80°C inmediatamente después de su recogida. Así, una vez transportados al laboratorio de análisis, se secaron en un horno a 85°C durante 2 días. Después, los órganos se pesaron. Debido a que estos órganos eran demasiado grandes para una atomización completa (véase apartado II.5.2.3, página 102 para consultar el peso típico de cada órgano), para llevar a cabo el análisis directo de sólidos con GFAAS, se molió antes cada muestra manualmente usando un mortero de agata durante 2-3 min. Este es un procedimiento muy simple y, obviamente, un proceso de molienda más intenso podría haber reducido todavía más el tamaño de partícula y potencialmente podría haber conducido a unos resultados con mayor precisión. Sin embargo, con este procedimiento se obtuvo una precisión suficiente. Además, el procedimiento de molienda tampoco disminuyó significativamente la velocidad de análisis, ya que la muestra siguiente se preparaba mientras la muestra anterior se estaba analizando. El resto del procedimiento se describe en la apartado II.5.4.2 (página 105).

La sensibilidad de la línea atómica principal del Au, 242.795 nm, resultó adecuada para el análisis de la mayoría de las muestras usando una masa de muestra de 0.3 a 1.0 mg y sin caudal de Ar durante la atomización. Las excepciones a este protocolo fueron:

- Las muestras de cerebro de ratón, las que, como ya se ha mencionado anteriormente, requirieron condiciones más sensibles (misma línea atómica, pero una masa de muestra de 3 mg) y el uso de la corrección de fondo mediante un algoritmo de mínimos cuadrados.

- Las muestras de riñón, en el caso de AuNPs funcionalizadas con glucosa, y las muestras de hígado, en el caso de AuNPs funcionalizadas con lactosa. En estos dos órganos es donde el Au se encontraba más concentrado. De este modo, en ellas se seleccionó la línea atómica menos sensible de 267.595 nm con mantenimiento de caudal de Ar durante la atomización. Finalmente, también se analizó la sangre. Esta se diluyó hasta 10 veces como paso previo a su análisis y después se aplicaron también condiciones de máxima sensibilidad.

Tabla III.6 Comparación de los resultados obtenidos con ICP-MS tras digestión de la muestra y mediante SS HR-CS GFAAS

Muestra	Digestión + ICP-MS ^a Au ($\mu\text{g g}^{-1}$)	SS HR-CS GFAAS ^a Au ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Cerebro	0.355 ± 0.039	0.341 ± 0.062
Bazo	1.38 ± 0.10	1.32 ± 0.16
Hígado	1.47 ± 0.09	1.58 ± 0.12
Riñón	9.95 ± 0.45	10.6 ± 0.9
Hígado ^b	31.5 ± 2.0	33.7 ± 3.5

^a Las incertidumbres se expresan como el intervalo de confianza al 95%. Cada experimento consiste de 5 réplicas. Todas las muestras se corresponden con ratones expuestos a AuNP funcionalizadas con glucosa, excepto la última muestra de hígado.

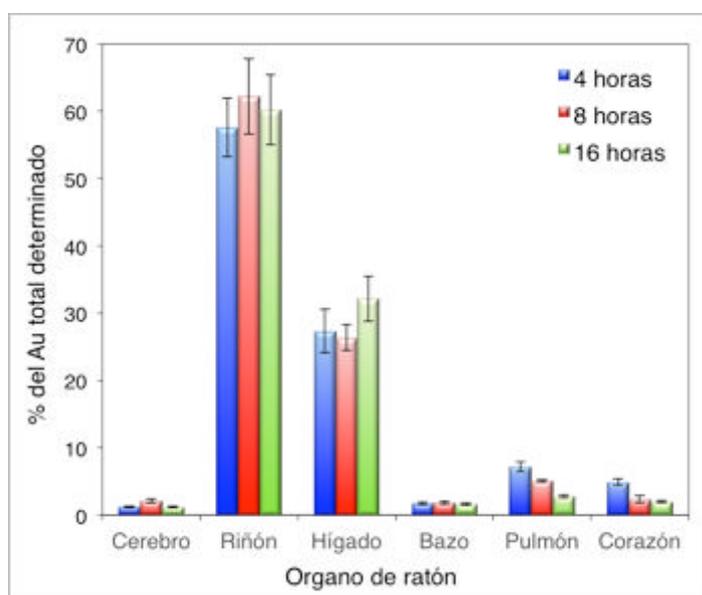
^b Muestra de hígado de ratones expuestos a AuNP funcionalizadas con lactosa.

Los valores de precisión obtenidos para medidas con cinco réplicas de cada muestra se encontraron en el rango de 7 al 14 % de RSD, lo que fue suficiente para el objetivo de este trabajo y que puede considerarse como valores típicos para análisis directo de sólidos con GFAAS.^{42,43} No se pudo realizar la validación de los resultados con materiales de referencia, debido a la ausencia de éstos. Así, y con el objetivo de poder comparar los resultados obtenidos, se digirieron varias muestras según lo descrito en el apartado II.5.1.2 (página 94) y se analizaron mediante espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla III.6

y demostraron que el método propuesto proporcionaba resultados precisos aun siendo un método sencillo (mínima molienda de la muestra, curva de calibración construida con patrones acuosos), pudiendo ser un método muy adecuado en situaciones en las que deben analizarse un número elevado de muestras.

En este trabajo se llevó a cabo el análisis de un gran número de muestras (más de 100). El análisis detallado de los resultados obtenidos en el estudio toxicológico está fuera del ámbito de esta tesis, no obstante se van a comentar brevemente los resultados más notables.

Figura III.11 Distribución del contenido total de Au encontrado en los diferentes órganos. Resultados obtenidos con SS-HR-CS GFAAS



En primer lugar, debe resaltarse que este estudio fue un poco diferente de otros trabajos previos que se habían centrado en los efectos del tamaño de partícula.^{11,12} En este caso, se decidió usar un tamaño de partícula muy pequeño y extraer información de la evolución temporal de los niveles de Au, ya que los ratones fueron sacrificados a distintos tiempos, en la línea de los trabajos de WANG *et al.*¹³ y FENT *et al.*¹⁴ También se evaluó en este trabajo la influencia de

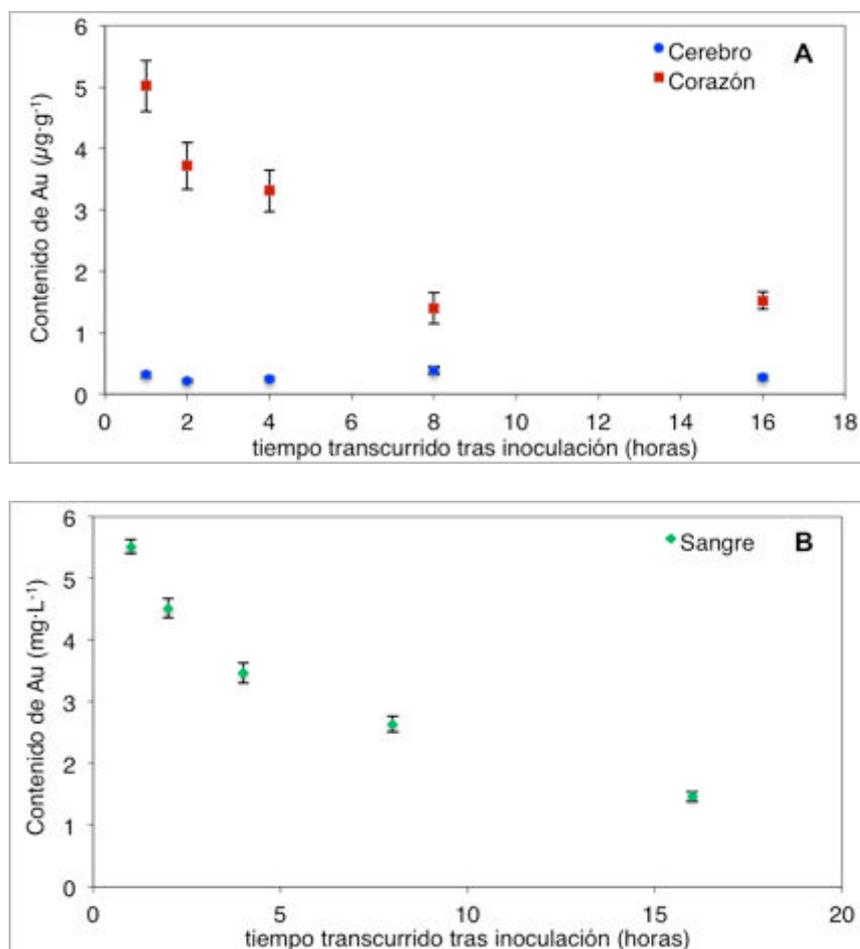
los dos compuestos con los que se habían funcionalizado las AuNPs (glucosa y lactosa).¹⁴

Teniendo en cuenta esto, la primera conclusión que pudo extraerse de este trabajo fue que se encontró presencia de Au en todos los órganos estudiados. Un ejemplo de esta distribución se muestra en la figura III.11. Esto confirma resultados previos que indican que si el tamaño de partícula es suficientemente pequeño (por debajo o igual que 10-15 nm), la distribución del Au se encuentra más extendida.^{11,12} En este caso, se usaron AuNPs de aproximadamente 2 nm. Es particularmente interesante confirmar que se encontraron AuNPs en las muestras de cerebro en todos los casos, incluso aunque los niveles de Au obtenidos fueron siempre los menores (100-300 ng g⁻¹ para las nanopartículas con glucosa y 50-100 ng g⁻¹ para las nanopartículas con lactosa, dependiendo del tiempo de exposición). Obviamente, el cerebro es un objetivo muy importante para estudios médicos y el desarrollo de AuNPs que puedan introducirse en el cerebro es una prioridad actual en la investigación.

Una de las limitaciones que se reflejaban en estudios previos era la controversia existente sobre si las nanopartículas son capaces realmente de cruzar la barrera sangre-cerebro y si se introducen en el tejido neuronal o por el contrario permanecen en los capilares sin penetrar en este tejido realmente.^{11,12} Aunque se extrajo la sangre de todos los animales intentando así minimizar la cantidad de sangre residual presente en los órganos, es difícil saber si esta estrategia fue totalmente satisfactoria. Sin embargo, cuando comparamos la evolución temporal del contenido de Au en sangre y en cerebro (véase figura III.12, página 157), se observa que ambos comportamientos son completamente diferentes, mientras que si las nanopartículas solo se encontraran en el torrente sanguíneo neuronal, debería encontrarse el mismo comportamiento en ambas muestras (como parece ocurrir en las muestras de corazón). Así, los resultados parecieron indicar que las AuNPs se introdujeron en realidad en el tejido neuronal (de la misma forma que ocurre en el resto de órganos excepto para el corazón). Por supuesto, esto no indica si se están introduciendo en el

tejido como AuNPs o se han transformado en el proceso y se han oxidado a un estado iónico.

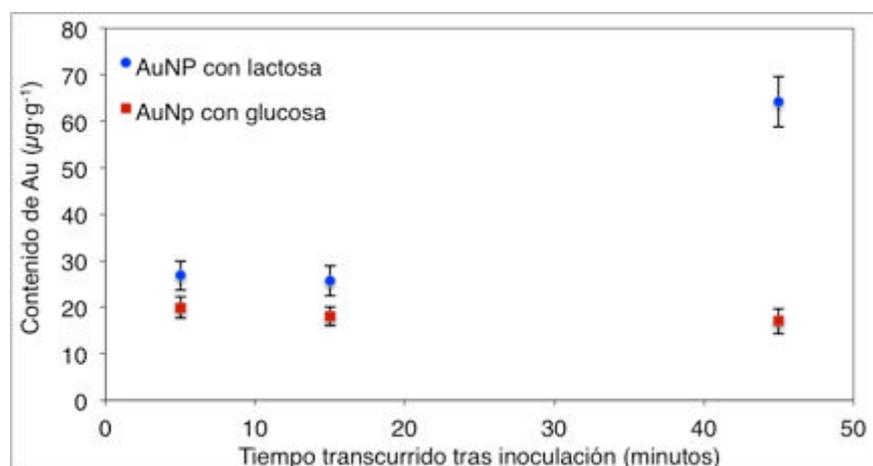
Figura III.12 Evolución de la concentración de Au encontrada en muestras de cerebro y corazón (A) y sangre (B)



La segunda conclusión importante fue que la funcionalización de AuNPs podía influir en gran medida sobre su distribución. Por ejemplo, la intención de funcionalizar las nanopartículas con lactosa era dirigirlas hacia el hígado, que es el otro órgano de gran importancia en la investigación médica. Además, ya se ha mostrado que las AuNPs cubiertas con lactosa se habían usado con éxito para reducir la progresión de la metástasis experimental.⁶ Los resultados confirmaron que las AuNPs funcionalizadas con lactosa tendieron a concentrarse más en el hígado en comparación con las funcionalizadas

con glucosa (como se muestra en la figura III.13 en la página 158). En realidad, más del 99% de la cantidad total de Au determinada se encontró en el hígado tras 45 min de exposición. En el resto de órganos también se encontró Au, pero a niveles de solo 0.3 a 0.8 $\mu\text{g g}^{-1}$ (en el cerebro en niveles menores, como ya se ha mencionado anteriormente). El Au presente en la sangre también disminuía en un factor de 100 cuando se comparaba la funcionalización de glucosa y lactosa, indicando que ésta última era mucho mas eficiente para que el organismo en general, y en el hígado en particular, absorbiera las AuNPs.

Figura III.13 Comparación de la concentración de Au encontrada en muestras de hígado de ratones a los que se les inyectó AuNPs funcionalizadas con glucosa o con lactosa.



III.2.4 Conclusiones

El uso del análisis directo de sólidos mediante HR-CS GFAAS hizo que fuera factible la determinación de Au en tejidos de órganos de ratón inoculados con AuNPs de un modo sencillo y directo, llevándose a cabo la calibración con patrones acuosos. El potencial de la técnica para la corrección de solapamientos espectrales con las líneas moleculares de PO fue crucial para asegurar límites de detección a niveles de pg, permitiendo una cuantificación precisa de Au en tejidos desde unos niveles de apenas varias decenas de ng g^{-1} de Au.

Acerca del uso de AuNPs, se pudieron obtener las siguientes conclusiones:

- a) Usando un pequeño tamaño de partícula (por debajo de 2 nm), parece que las AuNPs son capaces de cruzar la barrera de la sangre y penetrar dentro de los tejidos de la mayoría de órganos, incluido el cerebro.
- b) La funcionalización significativa a su comportamiento. En particular el uso de nanopartículas funcionalizadas con lactosa es eficaz cuando el hígado es el órgano objetivo.

Estos resultados demostraron que la técnica de análisis SS HR-CS GFAAS es muy adecuada para investigaciones futuras sobre la distribución de AuNP, o de otros tipos de nanopartículas metálicas en tejidos biológicos.

III.2.5 Bibliografía

1. Y. Ju-Nam, J. R. Lead, *Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications*, Science of the Total Environment, 2008, 400, 396-414.
2. W. Cai, T. Gao, H. Hong, J. Sun, *Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology*, Nanotechnology, Science and Applications, 2008, 1, 17-32.
3. P. C. Chen, S. C. Mwakwari, A. K. Oyelere, *Gold nanoparticles: From nanomedicine to nanosensing*, Nanotechnology, Science and Applications, 2008, 1, 45-66.
4. R. Bhattacharya, P. Mukherjee, *Biological properties of "naked" metal nanoparticles*, Advanced Drug Delivery Reviews, 2008, 60, 1289-1306.
5. W. E. Bawarski, E. Chidlowsky, D. J. Bharali, S. A. Mousa, *Emerging nanopharmaceuticals*, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2008, 4, 273-282.

6. J. Rojo, V. Diaz, J. M. de la Fuente, I. Segura, A. G. Barrientos, H. H. Riese, A. Bernad, S. Penadés, *Gold Glyconanoparticles as New Tools in Antiadhesive Therapy*, ChemBioChem., 2004, 5, 291-297.
7. Revista del espacio europeo de investigación. Las nanometamorfosis del Au. Disponible en: http://ec.europa.eu/research/researcheu/52/article_5232_es.html. Accedida por última vez en Junio, 2013.
8. K. L. Aillon, Y. Xie, N. El-Gendy, C. J. Berkland, M. L. Forrest, *Effects of nanomaterial physicochemical properties on in vivo toxicity*, Advanced Drug Delivery Reviews, 2009, 61, 457-466.
9. M. R. Winchester, R. E. Sturgeon, J. M. Costa-Fernández, *Editorial: Chemical characterization of engineered nanoparticles*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010, 396, 951-952.
10. B. Fernández, J. M. Costa, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, *Inorganic mass spectrometry as a tool for characterisation at the nanoscale*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010, 396, 15-29.
11. W. H. De Jong, W. I. Hagens, P. Krystek, M. C. Burger, A. J. A. M. Sips, R. E. Geertsma, *Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration*, Biomaterials, 2008, 29, 1912-1919.
12. G. Sonavane, K. Tomoda, K. Makino, *Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: Effect of particle size*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2008, 66, 274-280.
13. L. Wang, Y. Li, L. Zhou, Y. Liu, L. Meng, K. Zhang, X. Wu, L. Zhang, B. Li, C. Chen, *Characterization of gold nanorods in vivo by integrated analytical techniques: Their uptake, retention, and chemical forms*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010, 396, 1105-1114.
14. G. M. Fent, S. W. Casteel, D. Y. Kim, R. Kannan, K. Katti, N. Chanda, K. Katti, *Biodistribution of maltose and gum arabic hybrid gold*

- nanoparticles after intravenous injection in juvenile swine*, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2009, 5, 128-135.
15. J. Medved, M. Bujdos, P. Matus, J. Kubova, *Determination of trace amounts of gold in acid-attacked environmental samples by atomic absorption spectrometry with electrothermal atomization after preconcentration*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2004, 379, 60-65.
 16. P. Liang, E. Zhao, Q. Ding, D. Du, *Multivalled carbon nanotubes microcolumn preconcentration and determination of gold in geological and water samples by flame atomic absorption spectrometry*, *Spectrochimica Acta Part B*, 2008, 63, 714-717.
 17. M. Konecna, J. Komàrek, *Utilization of electrodeposition for electrothermal atomic absorption spectrometry determination of gold*, *Spectrochimica Acta Part B*, 2007, 62, 283-287.
 18. M. Shamsipur, M. Ramezani, *Selective determination of ultra trace amounts of gold by graphite furnace atomic absorption spectrometry after dispersive liquid-liquid microextraction*, *Talanta*, 2008, 75, 294-300.
 19. L. A. Simpson, M. Thomsen, B. J. Alloway, A. Parker, *A dynamic reaction cell (DRC) solution to oxide-based interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) analysis of the noble metals*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2001, 16, 1375-1380.
 20. R. R. Barefoot, *Determination of platinum group elements and gold in geological materials: A review of recent magnetic sector and laser ablation applications*, *Analytica Chimica Acta*, 2004, 509, 119-125.
 21. R. R. Barefoot, J. C. Van Loon, *Recent advances in the determination of the platinum group elements and gold*, *Talanta*, 1999, 49, 1-14.
 22. I. Ott, H. Scheffler, R. Gust, *Development of a method for the quantification of the molar gold concentration in tumour cells exposed to gold-containing drugs*, *ChemMedChem* 2, 2007, 2, 702-707.
 23. M. Resano, E. García-Ruiz, M. A. Belarra, F. Vanhaecke, K. S.

- McIntosh, *Solid sampling in the determination of precious metals at ultratrace levels*, TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 2007, 26, 385-395.
24. J. Briceño, M. A. Belarra, K. A. C. De Schamphelaere, S. Vanblaere, C. R. Janssen, F. Vanhaecke, M. Resano, *Direct determination of Zn in individual Daphnia magna specimens by means of solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2010, 25, 503-510.
25. B. Welz, M. G. R. Vale, D. L. G. Borges, U. Heitmann, *Progress in direct solid sampling analysis using line source and high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007, 389, 2085-2095.
26. B. Welz, D. L. G. Borges, F. G. Lepri, M. G. R. Vale, U. Heitmann, *High-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry - An analytical and diagnostic tool for trace analysis*, Spectrochimica Acta Part B, 2007, 62, 873-883.
27. J. Alvarado, A. Petrola, *Determination of cadmium, chromium, lead, silver and gold in Venezuelan red mud by atomic absorption spectrometry*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry., 1989, 4, 411- 414.
28. M.W. Hinds, *Determination of gold, palladium and platinum in high purity silver by different solid sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry methods*, Spectrochimica Acta Part B, 1993, 48, 435-445.
29. M. Resano, M. Aramendía, E. Garcia-Ruiz, M. A. Belarra, *Solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry for the direct determination of Au in samples of various natures*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2005, 20, 479-481.
30. M. Resano, M. Aramendía, E. García-Ruiz, C. Crespo, M. A. Belarra, *Solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry for*

- the direct determination of silver at trace and ultratrace levels*, *Analytica Chimica Acta*, 2006, 571, 142-149.
31. S. Imai, K. Okuhara, T. Tanaka, Y. Hayashi, *Electrothermal graphite furnace atomic absorption signal for gold in organic matrices*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1995, 10, 37-41.
 32. N. S. Thomaidis, E. A. Piperaki, C. E. Efstathiou, *Comparison of chemical modifiers for the determination of gold in biological fluids by electrothermal atomic absorption spectrometry*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1995, 10, 221-226.
 33. K. Ohta, T. Isiyama, M. Yokoyama, T. Mizuno, *Determination of gold in biological materials by electrothermal atomic absorption spectrometry with a molybdenum tube atomizer*, *Talanta*, 1995, 42, 263-267.
 34. U. Heitmann, B. Welz, D.L.G. Borges, F.G. Lepri, *Feasibility of peak volume, side pixel and multiple peak registration in high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry*, *Spectrochimica Acta Part B*, 2007, 62, 1222-1230.
 35. M. Resano, J. Briceño, M. A. Belarra, *Direct determination of Hg in polymers by solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry. A comparison of the performance of line source and continuum source instrumentation*, *Spectrochimica Acta Part B*, 2009, 64, 520-529.
 36. B. Welz, *High-resolution continuum source AAS: The better way to perform atomic absorption spectrometry*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2005, 381, 69-71.
 37. M. J. Cal-Prieto, M. Felipe-Sotelo, A. Carlosena, J. M. Andrade, P. Lopez-Mahia, S. Muniategui, D. Prada, *Slurry sampling for direct analysis of solid materials by electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS). A literature review from 1990 to 2000*, *Talanta*, 2002, 56, 1-51.
 38. M. D. Huang, H. Becker-Ross, S. Florek, U. Heitmann, M. Okruss, *Determination of phosphorus by molecular absorption of*

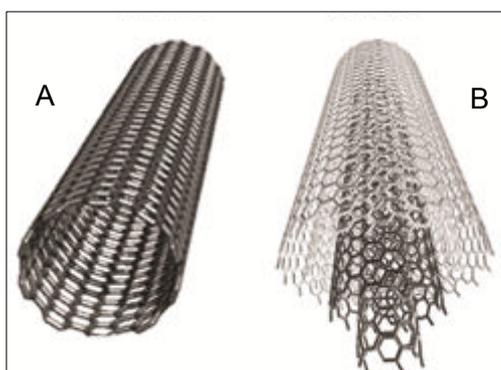
- phosphorus monoxide using a high-resolution continuum source absorption spectrometer and an air-acetylene flame*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2006, 21, 338-345.
39. M. Resano, J. Briceño, M. Belarra, *Direct determination of phosphorus in biological samples using a solid sampling-high resolution-continuum source electrothermal spectrometer: Comparison of atomic and molecular absorption spectrometry*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2009, 24, 1343-1354.
40. D.L.G. Borges, A.F. da Silva, B. Welz, A.J. Curtius, U. Heitmann, *Determination of lead in biological samples by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry with direct solid sampling*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2006, 21, 763-769.
41. H. Becker-Ross, S. Florek, U. Heitmann, *Observation, identification and correction of structured molecular background by means of continuum source AAS-determination of selenium and arsenic in human urine*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2000, 15, 137-141.
42. M. Resano, F. Vanhaecke, M.T.C. de Loos-Vollebregt, *Electrothermal vaporization for sample introduction in atomic absorption, atomic emission and plasma mass spectrometry - A critical review with focus on solid sampling and slurry analysis*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2008, 23, 1450-1475.
43. M. A. Belarra, M. Resano, F. Vanhaecke, L. Moens, *Direct solid sampling with electrothermal vaporization/atomization: What for and how?*, TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 2002, 21, 828-839.

III.3 DETERMINACIÓN DIRECTA DE Co, Fe, Ni, Pb, Cr y Al EN NANOTUBOS DE CARBONO

III.3.1 Introducción

Un nanotubo de carbono (CNT) es una forma alotrópica del carbono caracterizado por una estructura tubular con un diámetro en el rango de los nanómetros. Su estructura puede asemejarse a una lámina de grafito enrollada sobre sí misma con una forma cilíndrica. Cuando se trata de una única lámina (Figura III.14A), los nanotubos reciben el nombre de *single-walled carbon nanotubes* (SWCNT) mientras que el enrollamiento concéntrico de varias láminas (Figura III.14B), da lugar a la formación de los *multi-walled carbon nanotubes* (MWCNT).¹

Figura III.14 Esquema de un SWCNT y un MWCNT²



Esta configuración proporciona a los CNTs propiedades únicas dependiendo del ángulo de enrollamiento y del radio, tales como elevada conductividad térmica y eléctrica, resistencia y dureza. Estas propiedades han impulsado el uso de CNTs en multitud de áreas diversas, tales como la producción de fibras y telas, de materiales compuestos, de adhesivos, de recubrimientos, de cerámicas, de circuitos eléctricos, de baterías solares o el almacenamiento de hidrógeno. Desde su descubrimiento por IJIMA en 1993,¹ una amplia bibliografía hace referencia a la multitud de aplicaciones diversas de los nanotubos de carbono.³

También son reseñables sus aplicaciones en el campo biomédico. Por ejemplo, los CNTs se han utilizado como portadores para la administración de fármacos o como agentes de imagen, entre otros usos.⁴ Sin embargo, como ocurre con prácticamente todos los nanomateriales sintéticos, las mismas propiedades que hacen que su futuro sea muy prometedor (por ejemplo, su capacidad para introducirse en las células debido a su diminuto tamaño), son también la razón por la que se consideran potencialmente tóxicos.⁵ En este sentido, una reciente revisión subraya el hecho de que, aunque el número de estudios dedicados a la producción de nuevas formas de CNTs confeccionadas a medida para múltiples aplicaciones diferentes se ha incrementado exponencialmente durante los últimos años, el número de estudios que versan sobre sus efectos en la salud son todavía muy escasos.⁶

Puede resaltarse que, al contrario de lo que sucede con otros tipos de nanomateriales, es muy complicado obtener CNTs con un alto grado de pureza. Esto sucede simplemente porque la estructura de los CNTs es muy adecuada para que en ella queden atrapadas impurezas metálicas. Aunque esta característica tan interesante hace que los CNTs se usen en etapas de preconcentración en química analítica,^{7,8} una cantidad apreciable de los catalizadores usados en la fabricación de CNTs también permanecen atrapados en grandes cantidades en la misma estructura de los CNTs (hasta un 20-30% antes de la purificación)^{6,9,10} y no resulta sencillo llevar a cabo una purificación de estos materiales sin romper su estructura.¹¹ Como resultado, los CNTs exhiben niveles de impurezas metálicas a niveles de porcentaje,^{9,10,11} incluso tras su purificación. Esto básicamente significa que, además del estudio de los posibles efectos de la longitud o el diámetro de los nanotubos o la posible presencia de defectos estructurales, la composición química es también un parámetro crítico a considerar cuando se investiga el efecto nocivo de los CNTs.^{4,6,12} Además, es preciso señalar que, aunque estos elementos se encuentran embebidos en la estructura de los CNTs, existen evidencias que muestran su disponibilidad a nivel biológico,

especialmente cuando se dispersan los CNTs mediante ultrasonidos en un solvente, lo que se realiza a menudo en muchas aplicaciones.¹⁰

Debe resaltarse que esos elementos, que normalmente están atrapados en grandes cantidades en las estructuras de los nanotubos, son potencialmente peligrosos. La mayoría de los CNTs se fabrican mediante procesos de vaporización a alta temperatura (que emplean láser, descarga de arco o plasma) o mediante deposición catalítica en fase vapor (con catalizador flotante o soportado). Estos métodos tienen en común que usan como catalizadores metales de transición 3d.¹³ En particular, los metales que aparecen más frecuentemente en bibliografía para este uso son Co, Fe y Ni.^{9,11,13-15} Está demostrado que los materiales que contienen partículas finas de Ni pueden ser cancerígenos,¹¹ pero en realidad todos estos elementos pueden transmitir toxicidad a los organismos vivos mediante su participación en reacciones químicas redox de biomarcadores y de compuestos intermedios metabólicos.^{6,10,16} Su presencia afecta también a las propiedades físico-químicas de los CNTs, tanto que debería controlarse su concentración incluso aunque no se utilicen como aplicaciones médicas.^{17,18} Por tanto, hay una necesidad manifiesta de desarrollar métodos analíticos que puedan proporcionar resultados fiables de las impurezas presentes en los CNTs, tanto en los recién fabricados como en los ya purificados.

Desgraciadamente, ésta no es una tarea fácil. La disolución de este tipo de material dista mucho de ser sencilla incluso con cantidades muy pequeñas de masa (decenas de mg) y normalmente da como resultado disoluciones con un elevado contenido en carbono¹⁵ y/o un elevado contenido en ácido,¹⁹ lo que se traduce en unos efectos de matriz significativos cuando se usan técnicas basadas en la disolución tal como la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).¹⁵ Por lo tanto, no es sorprendente que algunas técnicas basadas en el análisis directo de sólidos como es el análisis por activación neutrónica (NAA) se emplee habitualmente y pueda considerarse incluso como la técnica de referencia.¹⁹⁻²¹ Sin embargo, la NAA requiere de un reactor nuclear y por lo tanto se trata

de una técnica difícilmente accesible para laboratorios industriales o de control rutinario.

En este contexto podría resultar muy beneficioso el uso de técnicas alternativas de análisis de sólidos directos que proporcionen resultados precisos rápidamente con un método de calibración sencillo. El análisis directo de muestras sólidas mediante espectrometría de absorción atómica (SS-GFAAS) ya ha demostrado características prometedoras en este sentido.²² Existen algunos estudios previos con análisis de materiales similares (por ejemplo grafito²³ o carbón²⁴). Un estudio reciente de MELLO *et al.* mostró que esta técnica es adecuada para análisis directo de materiales SWCNT y MWCNT,²⁵ a pesar de la desventaja que supone la limitación de ser una técnica monoelemental.

Durante los últimos años, el potencial de SS-GFAAS ha sido mejorado con la nueva instrumentación de GFAAS con fuente continua de alta resolución (HR-CS GFAAS). Esta técnica ofrece ventajas significativas en comparación con la tradicional espectrometría de absorción atómica con fuente de línea,^{26,27} tal como el potencial para desarrollar métodos de análisis multielementales²⁸ o ampliar el rango lineal a conveniencia.^{29,30}

Este trabajo se llevó a cabo con el objetivo de evaluar el potencial de la HR-CS GFAAS para la determinación directa de Co, Fe, Ni, Pb, Cr y Al en CNTs. Se seleccionaron estos elementos porque son los que mayor interés tienen en toxicología y se encuentran normalmente en los CNTs, aunque se espera que estén presentes a diferentes niveles de concentración (los CNTs normalmente presentan contenidos de Co, Fe y/o Ni a nivel de mg g⁻¹, mientras que el Pb, Cr y Al se encuentran a nivel de µg g⁻¹).

III.3.2 Objetivo del trabajo

El objetivo de del trabajo desarrollado en esta sección III.3 fue desarrollar métodos rápidos para la determinación simultánea de

varios analitos utilizando una calibración sencilla con patrones acuosos.

Para este trabajo se estudió un material candidato a ser material de referencia producido por el *National Research Council of Canada* (NRC) junto con otros CNTs disponibles comercialmente (véase tabla II.2, página 78).

III.3.3 Desarrollo del método

III.3.3.1 Selección de la longitud de onda

Como se ha mencionado en el apartado anterior, el objetivo de este trabajo fue desarrollar métodos analíticos que permitan la determinación simultánea de varios analitos. Como analitos de interés, se seleccionaron varios metales bien porque se quedan como impurezas en los nanotubos procedentes de su proceso de fabricación (Co, Fe y Ni suelen usarse como catalizador y Al se suele usar como soporte del catalizador en forma de AlO_2), o bien por su relevancia toxicológica (Pb y Cr). Dentro de estos elementos, un aspecto importante a la hora de desarrollar el método es que no todos aparecían en los mismos niveles de concentración. Algunos de ellos se presentaban en niveles de mg g^{-1} (Co, Fe y Ni) y el resto solían aparecer en concentraciones menores ($\mu\text{g g}^{-1}$).

Para conseguir una determinación multielemental, la selección del intervalo espectral donde medir es crítica. Mientras que el uso de la fuente continua en AAS abre la posibilidad a las determinaciones multielementales simultáneas, el potencial de la instrumentación disponible actualmente es bastante limitado en este sentido.^{27,28} En bibliografía se encontraron pocas determinaciones multielementales y normalmente solo se realizaban 2 elementos al mismo tiempo (por ejemplo Cr y Fe,³¹ Co y V³² ambos en petróleo sin refinar, o Cd y Fe en diferentes tipos de muestras³³⁻³⁵). Hasta el momento de la realización de este trabajo, no se tenía constancia de trabajos previos que incluyeran la determinación simultánea de 4 elementos. La razón es que esta instrumentación incluye un detector que comprende 588

píxeles, de los cuales solo 200 se usan para propósitos analíticos mientras que el resto se usan para correcciones internas. Una de las principales características de este instrumento es su excelente resolución, puesto que cada píxel monitoriza un rango de solo 1 a 2 pm (el valor exacto depende de la longitud de onda: cuanto menor es la longitud de onda, mayor es la resolución). Sin embargo, esto significa que solo se puede obtener una monitorización simultánea de una pequeña porción del espectro: de 0.2 a 0.3 nm en la región del UV, donde se encuentran la mayoría de líneas atómicas útiles, incrementándose a 1.0 nm en la región más lejana del visible (800 nm).

Por lo tanto, es necesario encontrar una región espectral donde las líneas atómicas presenten una sensibilidad adecuada de los analitos de interés y además, se encuentren cercanas, lo que no siempre es posible.

De los analitos de interés, Co, Fe y Ni presentan cientos de líneas atómicas útiles analíticamente en la región del UV-Vis,²⁶ y muchas de ellas se encuentran cercanas unas a otras. Además, debido a que se esperan altos contenidos en la muestra, es preferible el uso de líneas menos sensibles. Por lo tanto, en este sentido es mejor centrarse en el Pb, para el que no hay tantas líneas disponibles y es necesario seleccionar la línea más sensible para que sea capaz de detectar concentraciones de $\mu\text{g g}^{-1}$.

Las dos líneas más sensibles del Pb son 217.001 nm y 283.306 nm. El uso de otras líneas conllevaría la pérdida de sensibilidad de unas 20 veces.³⁶ Como consecuencia de esto, para este estudio solo se consideraron estas dos líneas. De ellas, tradicionalmente no se recomienda el uso de 217.001 nm con una fuente de línea debido a su limitada linealidad y a la pobre relación señal/ruido. En principio, esta situación mejora cuando se usa la HR-CS AAS debido a la elevada intensidad de radiación de la lámpara de xenón.³⁷ Sin embargo, la intensidad de esta lámpara también disminuye cuando se acerca a los 200 nm (se obtiene aproximadamente una energía un 30% menor a 217.001 nm en comparación con 283.306 nm). Adicionalmente, en

esta zona la posibilidad de solapamientos espectrales de bandas de PO aumenta, aunque esto último no debería suponer un problema para el análisis de CNTs. Como consecuencia de todo ello, el uso de la línea 283.306 nm (menos sensible en aproximadamente un factor de 2) proporciona una relación señal/ruido superior, lo que da como resultado un límite de detección menor (22 pg a 283.306 nm frente a los 50 pg a 217.001 nm, usando las condiciones de la tabla II.11, página 88).

Sin embargo, hay una razón todavía más importante para seleccionar la región espectral en el entorno de la línea del Pb de 283.306 nm y es la posibilidad de determinar simultáneamente el Co (2 líneas), Fe y Ni, como se evidencia en la figura III.15 (página 172). En esta figura se representa la atomización simultánea a partir de disolución patrón de 1 ng de Pb, 1 µg de Fe, 5 µg de Ni y 5 µg de Co. En ella, se muestra la señal registrada por cada píxel del detector (cada punto azul).

Estas líneas secundarias poseen una sensibilidad que debería ser apropiada para las concentraciones esperadas de los analitos en las muestras de CNT y todos ellos pueden monitorizarse simultáneamente si se seleccionan correctamente las condiciones del detector. Esto requiere que el detector no se centre en ninguna línea en particular, sino que esté centrado en 283.325 nm lo que permite la monitorización de todas las líneas con suficiente línea base a ambos lados, lo que es imprescindible para conseguir una buena estabilidad de la señal. Si el detector se centrara en la línea del Pb, la línea del Ni no se definiría apropiadamente. La tabla III.7 (página 175) presenta las longitudes de onda exactas para estas líneas, los píxeles del detector que las cubren y su sensibilidad relativa (cuando se compara con la línea más sensible para cada analito). Otra ventaja distintiva de la HR-CS AAS es que la intensidad de fuente para todas estas líneas es aproximadamente la misma, al contrario que lo que ocurre con la fuente de línea que proporciona menos intensidad para las líneas secundarias, como comenta WELTZ *et al.*²⁶ Esto normalmente da

como resultado una relación señal/ruido mejor y, como consecuencia, mejores LODs.

Figura III.15 Espectro de absorbanza integrada en el tiempo frente a la longitud de onda en el entorno de 283.306 nm

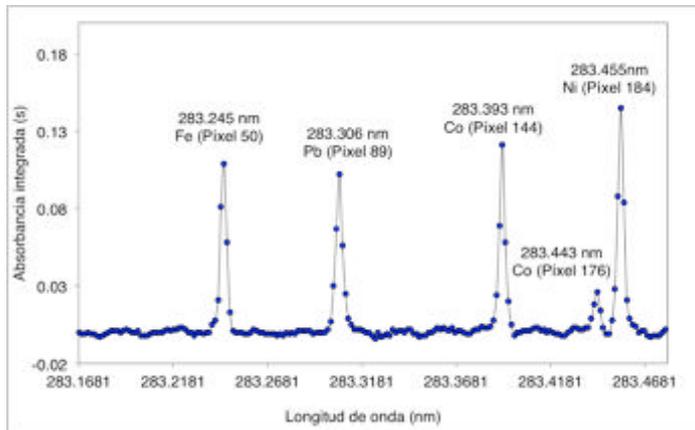
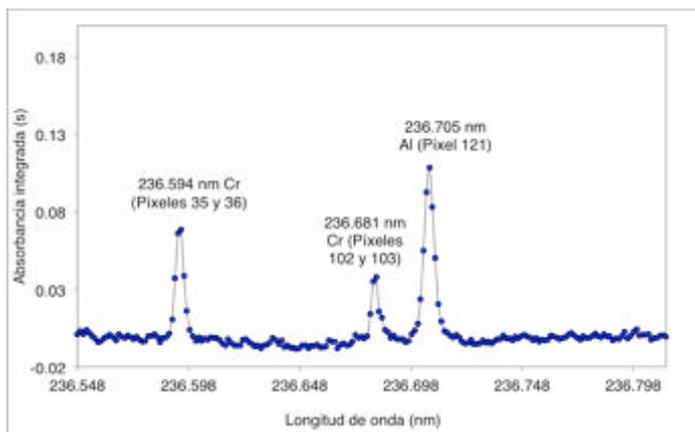


Figura III.16 Espectro de absorbanza integrada en el tiempo frente a la longitud de onda en el entorno de 236.681 nm



Una vez seleccionada una zona de longitud de onda donde es posible realizar la determinación simultánea de Co Fe, Ni y Pb, se investigó la posibilidad de determinar simultáneamente el Cr y el Al. Esto no parecía muy difícil ya que ambos elementos presentan numerosas líneas de absorción. Se trataba, por tanto, de encontrar una zona donde los dos elementos apareciesen en dos líneas cercanas y con una sensibilidad adecuada. Esto se consiguió en el entorno de la

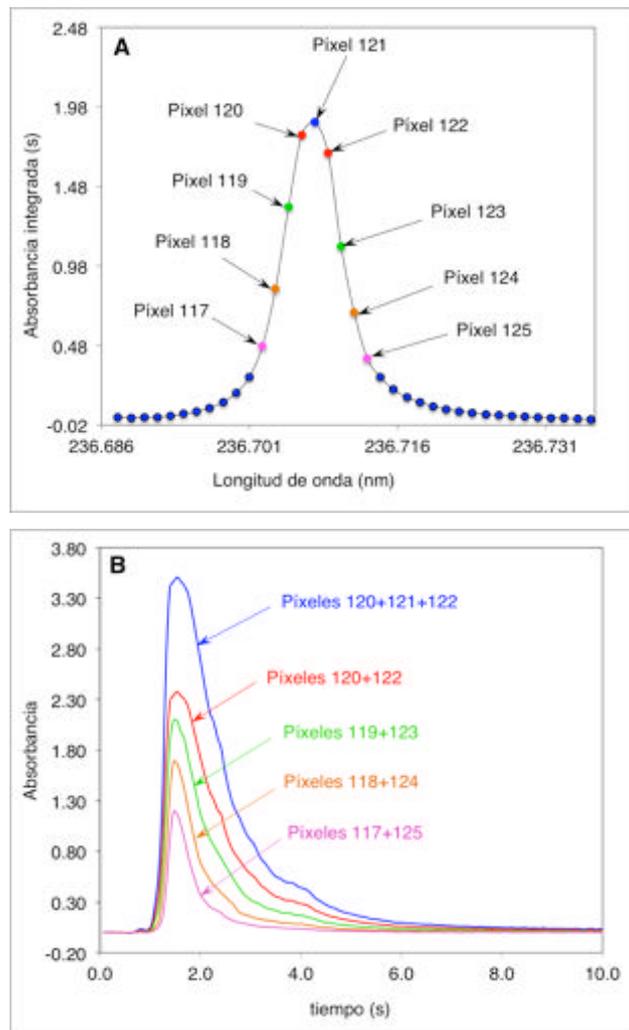
línea 236.681 nm dónde aparecen dos líneas del Cr y una del Al como se evidencia en la figura III.16 (página 172). En esta figura se representa la atomización simultánea a partir de disolución patrón de 15 ng de Cr y 5 ng de Al. Se muestra la señal registrada por cada píxel del detector (cada punto azul). Para el Cr se trabajó con las dos líneas presentes en este rango espectral (véase valores obtenidos en tabla III.7, página 175).

Un aspecto crítico adicional del desarrollo de un método de análisis directo en sólidos es la magnitud de los rangos lineales de las líneas seleccionadas, ya que no se puede diluir las muestras fácilmente cuando la respuesta se encuentra fuera del rango lineal. Este es un problema característico de la SS-GFAAS, pero que se agrava más cuando se intentan establecer condiciones para determinaciones multielementales simultáneas. Cualquier intento de modificar las condiciones de trabajo (por ejemplo cambiando la masa de muestra o el caudal de argón durante la atomización, etc.) para ajustar la señal de un elemento en particular dentro del rango lineal puede tener efectos perjudiciales sobre el resto de elementos. Por ejemplo, si la señal de Pb es demasiado baja para una muestra en particular, el incremento de la masa de muestra puede solucionar el problema, pero entonces la respuesta del resto de elementos que se miden junto con el Pb (Co, Ni y Fe) se verá también incrementada, y puede quedar fuera del rango lineal.

Afortunadamente, el uso de la AAS con fuente continua de alta resolución proporciona una ventaja en este sentido, al posibilitar la expansión del rango lineal de forma sencilla mediante la selección de los píxeles del detector adecuados en las alas de la perfil de absorbancia.^{29,30,38,39} De hecho, conforme se introduzcan en el atomizador cantidades mayores de analito, en algún momento la señal en el centro de la línea de absorción crecerá más lentamente, perdiendo la respuesta lineal y al final saturándose. Sin embargo, conforme la masa del analito aumenta, el perfil de la línea de absorción también se vuelve más ancho, tanto que el uso de los píxeles laterales se vuelve útil para permitir el incremento en el rango

de trabajo. Esta estrategia es simple de aplicar, puesto que la información de todos los píxeles del detector se encuentra disponibles (véase figuras III.15 y III.16, página 172). El técnico analista puede decidir cuales son los más apropiados, incluso tras el análisis, sin necesidad de llevar a cabo nuevas medidas. En la figura III.17 se muestra un ejemplo de las señales que se obtendrían para una disolución patrón de 130 ng de Al en función de los píxeles de detección utilizados.

Figura III.17 Señal de absorbancia integrada (A) y de absorbancia frente a tiempo (B) en función de los píxeles del detector seleccionados en la medida de Al en el entorno de la línea de 236.705 nm



La tabla III.7 resume algunas características analíticas relevantes de las líneas de los analitos cuando se usan diferentes combinaciones de los píxeles de detección. La sensibilidad óptima y los mejores límites de detección se obtienen cuando se usan los tres o cuatro píxeles centrales, pero la linealidad puede expandirse hasta tres ordenes de magnitud usando los píxeles laterales, lo que es suficiente para la aplicación estudiada. En otros estudios realizados por nuestro grupo de trabajo se ha visto que es posible expandir hasta seis órdenes de magnitud el intervalo de trabajo lineal utilizando esta estrategia.⁴⁰

Tabla III.7 Desempeño analítico de las diferentes líneas atómicas como función de los píxeles de detección usados para la cuantificación de la señal

	λ (nm)	Sens. ^a (%)	Píxeles de detección	Masa caráct. (ng)	LOD (ng)	Linealidad (μ g)
Cr	236.594	0.83	34+35+36+37	0.39	1.5	^b 7.5 - 75
Cr	236.681	0.67	101+102+103+104	0.50	1.8	^b 4 - 120
			100+105	2.45	9.3	^b 25 - 550
Al	236.705	24	120+121+122	0.09	0.2	^b 0.6 - 25
			117+125	0.60	2.2	^b 6 - 150
Fe	283.245	0.05	49+50+51	18	6	0.1 - 4
			48+52	161	71	4 - 40
			47+53	566	241	10 - 120
Pb	283.306	62	88+89+90	0.017	0.023	^b 0.1 - 6.0
			87+91	0.090	0.074	^b 0.2 - 12
			86+92	0.350	0.220	^b 1.0 - 100
Co	283.393	0.01	143+144+145	82	86	0.5 - 16
			142+146	440	460	2 - 120
Co	283.443	0.002	175+176+177	400	440	2 - 120
Ni	283.455	0.02	183+184+185	66	65	0.5 - 16
			182+186	320	430	2 - 120

^aSensibilidad relativa referida a la línea más sensible para cada elemento.

^bValores en ng.

Como se puede apreciar, se obtuvo un LOD de 23 pg para el Pb, permitiendo su determinación incluso a niveles por debajo de μ g g⁻¹. Para el resto de analitos se obtuvieron unos LODs de 0.2 ng (Al), 86 ng (Co), 1.5 ng (Cr), 6 ng (Fe) y 65 ng (Ni), que se consideraron adecuados para el propósito del trabajo, considerando

las concentraciones de estos metales que normalmente se encuentran en CNTs (mg g^{-1}).

En resumen, parece factible llevar a cabo la detección simultánea de varios analitos mediante HR-CS GFAAS a los niveles de concentración esperados en CNTs cuando se selecciona una ventana de longitudes de onda en la proximidad de la línea atómica del Pb de 283.306 nm (para Co, Ni, Fe y Pb) y otra ventana en la proximidad del Cr de 236.681 nm (para Cr y Al).

III.3.3.2 Condiciones de atomización

Una vez que se ha seleccionado la región espectral apropiada para la determinación multielemental, se investigaron las condiciones óptimas para el análisis directo de CNTs usando una muestra candidata a ser material de referencia (muestra D en tabla II.2, página 78). El único artículo previo dedicado al análisis directo de CNTs mediante SS-GFAAS (con instrumentación de fuente de línea), indicaba que esta muestra no es, *a priori*, muy compleja para esta técnica,²⁵ al menos cuando se abordan determinaciones monoelementales. Debe resaltarse que en ese trabajo los autores proponían el uso de elevadas cantidades de muestra (7 mg), pero en el presente trabajo se optó por trabajar con pequeñas cantidades (0.1-0.5 mg). Esto se debe simplemente a que el precio de los CNTs es elevado y se considera una ventaja desarrollar un método que consuma tan poca muestra como sea posible, especialmente para el control de calidad industrial. Además, la muestra D, candidata a material de referencia fabricada por NRC, se encontraba disponible en botes de solo 100 mg. El uso de pequeñas cantidades de masa aseguraba que se tenía suficiente cantidad para el número de medidas necesarias para la optimización y para la evaluación de la robustez del método.

Como MELLO *et al.*²⁵ habían comentado previamente, es complicado eliminar completamente la matriz de los CNT durante la etapa de pirólisis a menos que se añada O_2 (lo que normalmente va en detrimento de la vida útil de los tubos y de las plataformas). Sin

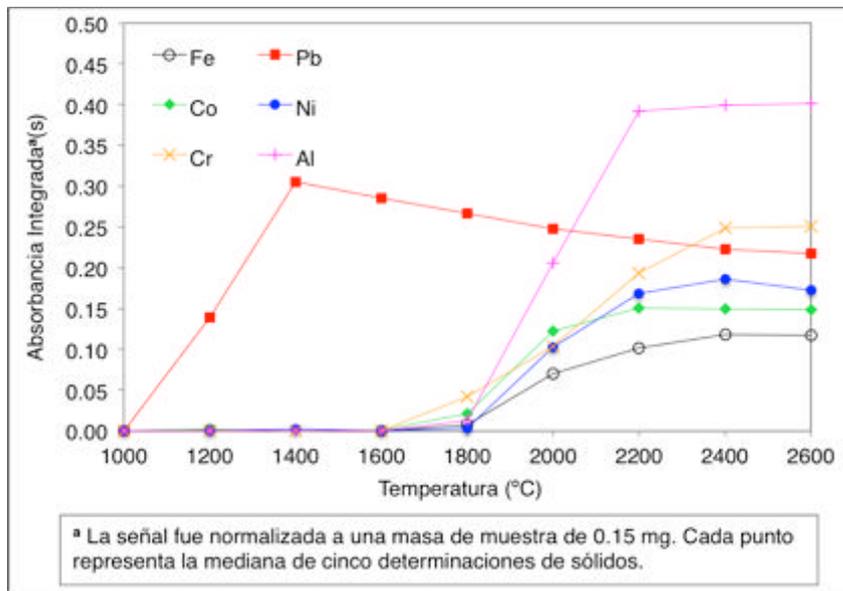
embargo, esto no significa que sea imposible vaporizar y atomizar los elementos de interés. Únicamente significa que un residuo carbonoso persiste después del análisis (aproximadamente un 50-60%). Se realizaron experimentos para analizar este residuo y no se obtuvieron señales para los analitos, demostrando que se vaporizan completamente tras un único ciclo de atomización. Así, la presencia de este residuo no es un problema significativo ya que puede ayudar a proteger la plataforma y asegurar que puede usarse durante más de cien ciclos. Además, el residuo no se encuentra adherido a la plataforma y puede eliminarse fácilmente. De esta forma el residuo se eliminó con un pequeño cepillo tras 10 medidas de sólidos y después de realizó una medida de blanco para eliminar cualquier posible problema de contaminación.

Cuando se intenta una determinación multielemental, es necesario asegurar que el analito más volátil no se ha perdido, de ahí la importancia de la optimización de las condiciones de pirólisis y del uso de los modificantes químicos.^{41,42}

Por un lado, en la determinación simultánea de Pb, Co, Fe y Ni, estos tres últimos elementos no son muy volátiles. Sus correspondientes curvas de pirólisis muestran que no se producen pérdidas de estos elementos por debajo de 1400°C, incluso en ausencia de modificante químico. Es más, la propia matriz estabiliza a estos analitos cuando se analizan los CNTs (como se comentará después) así que no se detectaron pérdidas hasta los 1600°C para las muestras sólidas. Por lo tanto, para Co, Fe y Ni la etapa de pirólisis no resulta crítica. Obviamente, la situación para el Pb es diferente. Las pérdidas de Pb comenzaron a 700-800°C con soluciones acuosas, en ausencia de modificante químico. Además, este elemento parece no estar adherido a la matriz de los CNTs, ya que se observa la misma situación tras pirólisis de las muestras sólidas. Este aspecto puede mejorarse fácilmente mediante la adición de Pd como modificante, permitiendo el uso de temperaturas de pirólisis hasta de 1000°C sin pérdidas. La cantidad de Pd óptimo para los niveles de Pb esperados en las muestras fue de 100 ng. El uso de mayores cantidades de Pd

conducían a unas señales peor definidas debido a problemas de sobreestabilización. En resumen, para la determinación simultánea de Pb, Co, Fe y Ni seleccionaron una temperatura de pirólisis de 800°C y una adición de 100 ng de Pd.

Figura III.18 Curvas de atomización para el análisis directo de la muestra D de CNT (2LV-BIO-SWCNT-1)



Respecto a la temperatura de atomización, se esperaba que la temperatura óptima para un elemento volátil como el Pb fuera menor que para el resto de analitos, por lo que obviamente, era necesario llegar a una temperatura de compromiso. Esto se puede observar claramente en la figura III.18 (página 178), donde se muestra la curva de atomización para una muestra de CNT. En esta figura la señal se normalizó a una masa de 0.15 mg. Para Co, Fe, Ni y Pb se toman los tres píxeles de detección centrales, para Cr los cuatro centrales y para Al la suma de los dos píxeles de las alas. Cada punto representa la mediana de cinco réplicas sólidas. Finalmente, el uso de una temperatura de 2500°C dio como resultado señales con un único pico y bien definidas para todos los analitos. Con estas condiciones, la pérdida de sensibilidad del Pb era solo de aproximadamente el 30%,

un coste mínimo a pagar para conseguir la determinación simultánea de cuatro elementos.

En la determinación simultánea de Cr y Al, no se encontraron tantos problemas como en el caso de Co, Fe, Ni y Pb, ya que ambos analitos tienen un comportamiento similar. Para estos dos analitos se seleccionó una temperatura de pirólisis de 1000°C, una temperatura de atomización de 2500°C con una adición de 100 ng de Pd como modificante.

III.3.3.3 Estrategia para la calibración

Una vez que se habían establecido las condiciones óptimas, se exploró la posibilidad de cuantificar usando una calibración frente a patrones acuosos. Como puede observarse en las figuras III.19 y III.20 (página 180) para la determinación de Cr y Al y en las figuras III.21 y III.22 (página 181) para la determinación de Co, Ni, Fe y Pb, se obtuvieron señales bien definidas para todos los analitos, incluso con análisis directo de sólidos. Además, no se observó ningún indicio de posibles solapamientos espectrales y se consiguió una línea base estable.

Sin embargo, considerando la naturaleza de la muestra analizada y su capacidad para retener metales encerrándolos en su estructura y su resistencia a la temperatura, se esperaba algún tipo de efecto de estabilización cuando se analizaran directamente las muestras sólidas. Esto se apreció claramente para Co, Fe, Ni, y Cr, y también aunque en menor medida para Al. Para estos analitos, las señales de los sólidos aparecían retrasadas y la señal era más ancha (en algunos casos exhibiendo un poco de cola) en comparación con los patrones acuosos (véase figuras III.20A y III.20B, página 180 para la determinación de Cr y Al y figuras III.22A y III.22B, página 181, para la determinación de Co, Fe, Ni y Pb).

Cabe resaltar que en la figura III.19B (página 180), se observa la aparición de tres señales adicionales además de las tres estudiadas (Cr a 236.594 nm y 236.681 nm y Al a 236.705 nm). Estas señales se corresponden con Ni y Cr en líneas con baja sensibilidad (Ni a

236.566 nm con 0.022% de sensibilidad, Ni a 236.780 nm con 0.011% de sensibilidad y Cr a 236.786 nm con 0.0048% de sensibilidad, en todos los casos referida a la línea del elemento más sensible).

Figura III.19 Espectros 3D para la determinación de Al y Cr para (A) disolución estándar (25 ng de Cr y 50 ng de Al) y (B) análisis sólido de muestra de CNT (0.134 mg de muestra D) que contiene aproximadamente 25 ng de Cr y 50 ng de Al

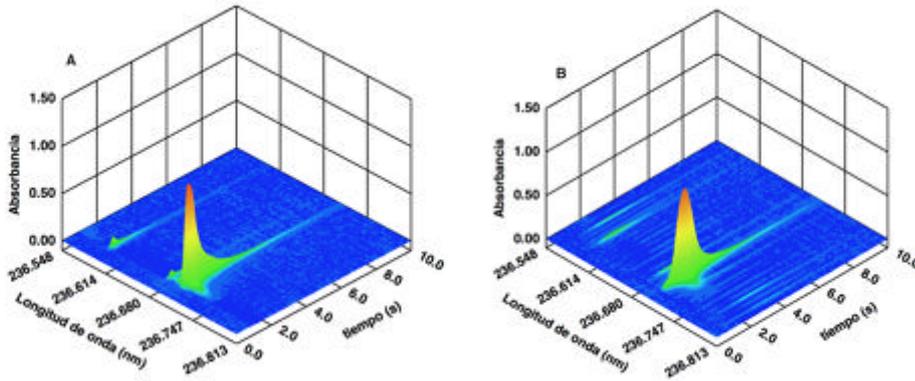


Figura III.20 Absorbancia integrada para las tres líneas atómicas (Al, Cr 236.594 nm y Cr 236.681 nm) para (A) disolución estándar y (B) análisis sólido de muestra de CNT Esta absorbancia se ha obtenido mediante la suma de dos píxeles de detección de las alas de la señal para la línea del Al y de los cuatro píxeles centrales en cada línea atómica del Cr a partir de las señales mostradas en la figura III.19

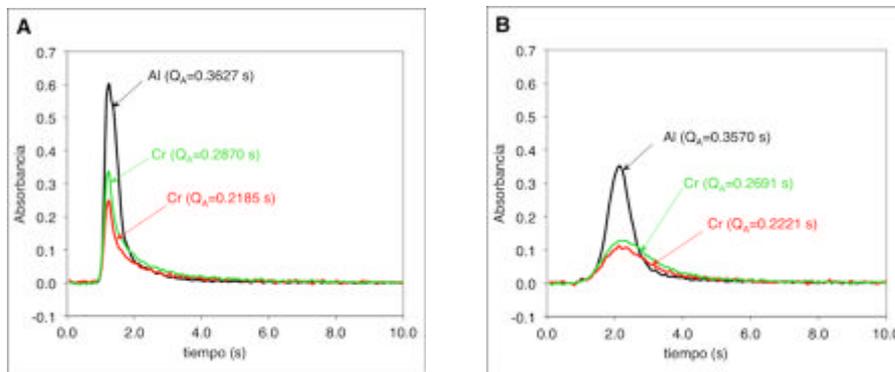


Figura III.21 Espectros 3D para la determinación de Co, Fe, Ni y Pb para (A) disolución estándar (1 ng de Pb, 0.4 μ g de Fe, 2.7 μ g de Ni y 2.7 μ g de Co) y (B) análisis sólido de muestra de CNT (0.151 mg de muestra D) que contiene aproximadamente 1 ng de Pb, 0.4 μ g de Fe, 2.7 μ g de Ni y 2.7 μ g de Co

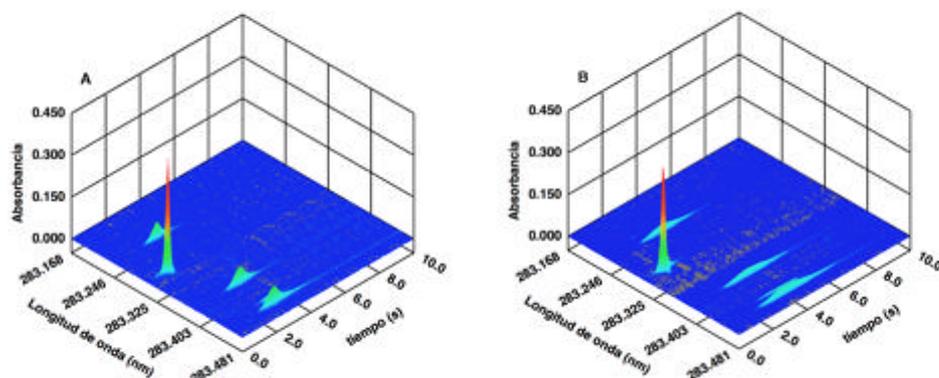
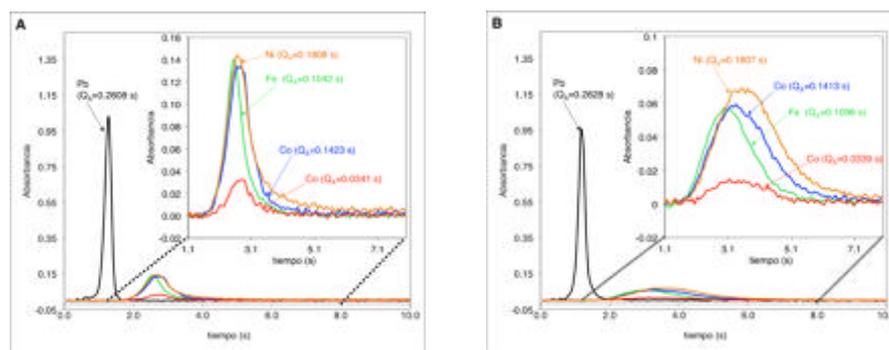


Figura III.22 Absorbancia integrada para las cinco líneas atómicas (Pb, Ni, Fe, Co 283.393 nm y Co 283.443 nm) para (A) disolución estándar y (B) análisis sólido de muestra de CNT. Esta absorbancia se ha obtenido mediante la suma de tres píxeles de detección en cada línea atómica a partir de las señales mostradas en la figura III.21



La situación para el Pb fue diferente, puesto que en este caso la señal fue prácticamente idéntica a la obtenida para patrones acuosos. Parece que este elemento, bien no se encuentra retenido en la matriz de los CNTs de la misma forma que lo están el resto de elementos, o bien su presencia se debe a una contaminación exógena con lo que estaría localizado en la superficie exterior de los CNTs. MELLO *et al.* habían obtenido ya resultados similares²⁵ mostrando señales más anchas para la mayoría de analitos cuando se analizaban sólidos

directamente, pero no para todos ellos (desgraciadamente, en este artículo no se comentaban las señales obtenidas para el Pb).

A pesar de los distintos mecanismos de atomización observados para los sólidos y los patrones acuosos para la mayoría de elementos (lo que da como resultado señales con diferentes perfiles) y siempre que se consiga una atomización completa, el uso del área integrada de la señal debe hacer factible la calibración con patrones acuosos,^{22,43,44} especialmente si la temperatura del horno no cambia significativamente durante el tiempo que tarda en aparecer la señal. En este sentido, como puede observarse en los valores presentados en las figuras III.20 y III.22 (páginas 180 y 181), se obtuvieron valores de sensibilidad comparables para la muestra sólida y los patrones acuosos para todos los analitos. Por lo tanto, el análisis de las muestras se realizó usando curvas de calibración construidas con patrones acuosos.

III.3.3.4 Análisis de los CNTs

Una vez se establecieron las condiciones óptimas de trabajo, se llevó a cabo el análisis de muestras de CNTs. Se prestó especial atención al análisis de la muestra candidata a muestra de referencia de NRC (muestra D en la tabla II.2, página 78). Para esta muestra, se realizaron 20 determinaciones a lo largo de 10 sesiones diferentes para comprobar la robustez del método. También se llevó a cabo su digestión con el objetivo de validar los resultados obtenidos. Como ya se ha mencionado en apartados anteriores, la digestión de esta muestra no resulta en absoluto sencilla. Aún siguiendo un procedimiento bajo presión y temperatura mediante microondas e investigando, incluso, el uso de diferentes combinaciones de ácidos (tales como HNO₃, HF y/o HCl) no se obtuvo en ningún caso una solución transparente. Finalmente, se usó el procedimiento descrito en el apartado II.5.1.3 (página 96) que incluye un filtrado del residuo remanente.

Otro aspecto a tener en cuenta fue la selección de los píxeles adecuados en cada uno de los analitos con el fin de que la señal

obtenida se encuentre dentro del rango lineal. Para el análisis de esta muestra se sumaron los tres píxeles centrales para Co, Fe, Ni y Co, los cuatro píxeles centrales para Cr y dos píxeles laterales para Al (píxeles 117+ 125).

Los resultados de esta muestra se observan en la tabla III.8. Se obtuvo buena concordancia entre los resultados obtenidos con SS HR-CS GFAAS con los obtenidos por ICP-OES tras digestión. En todos los casos los intervalos de incertidumbre se superponen, lo que demuestra que es posible utilizar la calibración mediante patrones acuosos en SS HR-CS GFAAS. Para cada determinación de las muestras sólidas se realizaron cinco réplicas. Obviamente, este es un número que puede variar dependiendo de las características de la muestra y de las necesidades de precisión.⁴⁵ En este caso, se consideró suficiente con cinco réplicas, puesto que el 84% de los resultados obtenidos para cada determinación individual estaban dentro del rango del 20% del valor objetivo de referencia.

Tabla III.8 Resultados obtenidos con SS HR-CS GFAAS de la muestra D (2LV-BIO-SWCNT-1)

	SS-GFAAS		Resultado ^{a,b}	
	λ (nm)	Resultado ^a (mg g ⁻¹)	Digestión + ICP-OES (mg g ⁻¹)	Resultado NRC (mg g ⁻¹)
Cr	236.594	0.177 ± 0.013	0.209 ± 0.050	0.239 ± 0.013
Cr	236.681	0.189 ± 0.034	0.209 ± 0.050	0.239 ± 0.013
Al	236.705	0.369 ± 0.070	0.351 ± 0.073	0.375 ± 0.004
Fe	283.245	2.7 ± 0.4	2.5 ± 0.4	2.9 ± 0.3
Pb	283.306	0.0069 ± 0.0013	0.0068 ± 0.0008	0.00765 ± 0.00030
Co	283.393	18.4 ± 2.5	17.6 ± 1.6	16.7 ± 0.3
Co	283.443	19.6 ± 3.8	17.6 ± 1.6	16.7 ± 0.3
Ni	283.455	17.2 ± 2.5	16.0 ± 1.5	14.8 ± 0.2

^aLas incertidumbres se han tomado como la desviación estándar obtenida para todas las determinaciones (n=20 para análisis directo de sólido) y n=4 para análisis tras digestión).

^bLos resultados obtenidos tras la digestión de la muestra (según procedimiento descrito en el apartado II.5.1.3, página 96).

Para demostrar que el método desarrollado para la determinación simultánea de Co, Fe, Ni y Pb no iba en detrimento de una correcta determinación de Pb debido al uso de una mayor temperatura de atomización, se realizaron cinco determinaciones adicionales mediante análisis directo de sólidos con HR-CS GFAAS usando la línea más sensible del Pb (217.001 nm) y con condiciones óptimas de atomización (2000°C en lugar de 2500°C). El resultado obtenido fue de $7.0 \mu\text{g g}^{-1}$ ($s=1.2 \mu\text{g g}^{-1}$), prácticamente idéntico al resultado obtenido en la línea de 283.306 nm y con las condiciones optimizadas para el análisis multielemental (compárese con la tabla III.8, página 183).

Además, se realizaron medidas complementarias en Canadá en el NRC cuyos resultados se muestran también la tabla III.8. En este centro se llevó a cabo la digestión de la muestra D (2LV-BIO-SWCNT) mediante microondas con una mezcla de ácidos y se analizó después con ICP-MS con un procedimiento de calibración por dilución isotópica para Cr, Fe, Ni y Pb y con adiciones estándar para Co. El Al se determinó por activación neutrónica.

Además de obtener resultados cuantitativos, la técnica SS HR-CS GFAAS proporciona también información sobre la homogeneidad del material en los niveles de masa analizados, lo que puede ser interesante para usuarios futuros de este posible material de referencia. Este hecho se debe a que la imprecisión que puede atribuirse a otros factores, tales como el pesado o la variabilidad instrumental (que puede estimarse fácilmente mediante la medida de soluciones acuosas), normalmente sólo aporta una pequeña porción de la varianza total (menos del 1% en el caso de este trabajo) obtenido cuando se analiza directamente muestras sólidas.⁴⁶⁻⁴⁸

Se obtuvieron valores de desviación estándar relativa (RSD) en bruto (sin considerar la media o la mediana de varias réplicas, sino considerando el total de las 100 réplicas) de aproximadamente el 25% para Al, Cr, Fe y Pb disminuyendo a 20% para Ni y Co, que están presentes en concentraciones mayores. El valor para la constante de homogeneidad relativa (H_E), un parámetro que fue introducido por

KÜRFURST⁴⁹ y basado en la constante de muestreo que fue propuesta por INGAMELLS y SWITZER,⁵⁰ representa la incertidumbre (como la RSD en %) que se obtendría basada en la heterogeneidad de la muestra solo cuando se analiza 1 mg de muestra. Los valores de H_E calculados usando estos resultados para esta muestra fueron 10.1 (Al), 10.2 (Co), 10.0 (Cr), 11.9 (Fe), 10.1 (Ni) y 12.6 (Pb) $\text{mg}^{1/2}$. Esto se traduce en unos valores de K_s (constante de INGAMELLS y SWITZER⁵⁰) de 102 (Al), 104 (Co), 100 (Cr), 141 (Fe), 102 (Ni) y 159 (Pb) mg, siendo la K_s la cantidad de muestra que se tendría que analizar para tener una imprecisión en la medida del 1% debido a la inhomogeneidad de la muestra.

Tabla III.9 Coeficientes de correlación de Pearson (r) obtenidos para las señales de absorbancia de los elementos monitorizados simultáneamente para la muestra D (2LV-BIO-SWCNT de NRC)

	Co	Fe	Ni	Pb	Cr	Al
Co	--	0.87	0.95	0.85	--	--
Fe	0.87	--	0.86	0.81	--	--
Ni	0.95	0.86	--	0.82	--	--
Pb	0.85	0.81	0.82	--	--	--
Cr	--	--	--	--	--	0.74
Al	--	--	--	--	0.74	--

Además, puesto que todos los elementos se monitorizaron simultáneamente, se pudo evaluar el nivel de correlación entre señales, en otras palabras, establecer si las diferentes impurezas metálicas tienden a concentrarse en las mismas zonas de la muestra o no. Así, se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson para 100 réplicas de análisis. Los resultados se muestran en la tabla III.9. Como puede observarse, el nivel de correlación es alto entre Cr y Al y muy alto entre Co, Fe, Ni y Pb, indicando que las porciones de muestra que están enriquecidas o empobrecidas en uno de estos metales, lo están también en el resto de metales y viceversa. La correlación obtenida para Ni y Co fue especialmente elevada. En realidad esto no fue sorprendente ya que estos elementos son los principales componentes del catalizador que se usó para la fabricación de estos CNT. Estos

elementos también presentan un comportamiento muy similar en el horno de grafito, puesto que se vaporizan y atomizan prácticamente juntos. Por lo tanto, se miden en condiciones prácticamente idénticas, lo que puede contribuir también a un mayor coeficiente de correlación.²⁸

Tabla III.10 Resultados obtenidos con SS HR-CS GFAAS de varias muestras de MWNT comerciales

Longitud de onda (nm)	Analito	Resultado ^a (mg g ⁻¹)	Valor de referencia ^{a,b} (mg g ⁻¹)
Muestra A			
236.594	Cr	0.01290 ± 0.00310	0.01343 ± 0.00310
236.681	Cr	0.01149 ± 0.00215	0.01343 ± 0.00310
236.705	Al	0.00693 ± 0.00073	-- ^c
283.306	Pb	0.00046 ± 0.00006	0.00050 ± 0.00006
283.455	Ni	5.1 ± 0.8	4.5 ± 0.1
Muestra B			
236.594	Cr	0.0181 ± 0.0023	0.0237 ± 0.0042
236.681	Cr	0.0227 ± 0.0025	0.0237 ± 0.0042
236.705	Al	0.0265 ± 0.0026	-- ^c
283.245	Fe	0.43 ± 0.04	0.44 ± 0.03
283.306	Pb	0.00035 ± 0.00006	0.00041 ± 0.00007
283.455	Ni	18.0 ± 1.4	16.0 ± 2.0
Muestra C			
283.245	Fe	3.1 ± 0.2	3.3 ± 0.2
283.393	Co	2.2 ± 0.3	2.3 ± 0.1

^a Las incertidumbres se han tomado como la desviación estándar obtenida para todas las determinaciones (n=5 para análisis directo de sólido y n=4 para análisis tras digestión).

^b Los resultados obtenidos tras la digestión de la muestra (según procedimiento descrito en el apartado II.5.1.3, página 96).

^c En las muestras A y B no se consiguió validar el resultado de Al. El contenido de Al tras disolver la muestra se encontraba por debajo del LOD obtenido con ICP-OES e incluso con ICP-MS.

Con objeto de evaluar la utilidad de los métodos desarrollados para muestras reales, se realizaron análisis de tres muestras de

MWNTs disponibles comercialmente (véase detalles en el apartado II.3, página 73), cuyos resultados, que se muestran resumidos en la tabla III.10 (página 186), demostraron que el método desarrollado servía como método de aplicación general a este tipo de materiales. En estas muestras, la selección de los píxeles del detector fue la misma que con la muestra D de tipo SWCNT para Co, Cr, Fe, Ni y Pb. En el caso de Al se seleccionaron dos píxeles laterales para la muestra B y tres píxeles centrales (píxeles 120+121+122) para la muestra A.

El comportamiento de estas muestras de tipo MWCNT en el horno de grafito fue similar a la muestra D de tipo SWCNT (2LV-BIO-SWCNT-1). En general, los valores de precisión obtenidos para varias determinaciones de CNTs se encontraban normalmente entre el 7 y el 15% de RSD para el Co, Fe, Ni, Al (cuando se usan la mediana de 5 réplicas como valor representativo de cada determinación).⁴² Para el Cr se obtuvieron valores de RSD entre el 11 y el 24% y para el Pb entre el 13 y el 18%.

III.3.4 Conclusiones

Se ha desarrollado una metodología rápida y sencilla para la determinación simultánea de Co, Fe, Ni y Pb por un lado, y de Cr y Al por otro, en CNTs mediante SS HR-CS GFAAS. A pesar de las diferentes concentraciones a las que estos elementos estaban presentes y su diferente comportamiento termoquímico, los resultados no mostraron diferencias significativas con los resultados obtenidos con otras técnicas de análisis. El método desarrollado se basó en:

- a) Monitorizar una región espectral en la que se encontraban líneas atómicas apropiadas para todos los analitos. En el caso de la determinación simultánea de Cr y Al entre 236.548 y 236.798 nm y en la determinación de Co, Fe, Ni y Pb entre 283.168 y 283.481 nm.
- b) Llegar a un compromiso en las condiciones de atomización. Este aspecto fue especialmente importante en el caso de la determinación de Co, Fe, Ni y Pb en la que el Pb es un

elemento más volátil que el resto. En el caso de la determinación de Cr y Al, este aspecto ha sido menos relevante ya que ambos analitos presentan un comportamiento térmico similar en la atomización.

- c) El uso de 100 ng de Pd como modificante químico.
- d) La selección de los píxeles de detección adecuados para ampliar el rango lineal (hasta 3 ordenes de magnitud) cuando era necesario. Este aspecto ha sido especialmente relevante en la determinación de Cr y Al en los que hay que seleccionar los píxeles centrales o los laterales en función de la muestra y de la sensibilidad del analito.

Bajo estas condiciones, es posible obtener resultados precisos mediante la cuantificación por SS HR-CS GFAAS utilizando una calibración sencilla con disoluciones patrón acuosas, una característica distintiva de este método y que es importante para estas muestras, considerando la ausencia de materiales de referencia adecuados.

En general, estos resultados respaldan el interés en el uso del análisis directo con HR-CS GFAAS en este contexto. Esta técnica ofrece ventajas analíticas significativas para un control rápido de este tipo de materiales, que resultan muy complejos de analizar mediante métodos analíticos que implican una digestión previa.

III.3.5 Bibliografía

1. S. Iijima, T. Ichihashi, *Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter*, Nature, 1993, 363, 603-604.
2. V. Choudhary, A. Gupta, *Polymer/Carbon Nanotube Nanocomposites*, disponible en: www.intechopen.com, accedida por última vez en Junio, 2013.
3. M.J. Rivas Martínez, J.R. Ganzer, M. L. Cosme Huertas, Informe de Vigilancia Tecnológica, disponible en: www.madrimasd.org, accedida por última vez en Junio, 2013.
4. A.A. Shvedova, E.R. Kisin, D. Porter, P. Schulte, V.E. Kagan,

- B. Fadeel, V. Castranova, *Mechanisms of pulmonary toxicity and medical applications of carbon nanotubes: Two faces of Janus?*, *Pharmacology and Therapeutics*, 2009, 121, 192-204.
5. M.R. Winchester, R.E. Sturgeon, J.M. Costa-Fernández, *Editorial: Chemical characterization of engineered nanoparticles*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 396, 951-952.
 6. B. Fubini, I. Fenoglio, M. Tomatis, F. Turci, *Effect of chemical composition and state of the surface on the toxic response to high aspect ratio nanomaterials*, *Nanomedicine*, 2011, 6, 899-920.
 7. X. Jiang, K. Huang, D. Deng, H. Xia, X. Hou, C. Zheng, *Nanomaterials in analytical atomic spectrometry*, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 2012, 39, 38-59.
 8. I. López-García, R.E. Rivas, M. Hernández-Córdoba, *Use of carbon nanotubes and electrothermal atomic absorption spectrometry for the speciation of very low amounts of arsenic and antimony in waters*, *Talanta*, 2011, 86, 52-57.
 9. L. Guo, D.G. Morris, X. Liu, C. Vaslet, R.H. Hurt, A.B. Kane, *Iron bioavailability and redox activity in diverse carbon nanotube samples*, *Chemistry of Materials*, 2007, 19, 3472-3478.
 10. R.J. Toh, A. Ambrosi, M. Pumera, *Bioavailability of metallic impurities in carbon nanotubes is greatly enhanced by ultrasonication*, *Chemistry – A European Journal*, 2012, 18, 11593-11596.
 11. X. Liu, V. Gurel, D. Morris, D.W. Murray, A. Zhitkovich, A.B. Kane, R.H. Hurt, *Bioavailability of nickel in single-wall carbon nanotubes*, *Advanced Materials*, 2007, 19, 2790-2796.
 12. D.R. Boverhof, R.M. David, *Nanomaterial characterization: Considerations and needs for hazard assessment and safety evaluation*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 396, 953-961.
 13. S. Azevedo, C. Chesman, J.R. Kaschny, *Stability and electronic properties of carbon nanotubes doped with transition metal impurities*, *European Physical Journal B*, 2010, 74, 123-128.

14. M. Pumera, H. Iwai, *Multicomponent metallic impurities and their influence upon the electrochemistry of carbon nanotubes*, Journal of Physical Chemistry C, 2009, 113, 4401-4405.
15. K.X. Yang, M.E. Kitto, J.P. Orsini, K. Swami, S.E. Beach, *Evaluation of sample pretreatment methods for multivalled and single-walled carbon nanotubes for the determination of metal impurities by ICPMS, ICPOES, and instrument neutron activation analysis*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2010, 25, 1290-1297.
16. M. Pumera, H. Iwai, *Metallic impurities within residual catalyst metallic nanoparticles are in some cases responsible for "electrocatalytic" effect of carbon nanotubes*, Chemistry - An Asian Journal, 2009, 4, 554-560.
17. Z. Li, W. Lin, K.S. Moon, S.J. Wilkins, Y. Yao, K. Watkins, L. Morato, C. Wong, *Metal catalyst residues in carbon nanotubes decrease the thermal stability of carbon nanotube/silicone composites*, Carbon, 2011, 49, 4138-4148.
18. X. Tian, S. Zhou, Z. Zhang, X. He, M. Yu, D. Lin, *Metal impurities dominate the sorption of a commercially available carbon nanotube for Pb(II) from water*, Environmental Science and Technology, 2010, 44, 8144-8149.
19. C. Ge, F. Lao, W. Li, Y. Li, C. Chen, Y. Qiu, X. Mao, B. Li, Z. Chai, Y. Zhao, *Quantitative analysis of metal impurities in carbon nanotubes: Efficacy of different pretreatment protocols for ICPMS spectroscopy*, Analytical Chemistry, 2008, 80, 9426-9434.
20. R. Zeisler, R.L. Paul, R. Oflaz Spatz, L.L. Yu, J.L. Mann, W.R. Kelly, B.E. Lang, S.D. Leigh, J. Fagan, *Elemental analysis of a single-wall carbon nanotube candidate reference material*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011, 399, 509-517.
21. R. Zeisler, R. Oflaz, R.L. Paul, J.A. Fagan, *Use of neutron activation analysis for the characterization of single-wall carbon nanotube materials*, Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 2012, 291, 561-567.
22. M. Resano, F. Vanhaecke, M.T.C. de Loos-Vollebregt,

- Electrothermal vaporization for sample introduction in atomic absorption, atomic emission and plasma mass spectrometry - A critical review with focus on solid sampling and slurry analysis*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2008, 23,1450-1475.
23. U. Schaffer, V. Krivan, *Analysis of high purity graphite and silicon carbide by direct solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry*, Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 2001, 371, 859-866.
 24. F.G.L. Lepri, D.L.G. Borges, R.G.O. Araujo, B. Welz, F. Wendler, M. Krieg, H. Becker-Ross, *Determination of heavy metals in activated charcoals and carbon black for Lyocell fiber production using direct solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption and inductively coupled plasma optical emission spectrometry*, Talanta, 2010, 81, 980-987.
 25. P.A. Mello, L.F. Rodrigues, M.A.G. Nunes, J.C.P. Mattos, E.I. Müller, V.L. Dressler, E.M.M. Flores, *Determination of metal impurities in carbon nanotubes by direct solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry*, Journal of the Brazilian Chemistry Society, 2011, 22, 1040-1049.
 26. B. Welz, S. Morés, E. Carasek, M.G.R. Vale, M. Okruss, H.Becker-Ross, *High-resolution continuum source atomic and molecular absorption spectrometry-A review*, Applied Spectroscopy Reviews, 2010, 45, 327-354.
 27. M. Resano, E. García-Ruiz, *High-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry: Is it as good as it sounds? A critical review*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011, 399, 323-330.
 28. M. Resano, L. Rello, M. Flórez, M.A. Belarra, *On the possibilities of high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for the simultaneous or sequential monitoring of multiple atomic lines*, Spectrochimica Acta Part B, 2011, 66, 321-327.
 29. U. Heitmann, B. Welz, D.L.G. Borges, F.G. Lepri, *Feasibility of*

- peak volume, side pixel and multiple peak registration in high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry*, Spectrochimica Acta Part B, 2007, 62, 1222-1230.
30. J. Briceño, M.A. Belarra, K.A.C. de Schamphelaere, S. Vanblaere, C.R. Janssen, F. Vanhaecke, M. Resano, *Direct determination of Zn in individual Daphnia magna specimens by means of solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2010, 25, 503-510.
 31. I.M. Dittert, J.S.A. Silva, R.G.O. Araujo, A.J. Curtius, B. Welz, H. Becker-Ross, *Direct and simultaneous determination of Cr and Fe in crude oil using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry*, Spectrochimica Acta Part B, 2009, 64, 537-543.
 32. I.M. Dittert, J.S.A. Silva, R.G.O. Araujo, A.J. Curtius, B. Welz, H. Becker-Ross, *Simultaneous determination of cobalt and vanadium in undiluted crude oil using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry*, Journal of Analytical Spectrometry, 2010, 25, 590-595.
 33. L.M.G. Dos Santos, B. Welz, R.G.O. Araujo, S. do C. Jacob, M.G.R. Vale, A. Martens, I.B. Gonzaga Martens, H. Becker-Ross, *Simultaneous determination of Cd and Fe in beans and soil of different regions of brazil using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct solid sampling*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57, 10089-10094.
 34. L.M.G. Dos Santos, R.G.O. Araujo, B. Welz, S. do C. Jacob, M.G.R. Vale, H. Becker-Ross, *Simultaneous determination of Cd and Fe in grain products using direct solid sampling and high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry*, Talanta, 2009, 78, 577-583.
 35. F. Vignola, D.L.G. Borges, A.J. Curtius, B. Welz, H. Becker-Ross, *Simultaneous determination of Cd and Fe in sewage sludge by high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry*

- with slurry sampling*, Microchemical Journal, 2010, 95, 333-336.
36. B. Welz, M. Sperling, *Atomic Absorption Spectrometry*, Wiley-VCH, Weinheim, 1999, Alemania.
 37. D.L.G. Borges, A.F. Da Silva, B. Welz, A.J. Curtius, U. Heitmann, *Determination of lead in biological samples by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry with direct solid sampling*, Journal of Analytical Spectrometry, 2006, 21, 763-769.
 38. B. Welz, L.M.G. dos Santos, R.G.O. Araujo, S.d.C. Jacob, M.G.R. Vale, M. Okruss, H. Becker-Ross, *Unusual calibration curves observed for iron using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry*, Spectrochimica Acta Part B, 2010, 65, 258-262.
 39. J.M. Harnly, *Instrumentation for simultaneous multielement atomic absorption spectrometry with graphite furnace atomization*, Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 1996, 355, 501-509.
 40. M. Resano, A.C. Lapeña, M.A. Belarra, *Potential of solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry to monitor the Ag body burden in individual Daphnia magna specimens exposed to Ag nanoparticles*, Analytical Methods, 2013, 5, 1130-1139.
 41. M. Resano, M. Verstraete, F. Vanhaecke, L. Moens, A. Van Alphen, E.R. Denoyer, *Simultaneous determination of Co, Mn, P and Ti in PET samples by solid sampling electrothermal vaporization ICP-MS*, Journal of Analytical Spectrometry, 2000, 15, 389-395.
 42. M.A. Belarra, M. Resano, F. Vanhaecke, L. Moens, *Direct solid sampling with electrothermal vaporization/atomization: What for and how?*, TrAC – Trends in Analytical Chemistry, 2002, 21, 828-839.
 43. M. Resano, E. Garcia-Ruiz, C. Crespo, F. Vanhaecke, M.A. Belarra, *Solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry for palladium determination at trace and ultratrace levels*, Journal of Analytical Spectrometry, 2003, 18, 1477-1484.

44. M. Resano, M.R. Flórez, *Direct determination of sulfur in solid samples by means of high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry using palladium nanoparticles as chemical modifier*, Journal of Analytical Spectrometry, 2012, 27, 401-412.
45. M.A. Belarra, M. Resano, J.R. Castillo, *Theoretical evaluation of solid sampling-electrothermal atomic absorption spectrometry for screening purposes*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 1999, 14, 547-552.
46. M.A. Belarra, M. Resano, J.R. Castillo, *Discrimination of the causes of imprecision in the direct determination of metals in organic solid samples by electrothermal atomization atomic absorption spectrometry*, Journal of Analytical Spectrometry, 1998, 13, 489-494.
47. C.S. Nomura, C.S. Silva, A.R.A. Nogueira, P.V. Oliveira, *Bovine liver sample preparation and micro-homogeneity study for Cu and Zn determination by solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry*, Spectrochimica Acta Part B, 2005, 60, 673-680.
48. J.F. Rêgo, A. Virgilio, J.A. Nóbrega, J.A.G. Neto, *Determination of lead in medicinal plants by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry using direct solid sampling*, Talanta, 2012, 100, 21-26.
49. U. Kurfürst, *Solid Sample Analysis*, Springer-Verlag, 1998, Alemania.
50. C.O. Ingamells, P. Switzer, *A proposed sampling constant for use in geochemical analysis*, Talanta, 1973, 20, 547-568.

III.4. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE NANOREFUERZO EN UN NANOCOMPOSITE

III.4.1 Introducción

Se entiende por materiales compuestos aquellos formados por dos o más materiales distintos sin que se produzca reacción química entre ellos. En todo material compuesto se distinguen dos componentes: la matriz, que se presenta como fase continua y actúa como ligante, y el refuerzo o relleno que es la fase dispersa. Normalmente, el objetivo de este tipo de materiales es conseguir una combinación de propiedades que no es posible obtener en cada uno de los materiales constituyentes.¹ Las propiedades dependen fundamentalmente de sus componentes individuales, del porcentaje de refuerzo y también de su morfología y de su interfase. Como resultado, se logran materiales con unas combinaciones poco comunes de rigidez, resistencia mecánica, peso, resistencia a la corrosión, dureza o conductividad, ente otros.

Un *nanocomposite* o nanocompuesto polimérico es un material compuesto caracterizado por un refuerzo con al menos una de sus dimensiones en escala nanométrica en el interior de una matriz polimérica. En los materiales compuestos de tipo convencional (es decir, a los cuales se ha agregado un refuerzo no nanoestructurado) las interacciones entre la matriz y la interfase son débiles.² En el *nanocomposite*, las interacciones matriz-refuerzo se producen a nivel atómico o molecular,¹ y esto supone una mejora sustancial de sus propiedades finales.² En este contexto, el ratio área superficial/volumen del nanorefuerto empleado en el *nanocomposite* es crucial para comprender las relaciones entre estructura y propiedades.

La incorporación de nanopartículas, nanohilos o nanotubos con propiedades especiales en matrices poliméricas ha ganado un enorme interés gracias a los cambios significativos en propiedades térmicas, ópticas, eléctricas y magnéticas que son conferidas a los nanocompuestos finales en comparación con la matriz pura. Este tipo

de materiales se va incorporando cada día en más aplicaciones que abarcan numerosos sectores desde los envases para alimentos, informática o automoción.^{2,3}

Durante los últimos 15 años, entre los distintos nanorefuerzos, los nanotubos de carbono (CNTs) han suscitado prácticamente el mayor interés debido a sus excepcionales propiedades electrónicas y mecánicas.⁴ Sin embargo, todavía permanecen sin resolver varios problemas significativos para que se llegue a usar de forma práctica todo su potencial. Quizás el problema más complicado se centra en que los CNTs son insolubles en todos los solventes conocidos. Este hecho limita mucho la capacidad para llevar a cabo su procesado o caracterización basado en su solubilidad. Los CNTs pueden hacerse solubles mediante funcionalización covalente,⁵ pero este proceso modifica mucho sus características físicas y químicas. La única manera de dispersar en fase líquida los CNTs sin tratar es añadir un estabilizante (tal como un surfactante⁶) o un polímero para formar dispersiones. Sin embargo, esto puede conllevar otras limitaciones como la posibilidad de llevar a cabo una caracterización intrínseca de los CNTs.⁷ En vista de estos inconvenientes, varias publicaciones más recientes se centran en investigar otras alternativas de materiales nanoestructurados de tipo inorgánico.^{8,9}

En este contexto, una línea de investigación que suscita un gran interés científico e industrial son las nanopartículas o nanohilos inorgánicos de tipo TMCH, donde TM se refiere a un metal de transición como Mo, W, Nb o Ta; C se refiere a un calcógeno como puede ser S, Se ó Te y H representa a un halógeno, normalmente I. Estos nanorefuerzos con una excepcional funcionalidad a escala molecular son una alternativa muy interesante a los nanotubos de carbono, pues muestran unas ventajas tales como una síntesis sencilla, buena uniformidad y solubilidad y una conductividad eléctrica predefinida dependiendo de la composición inicial del material inicial.¹⁰

La familia más prometedora entre estos nanomateriales de tipo TMCH son los nanohilos formados por Mo, S y I ($\text{Mo}_x\text{S}_y\text{I}_z$) y los de

tipo dicalcogéno metálico (los más utilizados son MoS_2), de los que se han realizado grandes progresos recientemente tanto en lo relativo a su síntesis, como a su caracterización y aplicaciones.^{11,12,13} Estos materiales se suelen presentar en forma de manojos de nanohilos (véase figura II.2, página 77). Una ventaja de los $\text{Mo}_x\text{S}_y\text{I}_z$ frente a los MoS_2 es que los primeros permiten variar el ratio S/Mo y, por lo tanto, sintetizar materiales que contienen menos S que los MoS_2 . Esto se considera una gran ventaja desde que entró en vigor la nueva norma Europea que impone una concentración menor de S en aceites industriales (menor que 0.5% en peso).¹⁴ De esta forma, estos nanomateriales podrían constituir una alternativa a este tipo de productos por sus problemas de toxicidad y polución.

La propiedad común de ambos tipos de nanorefuerzos es su bajo módulo de cizalla entre tubos o entre hilos (entendiéndose por módulo de cizalla, la propiedad mecánica definida como la relación entre esfuerzo y deformación que se produce en un cuerpo cuando la fuerza que se actúa sobre el mismo es paralela a una de las caras mientras que la otra permanece fija¹) y por lo tanto, su fácil dispersabilidad, por un lado, y sus excelentes propiedades de lubricación en seco (en ausencia de lubricante), por otro lado, haciéndolos muy atractivos para la reducción de la fricción y la protección de los polímeros al desgaste. Esto se explica porque estos nanorefuerzos se caracterizan por una nanoestructura en capas con unas interacciones atómicas débiles entre ellas (fuerzas de Van Der Waals) que permiten unos mecanismos de cizalla sencillos y con baja resistencia. La mayoría de las publicaciones se centran en estudiar la mejora de estas propiedades tribológicas (es decir, mejora de la fricción, desgaste y/o lubricación).^{11,15,16}

Una de las aplicaciones de estos *nanocomposites* es su uso como lubricantes sólidos en situaciones donde el uso de lubricantes líquidos es poco práctico o inadecuado, tales como el vacío, la tecnología espacial o el transporte de automoción.^{17,18}

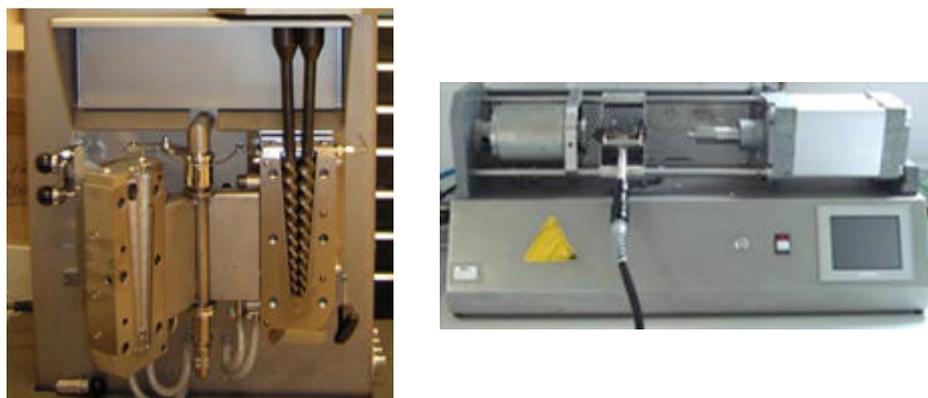
En este contexto, el Instituto Tecnológico de Aragón (ITA) ha participado durante los años 2009 a 2013 en el proyecto europeo

“*Composites of Inorganic Nanotubes and Polymers (COINAPO)*”¹⁹ que tenía como objetivo explorar las propiedades y el desempeño en aplicaciones industriales de varios tipos de composites reforzados con nanopartículas de tipo inorgánico. Dentro de este proyecto se estudió la influencia de varios nanorefuerzos de tipo $\text{Mo}_x\text{S}_y\text{I}_z$ y MoS_2 sobre las propiedades tribológicas de varias matrices poliméricas. Además, también se determinó su efecto en algunas propiedades mecánicas como son la dureza y su resistencia a la tracción.

Dentro de las distintas actividades del proyecto, uno de los cometidos del ITA era la fabricación de estos *nanocomposites* (combinando varios tipos de matriz con varios tipos y porcentajes de nanorefuerzo), lo que se realizaba mediante mezclado en fundido del nanorefuerzo con la matriz polimérica en una micro-extrusora (véase figura III.23, página 199) y la obtención mediante inyección de probetas de geometría adecuada para su caracterización. En este proceso uno de los pasos críticos era el pesado de la cantidad de nanorefuerzo deseada y su posterior introducción en la extrusora para su incorporación a la mezcla. Debido a las características de estos nanomateriales, su manipulación resulta complicada, pudiendo quedar adheridos al instrumental de laboratorio por su elevada carga electrostática o producirse pérdidas en el proceso de pesada o mezclado. Una de las consecuencias de este hecho, es que se produce una pérdida de masa desconocida desde su pesada hasta su introducción en la mezcla, lo que supone que uno de los parámetros de mayor importancia en el *nanocomposite*, que es la cantidad de nanorefuerzo, presente una elevada imprecisión.

Durante el proyecto se utilizaron varios métodos para intentar determinar la masa de nanorefuerzo en el *nanocomposite* (y poder relacionarlo así con la mejora de sus propiedades), como son TEM o TGA, sin embargo ambos presentaban un alto grado de imprecisión bien por su carácter cualitativo (TEM) o por su medida de forma indirecta (en TGA se obtiene el porcentaje de residuo inorgánico total) (véase tabla I.2, página 15).

Figura III.23: Micro-extrusora e inyectora para la fabricación de nanocomposites en ITA



En la bibliografía donde se analiza la influencia del porcentaje de refuerzo en un *nanocomposite*, se suele tomar el porcentajes teórico de nanorefuerzo en fabricación,^{20,21,22} sin comprobarse experimentalmente. Las referencias encontradas donde se verifica el contenido de nanorefuerzo presente en el material suelen utilizarse para determinar nanopartículas de Ag ó Au²³ mediante TEM, ICP-MS o GFAAS, y en algún caso se determinan nanofibras de celulosa²⁴ en celulosa mediante microbalanza de cristal de cuarzo con disipación (QCM-D). En el momento de redacción de esta tesis no se tiene constancia de algún estudio previo que utilice la técnica HR-CS GFAAS para la determinación exacta de la cantidad de refuerzo presente en un *nanocomposite*.

III.4.2 Objetivo del trabajo

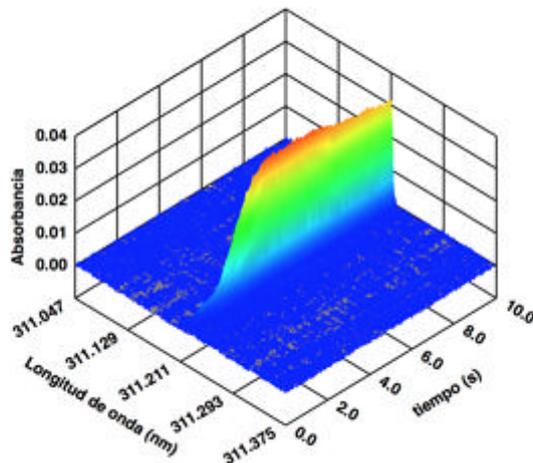
El objetivo de este trabajo es investigar la determinación de la cantidad de nanohilos de tipo MoS₂ ó Mo_xS_yI_z presentes en un *nanocomposite* a partir de la determinación elemental mediante SS HR-CS GFAAS. El objetivo final es el desarrollo de un procedimiento rápido de análisis para su uso en el control rutinario del procesado de *nanocomposites* de modo que se obtenga el porcentaje de nanorefuerzo, y por ende la eficacia del proceso de fabricación.

III.4.3 Desarrollo del método

III.4.3.1 Determinación de Mo

Dada la composición química de los nanohilos a determinar, uno de los elementos presente en todos ellos era el Mo, por lo que en un principio se seleccionó este elemento a determinar por SS HR-CS GFAAS para correlacionarlo posteriormente con la cantidad de nanorefuerzo presente. Para ello y debido a los altos contenidos de analito esperados, se probaron varias condiciones de análisis, utilizando diferentes longitudes de onda buscando condiciones de mínima sensibilidad utilizando caudal de argón máximo durante la etapa de atomización en todas ellas.

Figura III.24 Espectro 3D de la atomización de Mo en nanocomposite de poliamida + 2% teórico de MoS₂



Las señales obtenidas en todos los casos presentaban una larga cola que no llegaba a descender (véase figura III.24). Además, el efecto memoria era muy elevado. Evidentemente, el Mo no se conseguía extraer de la matriz, vaporizar y atomizar por completo. Como sugerían algunos estudios previos, se probó a aumentar el tiempo de atomización²⁵ y a añadir varios modificantes químicos^{26,27} entre ellos se probaron disoluciones con varios elementos del grupo del Pt (Pt y Pd), un agente fluorinante como una disolución de

$\text{NH}_4\text{F} \cdot \text{HF}$, y Ru como modificante permanente del tubo de grafito. Por último, se probó también mediante GFAAS con Zeeman como corrección de absorción inespecífica. Ninguna de estas pruebas aportó ninguna mejora a la señal. Este hecho tiene su origen en que este analito es muy refractario y es muy difícil de determinar por GFAAS en concentraciones tan altas.

III.4.3.2 Determinación de S

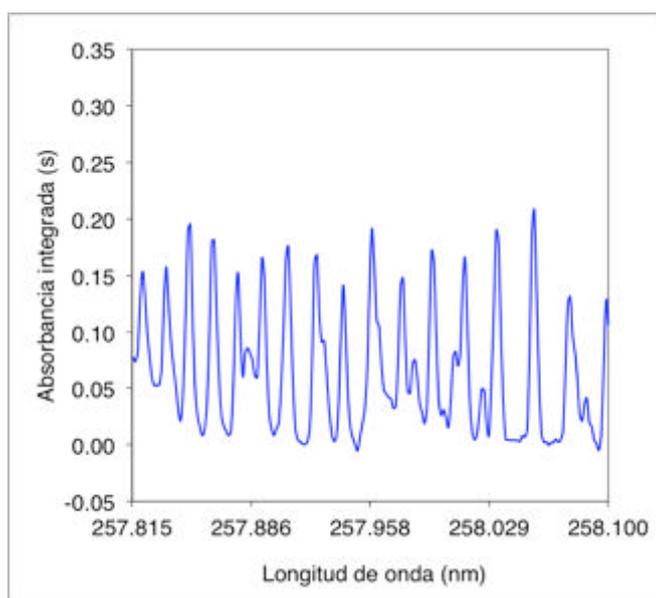
Una vez comprobados los problemas que ofrecía el Mo para su determinación con GFAAS, el S era ya el único elemento químico en común para todos los nanohilos estudiados en el proyecto. En paralelo a este trabajo, otro miembro de nuestro grupo de investigación estaba investigando las capacidades de la técnica SS HR-CS GFMS para la determinación de S a partir de la absorción molecular de la especie CS ,²⁸ por lo que se decidió aplicar dicha metodología a las muestras de *nanocomposites* fabricadas por el ITA.

Aunque un trabajo previo utilizaba el espectro de la molécula SnS ,²⁹ la mayoría de las publicaciones utilizaban la absorción de la molécula CS para la determinación de S debido a la estabilidad del enlace CS (714 kJ/mol) y a la presencia de carbono activo en el horno de grafito. De esta forma, se había estudiado la determinación de S en diversos materiales como son petróleo³⁰, carbón³¹ y muestras de aceros, plásticos, polvo de heno y polvo de coque.²⁸ También existía un trabajo previo con un instrumento de fuente continua (pero no de alta resolución) que determinaba S en carbón a partir de una suspensión. La curiosidad de este trabajo consistía en que trabajaba con una ventana espectral más amplia y en un rango localizado entre 200 y 210 nm, cuya señal no estaba claro a que especie se atribuía pero parecía que podía ser a la molécula CS .³² No se encontraron referencias para la determinación de S presente en nanopartículas o nanorefuerzos.

En cuanto a la selección de la longitud de onda, alrededor de 258.0 nm se aprecia el espectro de la molécula CS (transición electrónica $X^1\Sigma^+ \rightarrow A^1\Pi$), una zona donde el espectro muestra

muchas líneas estrechas (véase figura III.25), que se caracteriza por una buena sensibilidad y que había ofrecido buenos resultados para distintos materiales.²⁸ Dentro de esta zona, en la bibliografía se indican las 'líneas' 257.593 nm, 257.958 nm y 258.056 nm como las líneas más sensibles del S.³³⁻³⁸ En este trabajo se escogió la línea de 257.958 nm, ya que presenta un menor riesgo de solapamientos espectrales que las otras dos líneas principales en presencia de Fe.

Figura III.25 Espectro de la molécula CS en el entorno de 257.958 nm



Finalmente, el aspecto más crítico consistía en estabilizar los compuestos del S durante la pirólisis. Para ello, el primer paso fue recubrir la plataforma y el tubo de grafito con Ru mediante el método descrito en el apartado II.2.3 (página 72). Además, se utilizó también una solución de nanopartículas de Pd que aseguraban una distribución más homogénea del Pd sobre la plataforma que una disolución de PdNO₃, lo que unido al menor tamaño de las partículas (aproximadamente 20 nm) proporcionaba una estabilización superior del S, permitiendo ofrecer una respuesta similar independientemente de la especie de S presente en la muestra, un problema que figuraba en la literatura para la determinación de S a partir de CS.³¹ Las

nanopartículas de Pd se obtuvieron según el método detallado en el apartado II.2.3 (página 72) y que se optimizó en un trabajo previo.²⁸

Se optimizaron las temperaturas de pirólisis y de vaporización para una de las muestras de *nanocomposites* (PA + 2% Mo₆S₂I₈) así como la cantidad de nanopartículas de Pd, obteniéndose las señales más reproducibles para una temperatura de pirólisis de 800 °C y 2500 °C de vaporización. El tiempo de vaporización fue de 5 s, aunque para la disolución patrón acuosa se redujo a 4 s, por ser suficiente y aumentar así la vida de la plataforma y el tubo. La cantidad óptima de nanopartículas de Pd fue 18 µg. Con estas condiciones (resumidas en la tabla II.13, página 90) se obtuvieron señales reproducibles de un solo pico. En la figura III.26A se muestra el espectro 3D de CS obtenido para 700 ng de S de una solución acuosa y en la figura III.26B el espectro 3D para la misma cantidad de S para una muestra de *nanocomposite*. En la figura III.27, en la página 204, se observa que las áreas de las señales obtenidas para esta muestra sólida y para esta disolución patrón son comparables, obtenidas ambas sumando los tres píxeles centrales (100+101+102) en la línea 257.958 nm.

Figura III.26 Espectro 3D para la vaporización de 700 ng de S en (A) disolución patrón acuosa y en (B) *nanocomposite* de poliamida + 2% teórico de MoS₂

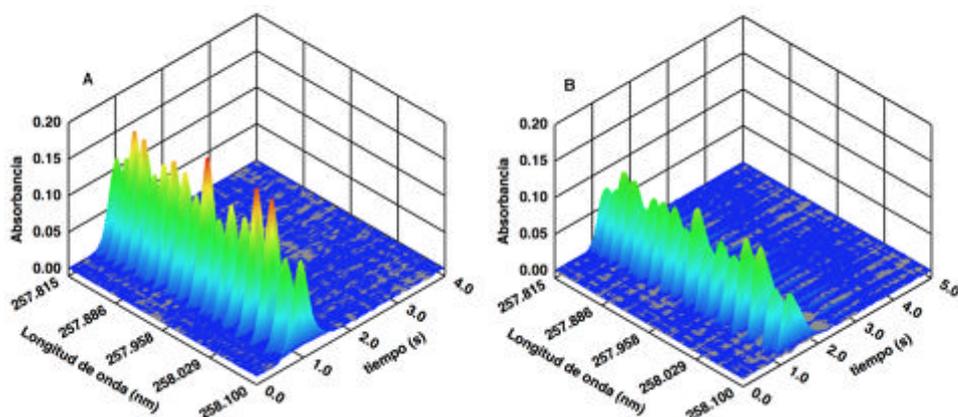
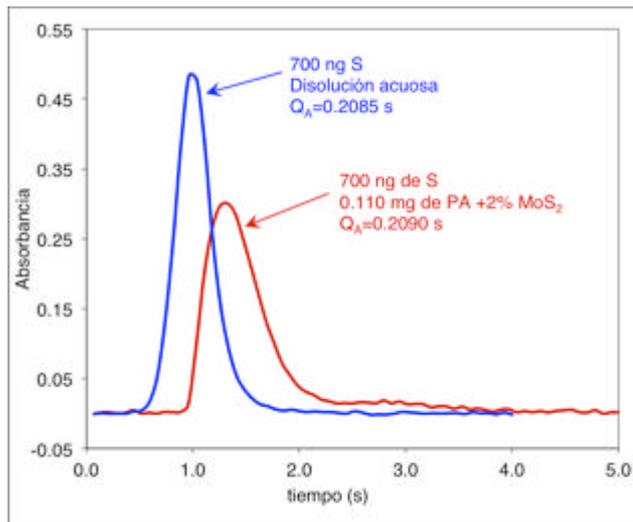


Figura III.27 Señal de CS obtenida para disolución patrón acuosa y de nanocomposite como suma los tres píxeles centrales en la línea 257.098 nm



III.4.3.3 Resultados y validación de los contenidos de S

Con esta técnica de análisis se analizaron cinco muestras de *nanocomposites* fabricadas dentro del proyecto COINAPO:¹⁹

- PA+2%MoS₂
- PA+2%Mo₆S₂I₈
- PP+1.5%MoS₂
- PP+1.5%Mo₆S₂I₈
- PET+3%Mo₆S₃I₆

Los resultados obtenidos de contenido de S en los cinco *nanocomposites* analizados con este método se muestran en la tabla III.11 (página 206). Como en los casos estudiados anteriormente, cada determinación supuso la medida de 5 réplicas y el uso de la mediana como valor representativo. En todos los casos, la recta de calibrado se construyó con patrones acuosos.

Con el objetivo de validar los resultados obtenidos con SS HR-CS GFMAS se llevó a cabo la digestión de los *nanocomposites* analizados según las condiciones descritas en la en el apartado II.5.1.5 (página

101) y su posterior análisis mediante ICP-OES con las condiciones de la tabla II.21 (página 101).

Debido a que para disolver las muestras de *nanocomposites* fue preciso utilizar ácido sulfúrico, no se podía relacionar el contenido de S de las digestiones con la cantidad de nanorefuerzo presente en los mismos. Por esta razón, se llevó a cabo la determinación de Mo mediante ICP-OES, puesto que el contenido de este analito procedía exclusivamente de los nanohilos (véase apartado II.5.1.5, página 101). Para convertir los resultados de Mo en contenido de S se usó la fórmula atómica de los nanohilos que previamente se comprobó experimentalmente. Para ello, se llevó a cabo la digestión de los tres nanohilos utilizados en este trabajo según las condiciones descritas en el apartado II.5.1.4 y posteriormente se determinó el contenido de Mo y S por ICP-OES con las condiciones de la tabla II.21 (página 101).

Los resultados obtenidos finalmente se muestran en la tabla III.11 (página 206). Como puede apreciarse se consiguió obtener un buen acuerdo en todas las muestras estudiadas, con valores de RSD entre el 5 y el 12% en las medidas por SS HR-CS GFMS.

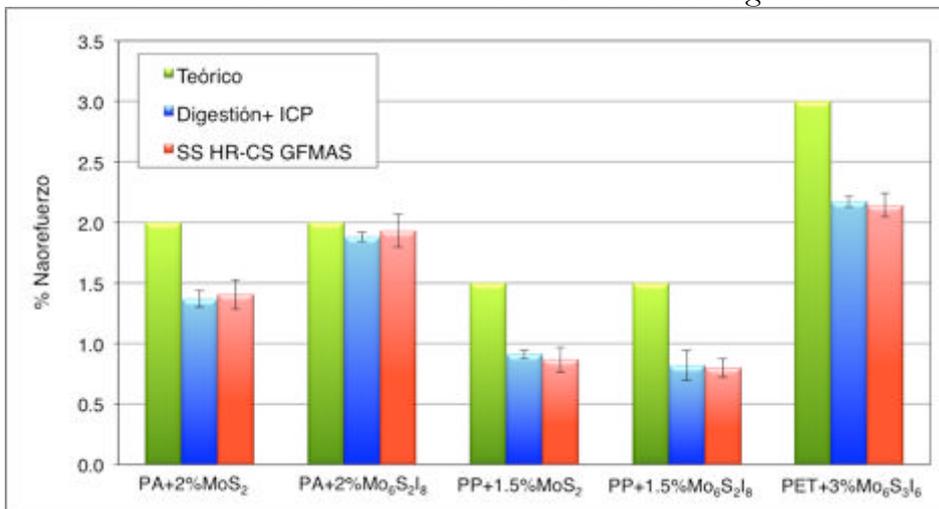
Por último, se obtuvo el porcentaje de nanohilos en cada uno de los *nanocomposites* a partir del resultado obtenido del contenido de S mediante SS HR-CS GFMS. Este valor se comparó con los porcentajes obtenidos a partir del contenido de Mo mediante ICP-OES tras digestión de las muestras (véase figura III.28, página 206). Como se observa en esta figura el porcentaje teórico de nanohilos fue en todos los casos mayor que el porcentaje obtenido a partir de los resultados experimentales, excepto para la PA con $\text{Mo}_6\text{S}_2\text{I}_8$ en la que los resultados experimentales se encontraban muy cercanos al valor teórico. Esto confirma la hipótesis de que se producen pérdidas del nanorefuerzo durante el proceso de fabricación de los *nanocomposites* y demuestra la utilidad de la técnica SS HR-CS GFMS para controlar el porcentaje de nanorefuerzo en un *nanocomposite*.

Tabla III.11 Contenidos de azufre obtenidos en los nanocomposites analizados

	Determinación de S ($\mu\text{g g}^{-1}$) ^a	
	SS HR-CS GFMAS	Digestión + ICP-OES
PA+2%MoS ₂	6456±549	6299±313
PA+2%Mo ₆ S ₂ I ₈	1030±73	1003±21
PP+1.5%MoS ₂	4003±470	4205±160
PP+1.5%Mo ₆ S ₂ I ₈	424±42	437±67
PET+3%Mo ₆ S ₃ I ₆	2867±130	2903±58

^a Las incertidumbres se han obtenido como la desviación estándar con n=8 para SS HR-CS GFMAS y n=4 para digestión+ICP-OES.

Figura III.28 Comparación del contenido de nanorefuerzo teórico con el obtenido mediante SS HR-CS GFMAS e ICP-OES tras digestión



III.4.3.3 Estudio de la homogeneidad

La fuente de incertidumbre en las medidas causada por las diferencias aleatorias en la cantidad de analito en las muestras de ensayo se denomina error de muestreo. En el análisis de muestras sólidas, el mayor error de muestreo se debe a la distribución heterogénea del analito en la muestra, y esto es porque la imprecisión que se atribuye a otros factores (tales como la pesada o la variabilidad instrumental) normalmente es muy pequeña e incluso se suele

despreciar frente a la primera,^{37,38,39} tal y como se discutió en el apartado III.3.3.4 (página 182). Este hecho se ha venido considerando tradicionalmente en la literatura como una desventaja o una limitación de la SS-GFAAS. Sin embargo, puede utilizarse también para obtener información sobre la homogeneidad del material,⁴⁰ lo que puede ser especialmente interesante en el presente estudio, ya que la homogeneidad del analito (S) en el *nanocomposite* está directamente relacionada con la dispersión del nanorefuerzo en el polímero, lo que es de especial importancia en las propiedades del *nanocomposite* y, por tanto, en su desempeño final. Por otro lado, en otros métodos analíticos que conllevan la digestión previa de la muestra, la contribución de la heterogeneidad de la muestra a la imprecisión analítica no puede aislarse y por tanto no puede estudiarse.

De una forma similar al estudio de homogeneidad que se llevó a cabo para los CNTs (véase apartado III.3.3.4, página 182), en este trabajo se estudió también la homogeneidad de uno de los *nanocomposites* analizados (PA+2% Mo₆S₂I₈) para masas entorno a 1.0 mg.

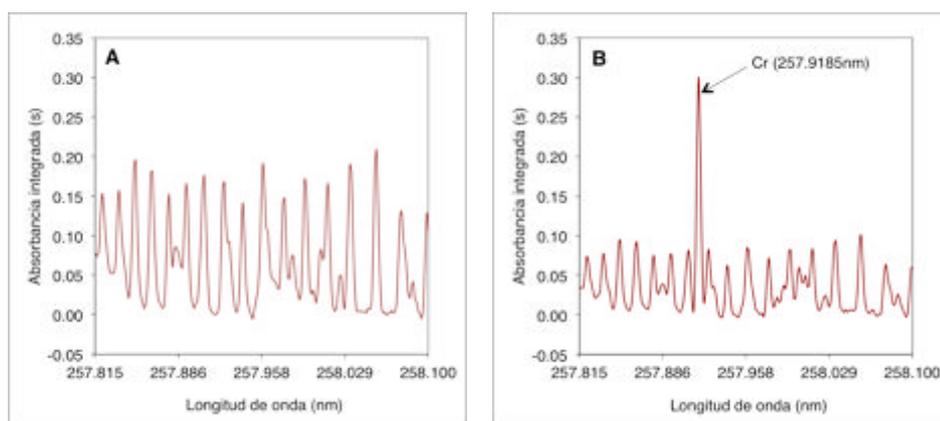
Dado que las medidas se realizaron a lo largo de diferentes días, en estas muestras se adicionó un estándar interno con el fin de poder corregir posibles variaciones de sensibilidad sin necesidad de recalibrar. Esta forma de trabajar, utilizando estándar interno, ha sido muy poco habitual en AAS por las limitaciones impuestas por el empleo de una fuente de línea, pero es factible con la instrumentación de HR-CS AAS.⁴²

Para la selección del estándar interno, se tuvo en cuenta que debía ser un elemento con una señal fácilmente medible, que tenía que aparecer dentro del espectro seleccionado para la medida de S (de 257.815 a 258.100 nm) y que además no interfiriera con la respuesta del analito. Para ello, era necesario encontrar un elemento con una línea de absorción en el rango mencionado con una sensibilidad adecuada y que no presentara solapamientos con el espectro del S.

Tras examinar los elementos con líneas en este rango, se realizaron pruebas con Cr (257.9185 nm) y Ni (257.848 nm). Finalmente, se seleccionó el Cr (5 μg) como el estándar interno más adecuado, comprobándose que la señal obtenida no presentaba solapamiento con el S y presentaba una absorbancia adecuada (véase figura III.29).

Se optimizó el programa de temperatura para poder medir CS y Cr, obteniéndose las mejores señales para una pirolisis a 1200 °C durante 30 s y una atomización/vaporización a 2600°C durante 15 s.

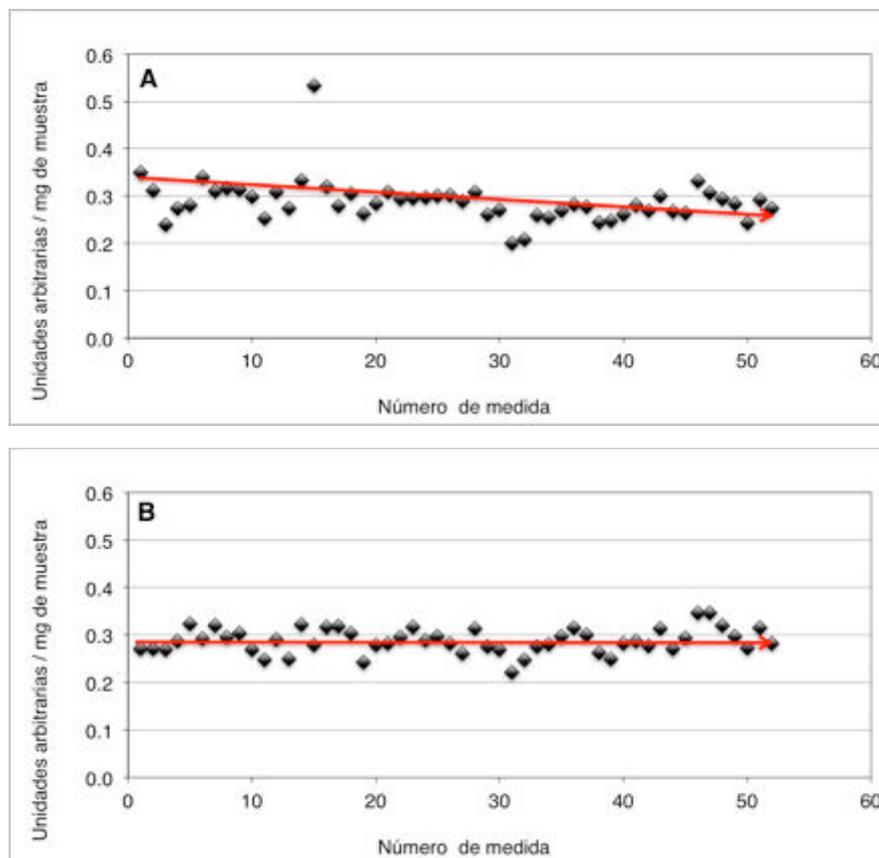
Figura III.29 Comparación del espectro de CS sin (A) y con (B) estándar interno



Para el estudio de la homogeneidad de la muestra, se realizaron 52 réplicas de la muestra PA+2%Mo₆S₂I₈ dopadas cada una de ellas con 5 μg de Cr. Se determinaron, después, las respuestas del analito y del estándar interno, y se calculó el cociente de ambas. De esta manera si se produce alguna variación en las condiciones de trabajo, ambas respuestas (la del analito y la del estándar interno) se deberían ver afectadas por igual. Por tanto, el cociente de respuestas (del analito y del estándar interno) debe depender solamente de la concentración de analito. Sin el uso de estándar interno (figura III.29A) el valor de RSD obtenido era de 15.9 %, mientras que con el uso de la señal de Cr como estándar interno (figura III.29B), la RSD disminuía hasta 9.0 %. Como se observa en la figura III.30A (página 209), la absorbancia presentaba cierta deriva con el número de medidas, además se obtenía un valor anómalo con una absorbancia por mg de muestra mayor a

0.5. En la figura III.30B se observa que el uso del estándar interno mejoró estos factores desapareciendo la deriva de la absorbancia y corrigiendo el resultado anómalo.

Figura III.30 Comparación de los valores de absorbancia de S/mg muestra sin el uso de estándar interno (A) y con el uso de estándar interno (B)



En este último caso (con estándar interno), se obtuvo un valor para la constante de homogeneidad (H_E)⁴³ (véase apartado III.3.3.4, página 182) de $6.08 \text{ mg}^{1/2}$. Esto se traduce en un valor de K_S (constante de INGAMELLS Y SWITZER⁴⁴) de 48.4 mg.

III.4.4 Conclusiones

En este estudio se desarrolló un método rápido para determinar el contenido de nanohilos de tipo MoS_2 y $\text{Mo}_x\text{S}_y\text{I}_z$ en varios tipos de *nanocomposites*. Este valor es de gran importancia en el

proceso de fabricación de estos materiales ya que condiciona su propiedades finales y, por ende, su desempeño en servicio.

En este método se han puesto en práctica las capacidades de la técnica SS HR-CS GFMAS para la determinación de especies moleculares como el S. Como ya se había mencionado en el apartado I.2.4.3 (página 30, ventajas potenciales de la HR-CS AAS frente a la AAS con fuente de línea)⁴², este elemento tiene sus líneas atómicas más sensibles en el UV lejano y no podía determinarse con la tradicional espectrometría de absorción atómica con fuente de línea. Sin embargo, la HR-CS MAS es capaz de utilizar las estrechas líneas de absorción molecular, principalmente aquellas que corresponden a transiciones rotacionales que tienen una anchura media de unos pocos picómetros, semejante al de las líneas atómicas.

El método ofreció resultados del contenido de nanorefuerzo en poco tiempo puesto que el analito se determina de un modo rápido (aproximadamente 20 minutos para una muestra, incluyendo el análisis de cinco réplicas) ya que el análisis se realiza sobre sólidos directos, lo que prácticamente no lleva preparación de muestra y usa una calibración sencilla con disoluciones acuosas. Estos resultados se validaron mediante su digestión y posterior análisis con ICP-OES.

Los resultados de contenido de refuerzo obtenidos se alejaron significativamente (entre un 2 y un 46%) de los valores teóricos marcados por el proceso de fabricación.

Finalmente, se mostró la capacidad del método para determinar la homogeneidad de uno de los *nanocomposites* analizados y se verificó la idoneidad de usar un estándar interno que eliminase variaciones de sensibilidad que se pueden producir en el transcurso de las medidas.

III.4.5 Bibliografía

1. W.D. Callister, *Introducción a la Ciencia e Ingeniería de los materiales*, Tomo II, Editorial Reverté, S.A., 1996, España.

2. J. Cuppoletti, *Nanocomposites and polymers with analytical methods*, InTech, 2011, Croacia.
3. B.S.R. Reddy, *Advances in diverse industrial applications of nanocomposites*, InTech, 2011, Croacia.
4. R.H. Baughman, A.A Zakhidov, W.A. De Heer, *Carbon nanotubes - The route toward applications*, Science, 2002, 297, 787-792.
5. G.S. Duesberg, R. Graupner, P. Downes, A.Minett, L. Ley, S. Roth, N. Nicoloso, *Hydrothermal functionalisation of single-walled carbon nanotubes*, Synthetic Metals, 2004, 142, 263-266.
6. M.J. O'Connell, S.H. Bachilo, C.B. Huffman, V.C. Moore, M.S. Strano, E.H. Haroz, K.L. Rialon, P.J. Boul, W.H. Noon, C. Kittrell, J. Ma, R.H. Hauge, R.B. Weisman, R.E. Smalley, *Band gap fluorescence from individual single-walled carbon nanotubes*, Science, 2002, 297, 593-596.
7. V. Nicolosi, D. Vrbanic, A. Mrzel, J. McCauley, S.O'Flaherty, D. Mihailovic, W. J. Blau, J. N. Coleman, *Solubility of Mo₆S_{4.5}I_{4.5} nanowires*, Chemical Physics Letters 401, 2005, 401, 13–18.
8. C.N.R. Rao, A. Govindaraj, G. Gundiah, S.R.C. Vivekchand, *Nanotubes and nanowires*, Chemical Engineering Science, 2004, 59, 4665-4671.
9. F. Fages, J.A. Wytko, J. Weiss, *Minireview: From molecular nanowires to molecular nanocables: Synthetic strategies and conducting properties*, Comptes Rendus Chimie, 2008, 11, 1241-1253.
10. D. Mihailovic, *Inorganic molecular wires: Physical and functional properties of transition metal chalcogenide polymers*, Progress in Materials Science, 2009, 54, 309-350.
11. F. Joly-Pottuz, J.M. Dassenoy, D. Martin, D. Vrbanic, A. Mrzel, D. Mihailovic, W. Vogel, G. Montagnac, *Tribological properties of*

- Mo-S-I nanowires as additive in oil*, Tribology Letters, 2005, 18, 385-393.
12. A. Hassanien, M. Tokumoto, A. Mrzel, D. Mihailovic, H. Kataura, *Structural and mechanical properties of MoS₂-I_x nanotubes and Mo₆S_xI_y nanowires*, Physica E: Low Dimensional Systems and Nanostructures, 2005, 29, 684-688.
 13. C.N.R. Rao, F.L. Deepak, G. Gundiah, A. Govindaraj, *Inorganic nanowires*, Progress in Solid State Chemistry, 2003, 31, 5–147.
 14. R. Crockett, *Smart Surfaces in Tribology: Advanced Additives and Structured Surfaces Zürich, 10-12 September 2003*, Tribology Letters, 17, 677- 680.
 15. J.K. Lancaster, *A review of the influence of environmental humidity and water on friction, lubrication and wear*, Tribology International, 1990, 23, 371-389.
 16. L. Cizaire, B. Vacher, T. Le Mogne, J.M. Martin, L.Rapoport, A. Margolin, R. Tenne, *Mechanisms of ultra-low friction by hollow inorganic fullerene-like MoS₂ nanoparticles*, Surface and Coatings Technology, 2002, 160, 282-287.
 17. L. Rapoport, Yu. Bilik, Y. Feldman, M. Homyonfer, S.R. Cohen, R.Tenne, *Hollow nanoparticles of WS₂ as potential solid-state lubricants*, Nature, 1997, 387, 791-793.
 18. M.Chhowalla, G.A.J. Amaratunga, *Thin films of fullerene-like MoS₂ nanoparticles with ultra-low friction and wear*, Nature, 2000, 407,164-167.
 19. Memoria del proyecto *Composites of Inorganic Nanotubes and Polymers (COINAPO)*. Full proposal reference Oc-2008-2-2899 for a COST new Action, 7/01/2009.
 20. X. Zhou, Y. Zhu, J. Liang and S. Yu, *New Fabrication and Mechanical Properties of Styrene-Butadiene Rubber/Carbon Nanotubes*

- Nanocomposite*, Journal of Materials Science and Technology, 2010, 26, 1127–1132.
21. J. Bian, H. Lan Lin, F. Xiong He, L. Wang, X. Wei Wei, I-Ta Chang, E. Sancaktar, *Processing and assessment of high-performance poly(butylene terephthalate) nanocomposites reinforced with microwave exfoliated graphite oxide nanosheets*, European Polymer Journal, Aceptado 23 febrero 2013.
 22. I. Goitisoló, J.I. Eguiazábal, J. Nazabal, *Structure and properties of an hybrid system based on bisphenol A polycarbonate modified by A polyamide 6/organoclay nanocomposite*, European Polymer Journal, 2008, 44 1978-1987.
 23. K. Loeschner, N. Hadrup, K. Qvortrup, A. Larsen, X. Gao, U. Vogel, A. Mortensen, H.R. Lam, E.H. Larsen, *Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate*, Particle and Fibre Toxicology, 2011, 8, Artículo Número 18.
 24. S. Ahola, M. Österberg, J. Laine, *Cellulose nanofibrils - Adsorption with poly(amideamine) epichlorohydrin studied by QCM-D and application as a paper strength additive*, Cellulose, 2008, 15, 303-314
 25. L. Bencs, O. Szakács, T. Kántor, I. Varga, G. Bozsai, *Determination of chromium, molybdenum and vanadium dopants in bismuth tellurite optical crystals by multi-element graphite furnace atomic absorption spectrometry*, Spectrochimica Acta part B, 2000, 55, 883-891.
 26. L. Rello, A.C. Lapeña, M. Aramendía, M.A. Belarra, M. Resano, *A dried urine spot test to simultaneously monitor Mo and Ti levels using solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry*, Spectrochimica Acta Part B, 2013, 81, 11-19.

27. F.R. de Amorim, M.B. Franco, C.C. Nascentes, J.B.B. da Silva, *Direct determination of molybdenum in milk and infant food samples using slurry sampling and graphite furnace atomic absorption spectrometry*, Food Analytical Methods, 2011, 4, 41-48.
28. M. Resano, M.R. Flórez, *Direct determination of sulfur in solid samples by means of high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry using palladium nanoparticles as chemical modifier*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2012, 27, 401-412.
29. G. Baumbach, T. Limburg, J. W. Einax, *Quantitative determination of sulfur by high-resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry*, Microchemical Journal, 2013, 106, 295-299.
30. Z. Kowalewska, *Feasibility of high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry in flame and furnace for sulphur determination in petroleum products*, Spectrochimica Acta Part B, 2011, 66, 546-556.
31. R. Mior, S. Morés, B. Welz, E. Carasek, J.B. de Andrade, *Determination of sulfur in coal using direct solid sampling and high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry of the CS molecule in a graphite furnace*, Talanta, 2013, (Artículo en prensa) .
32. G. Jim, D. Katskov, P. Tittarelli, *Sulfur determination in coal using molecular absorption in graphite filter vaporizer*, Talanta, 2011, 83, 1687-1694.
33. M. D. Huang, H. Becker-Ross, S. Florek, U. Heitmann, M. Okruss, *Direct determination of total sulfur in wine using a continuum-source atomic-absorption spectrometer and an air-acetylene flame*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2005, 382, 1877-1881.
34. M. D. Huang, H. Becker-Ross, S. Florek, U. Heitmann y M. Okruss, *Determination of sulfur by molecular absorption of carbon monosulfide using a high-resolution continuum source absorption spectrometer and an air-acetylene flame*, Spectrochimica Acta Part B, 2006, 61, 181-188.

35. M. D. Huang, H. Becker-Ross, S. Florek, U. Heitmann, M. Okruss, C. D. Patz, *Determination of sulfur forms in wine including free and total sulfur dioxide based on molecular absorption of carbon monosulfide in the air-acetylene flame*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008, 390, 361–367.
36. U. Heitmann, H. Becker-Ross, S. Florek, M. D. Huang, M. Okruss, *Determination of non-metals via molecular absorption using high-resolution continuum source absorption spectrometry and graphite furnace atomization*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2006, 21, 1314-1320.
37. A. Virgilio, J. L. Raposo, Jr, A. A. Cardoso, J. A. Nóbrega, J. A. Gomes Neto, *Determination of total sulfur in agricultural samples by high-resolution continuum source flame molecular absorption spectrometry*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59, 2197-2201.
38. A. Baysal, S. Akman, *A practical method for the determination of sulphur in coal samples by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry*, Talanta, 2011, 85, 2662-2665.
39. C.S. Nomura, C.S. Silva, A.R.A. Nogueira, P.V. Oliveira, *Bovine liver sample preparation and micro-homogeneity study for Cu and Zn determination by solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry*, Spectrochimica Acta Part B, 2005, 60, 673-680.
40. M.A. Belarra, M. Resano, J.R. Castillo, *Discrimination of the causes of imprecision in the direct determination of metals in organic solid samples by electrothermal atomization atomic absorption spectrometry*, Journal of Analytical Spectrometry, 1998, 13, 489-494.
41. J.F. Rêgo, A. Virgilio, J.A. Nóbrega, J.A.G. Neto, *Determination of lead in medicinal plants by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry using direct solid sampling*, Talanta, 2012, 100, 21-26.

42. M. Resano, L. Rello, M. Flórez, M.A. Belarra, *On the possibilities of high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for the simultaneous or sequential monitoring of multiple atomic lines*, Spectrochimica Acta Part B, 2011, 66, 321-327.
43. U. Kurfürst, *Solid Sample Analysis*, Springer-Verlag, 1998, Alemania.
44. C.O. Ingamells, P. Switzer, *A proposed sampling constant for use in geochemical analysis*, Talanta, 1973, 20, 547-568.
45. B. Welz, S. Morés, E. Carasek, M.G.R. Vale, M. Okruss, H. Becker-Ross, *High-resolution continuum source atomic and molecular absorption spectrometry - A review*, Applied Spectroscopy Reviews 2010, 45, 327-354.

Capítulo IV.

Conclusiones

“One worthwhile task carried to a successful conclusion is worth half-a-hundred half-finished tasks”

Malcom S. Forbes

El objetivo general de esta tesis doctoral era el desarrollo de métodos de análisis directo para la determinación de nanopartículas y el análisis directo de nanomateriales mediante espectrometría de absorción atómica. El trabajo tenía también como objetivo investigar algunas de las nuevas capacidades de la técnica de SS HR-CS GFAAS que podían ser especialmente interesantes en el análisis de dichos materiales.

De los resultados obtenidos se extraen las siguientes conclusiones, resumen de las enunciadas con mayor extensión en los apartados III.1.4 (página 131), III.2.4 (página 158), III.3.4 (página 187) y III.4.4 (página 209):

1. Desde un punto de vista aplicado, cabe resaltar que en todos los casos estudiados, fue posible desarrollar métodos para el análisis directo de nanomateriales (sílice nanoestructurada, nanotubos de carbono o *nanocomposites*) o la determinación de nanopartículas en tejidos biológicos, que permiten obtener resultados suficientemente exactos (típicamente dentro de un 10%) de forma rápida y sencilla, empleando patrones acuosos para el calibrado. Asimismo, los métodos desarrollados han permitido determinar elementos en los diferentes niveles de concentración en que se encontraban presentes en las muestras (desde pg a μg) y los límites de detección obtenidos cumplen adecuadamente con los requisitos legales, caso de existir (sílice nanoestructurada).
2. Desde un punto de vista técnico, han quedado patentes las ventajas de la nueva técnica de HR CS AAS en el contexto evaluado. En concreto, se han demostrado las siguientes ventajas:
 - a) El potencial para la detección y corrección de interferencias espectrales de esta técnica es muy superior, permitiendo solucionar el solapamiento espectral debido a la señal de PO y obtener resultados exactos para el Au en

muestras de cerebro de ratón, a pesar del bajo nivel del analito en las citadas muestras (300 ng g^{-1}).

- b) La posibilidad de acceder a todos los píxeles del detector ha permitido la determinación multielemental simultánea de nanotubos de carbono. En concreto, se determinaron, por un lado, Co, Fe, Ni y Pb, y, por otro, Al y Cr. Asimismo, el empleo de píxeles laterales permitió adecuar la sensibilidad al contenido de los analitos en las muestras de forma sencilla.
- c) Por último, la posibilidad de acceder a transiciones moleculares permitió la cuantificación de las nanopartículas presentes en los *nanocomposites*, dado que todas ellas contenían S. En este caso, el empleo de un estándar interno (Cr) demostró ser eficaz para corregir variaciones de medida entre sesiones sin necesidad de recurrir a recalibrados frecuentes, lo que puede ser interesante para obtener valores de inhomogeneidad fiables.

Anexo I

Principales normas relativas a conceptos generales y aspectos de seguridad en el trabajo con nanomateriales

Norma	Título
Normas UNE	
EN ISO 10801:2010	Nanotechnologies. Generation of metal nanoparticles for inhalation toxicity testing using the evaporation/condensation method.
EN ISO 10808:2010	Nanotechnologies. Characterization of nanoparticles in inhalation exposure chambers for inhalation toxicity testing.
UNE-ISO/TR 12885:2010 IN	Nanotecnologías. Prácticas de seguridad y salud en lugares de trabajo relacionados con las nanotecnologías.
UNE- ISO/TS 27687:2010	Nanotecnologías. Terminología y definiciones para nano-objetos. Nanopartícula, nanofibra y nanoplaca.
Normas ISO	
ISO/TR 11360:2010	Nanotechnologies. Methodology for the classification and categorization of nanomaterials
ISO/TR 11811:2012	Nanotechnologies. Guidance on methods for nano- and microtribology measurements.
ISO/TS 12805:2011	Nanotechnologies. Materials specifications. Guidance on specifying nano-objects.
ISO/TS 12901-1:2012	Nanotechnologies. Occupational risk management applied to engineered nanomaterials. Part 1: Principles and approaches.
ISO/TR 14187:2011	Surface chemical analysis. Characterization of nanostructured materials.
ISO/TR 27628:2007	Workplace atmospheres. Ultrafine, nanoparticle and nanostructured aerosols. Inhalation exposure characterization and assessment.
ISO/TS 27687:2008	Nanotechnologies. Terminology and definitions for nano-objects. Nanoparticle, nanofibre and nanoplate.
ISO/TS 80004-3:2010	Nanotechnologies. Vocabulary. Part 3: Carbon nano-objects.
ISO/TS 80004-4:2011	Nanotechnologies. Vocabulary. Part 4: Nanostructured materials.
ISO/TS 80004-5:2011	Nanotechnologies. Vocabulary. Part 5: Nano/bio interface.
ASTM	
ASTM E2456-06(2012)	Standard Terminology Relating to Nanotechnology.
ASTM E2909-13	Standard Guide for Investigation/Study/Assay Tab-Delimited Format for Nanotechnologies.

