

DETERMINACIÓN DE PLATA EN MUESTRAS BIOLÓGICAS MEDIANTE TÉCNICAS DE ESPECTROMETRÍA ATÓMICA

Trabajo Fin de Grado

Lorena Grima Soriano



Universidad Zaragoza

Director: Francisco Laborda García

Departamento de Química Analítica

Grupo de Espectroscopía Analítica y Sensores (GEAS)

Resumen

La plata, debido a sus propiedades biocidas, está siendo utilizada, fundamentalmente en forma de nanopartículas metálicas, en distintos campos, tales como en la industria textil, medicina electrodomésticos, así como en la purificación de aguas. Debido a que las nanopartículas de plata pueden ser potencialmente tóxicas para distintos organismos, es necesario estudiar los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción de las mismas, en distintos organismos. La primera fase de cualquiera de estos estudios implica conocer la concentración total del elemento en distintos tipos de muestras biológicas.

El principal objetivo de este trabajo es la determinación de plata en muestras biológicas mediante técnicas de espectroscopía atómica, basadas en atomización electrotérmica en horno de grafito. El trabajo incluye la optimización de los parámetros instrumentales y el uso de paladio como modificador químico, para favorecer la estabilidad térmica de la plata en el horno de grafito.

Frente a los procedimientos convencionales de preparación de muestras biológicas para análisis de metales, basados en digestiones ácidas, en el presente trabajo se va a llevar a cabo una digestión alcalina con hidróxido de tetrametilamonio (TMAH). La ventaja del uso de TMAH es que mantiene la integridad de las nanopartículas de plata que pudieran estar presentes en las muestras, lo que permitiría su determinación selectiva mediante el uso de las técnicas adecuadas.

El método desarrollado se aplicó al análisis de un material de referencia certificado de tipo biológico, obteniéndose unos resultados coherentes con el valor certificado, por lo que se consideró que el procedimiento empleado era perfectamente válido, para la determinación de plata en tejidos biológicos.

Abstract

Due to its biocidal properties, silver is been used, mainly in the form of metallic nanoparticles, in differents fields such as textile industry, medicine, household electrical appliances, as well as water purification. Owing to the fact that silver nanoparticles may be potentially toxic for certain living organism, it is mandatory to study its absorption, metabolism and excretion processes in different living organisms. The first stage of any of these studies implies knowing the total concentration of this element in the biological samples involved.

The main aim of this research is to determinate the amount of silver in biological samples by electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS). The study involves both instrumental parameters optimization and the use of palladium as chemical modifier, in order to improve thermal stability of silver in graphite furnace.

Convencional procedures for the determination of metal in biological samples preparation for metal analysis are based on acid digestions. In this study samples were digested in alkaline medium by using tetramethylammonium hydroxide (TMAH). An advantage of using TMAH is its ability to preserve silver nanoparticles integrity in case that nanoparticles may be present in the samples, which would allow its selective determination by using suitable techniques.

The developed method was applied to the analysis of a biological certified reference material, obtaining results in accordance with the certified value. Due to this fact, this procedement was found to be considered as a valid method for silver determination in biological tissues.

| <i>Contenidos</i> | <i>Páginas</i> |
|--|-----------------------|
| ➤ Introducción..... | 1 |
| • Interés y consecuencias del uso de especies de Plata..... | 1 |
| • Técnicas de espectrometría atómica para la determinación de plata..... | 1 |
| • Espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica... | 2 |
| • Puesta en disolución de las especies de Plata..... | 5 |
| ➤ Objetivos..... | 6 |
| ➤ Parte experimental..... | 7 |
| • Instrumentación..... | 7 |
| • Aparatos..... | 7 |
| • Material..... | 7 |
| • Reactivos y patrones..... | 7 |
| • Material de referencia (DOLT-4)..... | 8 |
| • Disoluciones..... | 8 |
| • Procedimientos..... | 8 |
| ➤ Resultados y discusión..... | 10 |
| • Optimización de la determinación de plata mediante ETAAS..... | 10 |
| • Determinación de plata en medio de TMAH..... | 14 |
| • Prestaciones analíticas del método para la determinación de plata mediante ETAAS..... | 15 |
| • Validación del método: Análisis de DOLT-4..... | 17 |
| • Determinación de plata en forma de nanopartículas mediante ETAAS... | 19 |
| ➤ Conclusiones..... | 22 |
| ➤ Agradecimientos..... | 22 |
| ➤ Referencias..... | 23 |

1.- Introducción

1.1.- Interés y consecuencias del uso de especies de Plata

El creciente interés por los nanomateriales está convirtiendo a las nanopartículas de plata (AgNPs) en el nanomaterial más utilizado actualmente, debido a sus propiedades antimicrobianas.

La plata en su forma iónica tiene efectos tóxicos para muchos agentes patógenos, incluyendo bacterias, virus y hongos, pero presenta una toxicidad relativamente baja sobre los seres humanos, por este motivo la plata se ha utilizado en un gran número de aplicaciones médicas.

Los estudios realizados parecen indicar que la toxicidad de la plata puede provenir tanto de las propiedades específicas de las nanopartículas, como de los efectos de los iones plata que se liberan desde las mismas. Existen pruebas que demuestran que las nanopartículas de plata pueden dañar directamente las membranas de las células bacterianas, interaccionando con ellas y penetrando en el interior de la célula¹.

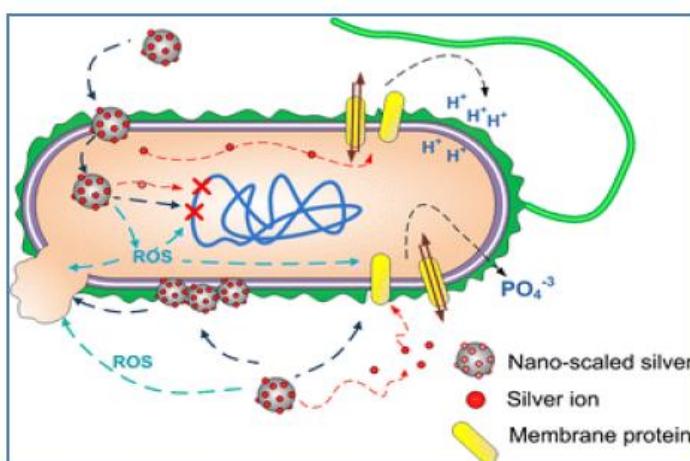


Figura 1. Diagrama resumen de la interacción de nanopartículas de plata con células bacterianas. AgNPs pueden (1) liberar iones plata y generas ROS; (2) interaccionar con proteínas de la membrana afectando a su función correcta; (3) acumularse en la membrana celular afectando a la permeabilidad de la membrana; y (4) entrar en la célula donde pueden generar ROS, liberar iones plata, y afectar al DNA. Las ROS generadas también pueden afectar al DNA, a la membrana de la célula, y a las proteínas de membrana; los iones plata liberados afectarán probablemente al DNA y a las proteínas de membrana.

1.2.- Técnicas de espectrometría atómica para la determinación de plata.

Debido al interés que despiertan tanto las nanopartículas de plata como los iones del mismo elemento, resulta imprescindible desarrollar métodos que permitan su detección incluso a concentraciones muy pequeñas.

Entre las técnicas de cuantificación que se emplean para ello destacan la espectrometría de emisión atómica mediante plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES) y la espectrometría de

masas con plasma de acoplamiento inductivo^{2, 3} (ICP-MS). La velocidad, precisión, sensibilidad y el amplio rango lineal les convierten en las técnicas más populares en la determinación de elementos traza. Frente a estas técnicas de análisis multielemental, otra de las técnicas más empleadas para estas determinaciones es la espectrometría de absorción atómica de atomización electrotérmica ^{4, 5}(ETAAS), que presenta unos límites de detección entre el ICP-AES y el ICP-MS, con unos costes inferiores. Por otro lado, a pesar de ser una técnica monoelemental, esto no es una limitación cuando estamos interesados en determinar un único elemento, situación habitual en estudios de nanotoxicidad.

En el presente trabajo, hemos empleado la técnica de absorción basada en la atomización electrotérmica. Esta técnica nos permite la determinación de la plata total presente en las muestras analizadas.

1.3.- Espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica

La espectrometría de absorción atómica es una técnica de análisis basada en la capacidad que ejerce una fuente de luz externa, al generar una promoción de los electrones situados en niveles energéticos atómicos fundamentales a otros niveles de mayor energía, durante un período corto de tiempo. Cada átomo tiene su propio diagrama de niveles por lo que las energías de los estados excitados de cada átomo son predecibles y diferentes. En dicha técnica se adquiere información relacionada con el analito al medir la radiación electromagnética absorbida como resultado de la excitación⁶.

El proceso por el cual la muestra se convierte en un vapor atómico se denomina atomización. La precisión y exactitud de los métodos atómicos dependen en gran medida de esta etapa. Existen varias formas diferentes de atomizar nuestro analito presente en una muestra pero en nuestro trabajo nos vamos a centrar en la técnica basada en la **atomización electrotérmica mediante horno de grafito (ETAAS)**.

El horno de grafito posee tres componentes principales, el atomizador, la fuente de alimentación, y el programa. El atomizador se encuentra en el compartimento de muestreo del espectrómetro de absorción atómica, donde el analito sufre la atomización y ocurre la absorción de luz. La fuente de alimentación controla los flujos de energía y de gas en el atomizador bajo la dirección del programa, que generalmente está integrado en la fuente de alimentación o del espectrómetro.

Un atomizador básico de horno de grafito se compone de los siguientes componentes:

- Tubo de grafito
- Contactos eléctricos
- Circuito cerrado de agua refrigerante
- Controles de purga de gas inerte

El tubo de grafito es normalmente el elemento de calentamiento del horno de grafito. El tubo, que posee forma cilíndrica, está alineado horizontalmente en el camino óptico del espectrómetro. Se miden unos pocos microlitros de muestra (5-50) que se introducen al tubo a través de un agujero en el centro de la pared del mismo, ocupando la pared interior del tubo o una plataforma de grafito.

El tubo se mantiene en su lugar entre dos cilindros de contacto de grafito, que proporcionan conexión eléctrica. Un potencial eléctrico aplicado a los contactos hace que la corriente fluya a través del tubo, cuyo efecto es el calentamiento del tubo y la muestra. Unas ventanas en cada extremo de la carcasa permiten que la luz pase a través del tubo. El grafito está protegido de la oxidación del aire por las ventanas y el flujo de argón⁷.

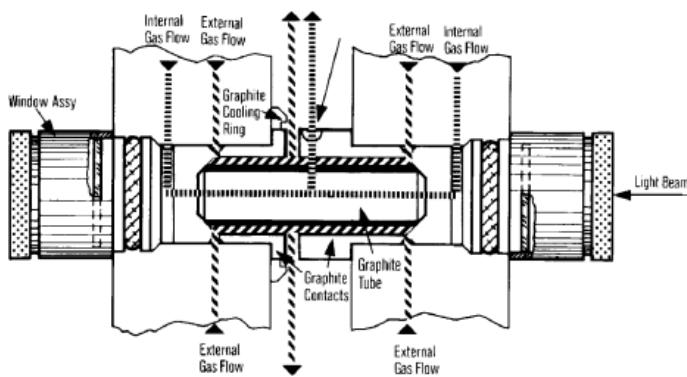


Figura 2. Atomizador con horno de grafito con calentamiento longitudinal.

En ETAAS el proceso de formación de los átomos se realiza en tres etapas, de temperaturas crecientes: Secado, calcinación y atomización. Posteriormente a ellas se añade una etapa adicional de limpieza:

- Secado: Su finalidad es la eliminación del disolvente que acompaña a nuestro analito, esta etapa controla la precisión de la determinación y depende del disolvente y del volumen de muestra inyectada.
- Calcinación: En esta etapa se elimina la matriz de la muestra y depende de las características de la misma.
- Atomización: Esta etapa ha de ser rápida, en esta etapa se atomiza el analito, por lo que su temperatura optima dependerá de la naturaleza del mismo.
- Limpieza: Esta etapa pretende eliminar restos de muestra y analito que hayan podido quedar para no incorporar errores en medidas posteriores. Se produce a una temperatura mayor que la atomización y es una etapa rápida.

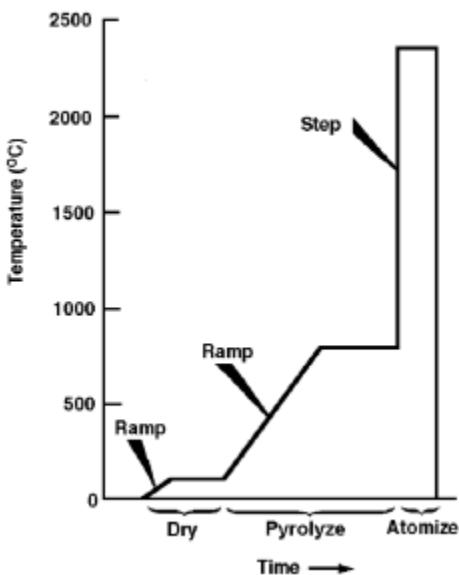


Figura 3. Programa de temperaturas en ETAAS.

Aplicaciones de ETAAS.

Los avances en la instrumentación y en las técnicas han hecho posible el análisis de matrices de muestras muy complejas, como las que se encuentran con frecuencia en las muestras biológicas y geológicas.

El tamaño de las muestras que permite emplear la ETAAS ofrece beneficios adicionales en ocasiones en las que la cantidad de muestra disponible para el análisis es limitada, como ocurre en numerosos análisis clínicos, igual que para aplicaciones medioambientales para las que la sensibilidad requerida es del nivel de $\mu\text{g L}^{-1}$ para la mayoría de los elementos.

En el presente estudio se empleo la técnica descrita para el análisis de tejidos biológicos.

Análisis de materiales biológicos por ETAAS

Este tipo de materiales engloba a un conjunto heterogéneo de muestras tales como, tejidos, sangre, sueros. La utilización de ETAAS para el análisis elemental de este tipo de muestras resulta muy ventajosa ya que en ocasiones la cantidad disponible de muestra es bastante limitada y algunas de las muestras pueden ser analizadas directamente sin ningún tratamiento previo de digestión. De esta forma se pueden evitar algunos de los inconvenientes asociados a la puesta en disolución de la muestra como el riesgo de contaminación, la dilución o la pérdida del analito. No obstante, en ocasiones es necesario y recomendable un tratamiento de digestión previo para mitigar los efectos negativos de la matriz en el análisis.

Entre los analitos que se han determinado en muestras biológicas mediante espectroscopía de atomización electrotérmica se pueden destacar Mn, Zn, Cd, Pb, Ag, Au y Pt

1.4.- Puesta en disolución de las especies de Plata

La forma habitual de poner en disolución la plata presente en muestras biológicas consiste en llevar a cabo una digestión ácida con un disolvente tal como el HNO₃ concentrado. En cambio en el presente trabajo se va a llevar a cabo una digestión alcalina, con TMAH, como alternativa al ataque ácido comúnmente empleado, la ventaja que presenta esta digestión alcalina radica en la posibilidad que ofrece de mantener las nanopartículas de plata en su forma nanoparticulada, lo que no se consigue al llevar a cabo una digestión ácida.

El TMAH es un reactivo eficiente para solubilizar la materia orgánica, este reactivo provoca la ruptura hidrolítica y la metilación de enlaces éster, amida y algunos enlaces éter. La reacción del TMAH con el tejido animal es perceptible por la formación de espumas, la viscosidad y el olor que recuerda a una reacción de esterificación⁸.

Por ser el TMAH una base fuerte se va a producir la precipitación de la plata al estar en medio altamente básico, para evitar esto y conservar la plata presente en disolución, se utiliza un complejante, que en nuestro caso será cisteína.

Para realizar esta puesta en disolución, se toma como procedimiento el empleado en ensayos de solubilización de muestras de ratones, que habían sido alimentados con nanopartículas de plata durante cierto periodo de tiempo¹.

2.- Objetivos y planteamiento del trabajo

Los objetivos del trabajo son:

1. Desarrollar un método para la determinación de plata total en muestras biológicas, mediante espectrometría de absorción atómica de atomización electrotérmica con horno de grafito, independientemente de la forma en la que se encuentre la plata en la muestra, Ag (I) o nanopartículas de plata metálica.
2. Aplicar un procedimiento de digestión de muestras biológicas para la determinación de plata basado en la digestión alcalina mediante hidróxido de tetrametilamonio a temperatura ambiente, en lugar de los procedimientos convencionales basados en la digestión con ácidos oxidantes a elevadas temperaturas.
3. Evaluar las prestaciones analíticas del método desarrollado.
4. Aplicar el procedimiento de digestión y de determinación de plata total a un material de referencia certificado para su validación

3.- Parte experimental

En este apartado describiremos tanto la instrumentación utilizada, los aparatos y el material así como las disoluciones empleadas para llevar a cabo las medidas, los volúmenes inyectados en el tubo de grafito de igual modo que el procedimiento de digestión de una muestra certificada.

3.1.- Instrumentación

- Balanza Analítica AND GH-200 con precisión de $\pm 0,1$ mg.
- Espectrofotómetro de absorción atómica PerkinElmer Model AAnalyst™ 300 equipado con atomizador electrotérmico HGA®-800 y muestrador automático AS-72.
La plata se midió a una longitud de onda de 328,1 nm. El ancho de banda espectral era de 0,7 nm y la corriente de la lámpara de cátodo hueco de 10 mA. Se emplearon tubos de grafito pirolítico con plataformas de L`vov. Se empleó la lámpara de Deuterio como corrección de fondo.

3.2.- Aparatos

- Centrífuga de sobremesa Thermo Scientific Heraeus Multifuge X1R.
- Baño de Ultrasonidos Ultrasons-P Selecta.
- Micropipetas Biohit 5-50 μl , 50-200 μl y 200-1000 μl .

3.3.- Material

- Tubos tipo Falcon de polipropileno de 50 ml y de 15 ml (cónico).
Estos tubos se dejaron en un baño de HNO_3 al 10 % (v/v) durante al menos 24 horas. Posteriormente se lavaron con agua ultrapura y se dejaron secar en estufa a una temperatura de unos 60 °C, dejándose enfriar antes de su utilización.
- Vidrios de reloj

3.4.- Reactivos y patrones

- Agua ultrapura (Milli-Q Advantage, Molsheim, Francia).
- HNO_3 69,0-70,0% (m/m) (J. T. Baker).
- TMAH (Alfa Aesar 25% m/m).
- L-cisteína (Aldrich).
- Triton™ X-100 (Aldrich).
- Disolución patrón Ag (I) 1000 mg L^{-1} (Sigma Aldrich, Suiza).
- Disolución patrón Pd 10.0 ± 0.2 g L^{-1} $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2 / \text{HNO}_3$ 15% (Merck Millipore).
- Suspensión de nanopartículas de Ag 20 mg L^{-1} , diámetro de las nanopartículas 100 nm (nanoComposix, San Diego).

3.5.- Material de referencia (DOLT-4)

El DOLT-4 es un material de referencia certificado de hígado de cazón. El contenido en Ag de este CRM es de $0,93 \pm 0,07$ mg/kg. En el Anexo I se presenta su certificado de análisis.

3.6.- Disoluciones

Todas las disoluciones de estándares se prepararon por pesada.

- Disolución de Ag (I) 10 mg L^{-1} en HNO_3 al 1% (v/v) a partir de la disolución patrón de 1000 mg L^{-1} .
- Disolución de Ag (I) 1 mg L^{-1} en HNO_3 al 1% (v/v) a partir de la disolución anterior.
- Disoluciones de Ag(I) $10 \mu\text{g L}^{-1}$ en:
 - ✓ HNO_3 al 1% (v/v).
 - ✓ H_2O ultrapura.
 - ✓ Medio de digestión.
- Suspensiones de nanopartículas de plata metálica $10 \mu\text{g L}^{-1}$ en:
 - ✓ H_2O ultrapura.
 - ✓ Medio de digestión.
- Disolución de HNO_3 al 1% (v/v) a partir de HNO_3 concentrado.
- Disolución de Pd 2000 mg L^{-1} .
- Cisteína 0,5% (m/m).
- Tritón X-100 al 10% (v/v).
- Tritón X-100 al 0,05% (v/v).
- Medio de digestión cuya composición final es: TMAH 5 % (v/v), Cisteína 0,1 % (m/v) y Tritón 0,05 % (v/v).

3.7.- Procedimientos

3.7.1.- Volúmenes de inyección en el tubo de grafito.

Se procedió de tal modo que el volumen total inyectado en el tubo de grafito fuera de $20 \mu\text{L}$, de modo que inyectáramos volúmenes variables tanto de patrón como de muestra hasta $10 \mu\text{l}$, volúmenes variables de modificador hasta $5 \mu\text{l}$ y los $5 \mu\text{l}$ restantes para realizar adiciones de patrón a la muestra. Los volúmenes no inyectados de patrón o de modificador se completaban con disolución de blanco.

Por ejemplo:

- Para realizar la medida de rutina de un patrón de Ag (I) de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ se tomaron:
 - 10 μL de las disolución patrón
 - 5 μL de modificador de matriz.
 - 5 μL restantes de disolución de blanco.

Del mismo modo se procedió para el análisis de los ataques pero en este caso los 10 μL inyectados eran de disolución diluida de ataque.

- A la hora de llevar a cabo las rectas de calibrado se procedió de tal modo que:
El volumen total de inyección fuera siempre de 20 μl y el volumen inyectado de modificador químico fuera de 5 μl . Se inyectaron volúmenes crecientes de la disolución patrón de Ag (I) de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de tal modo que inyectáramos cantidades crecientes en un rango de 0,03 a 0,15 ng de plata y se completaba con la cantidad necesaria de medio de digestión hasta alcanzar los 20 μl totales.

3.7.2.- Procedimiento de digestión.

Los pasos a seguir para llevar a cabo la digestión en medio básico fueron:

- Pesar 100 mg de DOLT-4, en un tubo Falcon de 15 mL.
- Añadir 2 mL de TMAH 25% (m/m) y 400 μL de cisteína 0,5% (m/m).
- Dejar agitando 24h.
- Diluir añadiendo 2 mL de cisteína 0,5% (m/m) y hasta 10 mL con Tritón 0,05% (v/v).
- Agitar durante 15 minutos.
- Se centrifuga a 3000 rpm 15 minutos.

También se siguió este procedimiento para obtener las disoluciones empleadas como blancos de método, con la única diferencia de que en este caso no se añadieron los 100 mg de CRM.

De este modo el medio final en el que queda la muestra, como ya hemos comentado, es TMAH 5 %, Cisteína 0,1 % y Tritón 0,05 %.

3.7.3.- Determinación de la humedad presente en la muestra.

Para realizar el cálculo de la cantidad de plata presente en la muestra certificada DOLT-4 debemos llevar a cabo un estudio de la humedad presente en la muestra procediendo del modo indicado en el apartado 4.7.3.

Inicialmente se calentó un vidrio de reloj a una temperatura de 105°C en la estufa durante 1h, repitiéndose el proceso hasta pesada constante, repitiéndose el proceso con 150 mg muestra de DOLT-4 para determinar el contenido en agua de la muestra por diferencia de pesadas. Obtuvimos que la humedad de la muestra de DOLT-4 era de un 4%.

4.- Resultados y discusión

4.1.- Optimización de la determinación de plata mediante ETAAS.

La espectroscopía de absorción atómica por atomización electrotérmica ha sido ampliamente utilizada en la determinación de numerosos metales. Pero dicha determinación requiere un estudio previo de forma que se obtengan las condiciones que permitan obtener los mejores resultados posibles.

Los principales aspectos que requieren un estudio de optimización son el programa de temperaturas y si la determinación requiere el empleo de modificantes químicos o no y en caso afirmativo, cuál sería la cantidad del mismo que deberíamos utilizar.

Esta optimización se llevó a cabo en ácido nítrico al 1% (v/v) que es uno de los diluyentes más empleados para la puesta en disolución de la plata metálica.

4.1.1.- Programa de temperaturas.

Uno de los factores a tener en cuenta a la hora de llevar a cabo un análisis mediante atomización electrotérmica consiste en conocer las temperaturas óptimas de calcinación y atomización, obteniendo de este modo las mejores medidas posibles. Por esta razón el primer paso a realizar en este trabajo experimental consiste en encontrar dichas temperaturas, para ello se realizan las denominadas curvas de calcinación y atomización.

Curva de calcinación:

Consiste en, manteniendo constante la temperatura de atomización en una temperatura considerada previamente adecuada, que en nuestro caso será de 2000°C, realizar un barrido de temperaturas de calcinación, registrando los valores de absorbancia integrada obtenidos y representándolos en una gráfica señal vs temperatura.

Curva de atomización:

La idea subyacente es fundamentalmente la misma que en la realización de la curva de calcinación pero en este caso es la temperatura de calcinación la que se mantiene fija, en la temperatura que hemos señalado como óptima y se hace un barrido de temperaturas de atomización, en este caso se persigue el encontrar una temperatura que permita que la señal no se vea modificada de un modo significativo si se producen pequeñas variaciones en la temperatura de atomización y los picos de absorbancia obtenidos tengan una forma adecuada para poder llevar a cabo la integración de la señal como el área del pico obtenido.

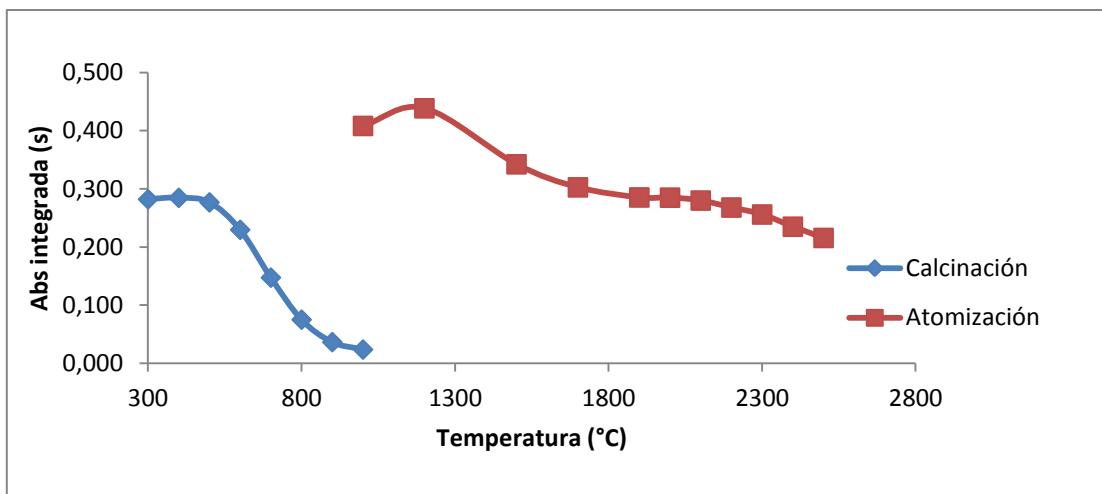


Figura 4. Curvas de calcinación y atomización. Masa de Ag inyectada 0,1 ng. HNO_3 1% (v/v).

Para determinar las temperaturas óptimas de calcinación y atomización no solo es importante la señal integrada obtenida y los perfiles de las curvas de atomización y calcinación sino que también debemos prestar especial interés a la forma de los picos de absorbancia, ya que podemos encontrar casos en los que el pico sea demasiado ancho o incluso no llegue a cerrarse, o se obtengan picos cuya integración sea de dudosa validez.

Las temperaturas óptimas de calcinación y atomización fueron respectivamente 400 y 2000°C y el programa óptimo de temperaturas se presenta en la tabla 1.

Tabla 1. Programa de temperaturas óptimo en HNO_3 .

| Etapa | Temperatura(°C) | Rampa(s) | Estancia (s) | Flujo de gas ($mL\ min^{-1}$) |
|-------------|-----------------|----------|--------------|---------------------------------|
| Secado | 150 | 15 | 20 | 250 |
| Calcinación | 400 | 10 | 40 | 250 |
| Atomización | 2000 | 0 | 5 | 0 |
| Limpieza | 2500 | 1 | 3 | 250 |

4.1.2.- Optimización de la cantidad de modificador químico.

Los modificantes son compuestos que se añaden tanto a la muestra como a los patrones para evitar pérdidas de analitos volátiles en la etapa de calcinación y así poder trabajar a temperaturas mayores de calcinación, o para modificar la composición química de la matriz y así separar el analito de posibles interferencias.

Por este motivo, el paso siguiente consistió en optimizar la cantidad de modificador químico que permitía trabajar a las mayores temperaturas de calcinación. El modificador químico que se empleó en el análisis fue el paladio, debido a su capacidad de retener la plata en la etapa de calcinación, retardando la volatilización de la misma, permitiéndonos de este modo trabajar con una temperatura de calcinación mayor.

Se estudió como variaba la temperatura máxima de calcinación con la masa de Pd añadido, obteniendo las curvas de calcinación de la figura 5.

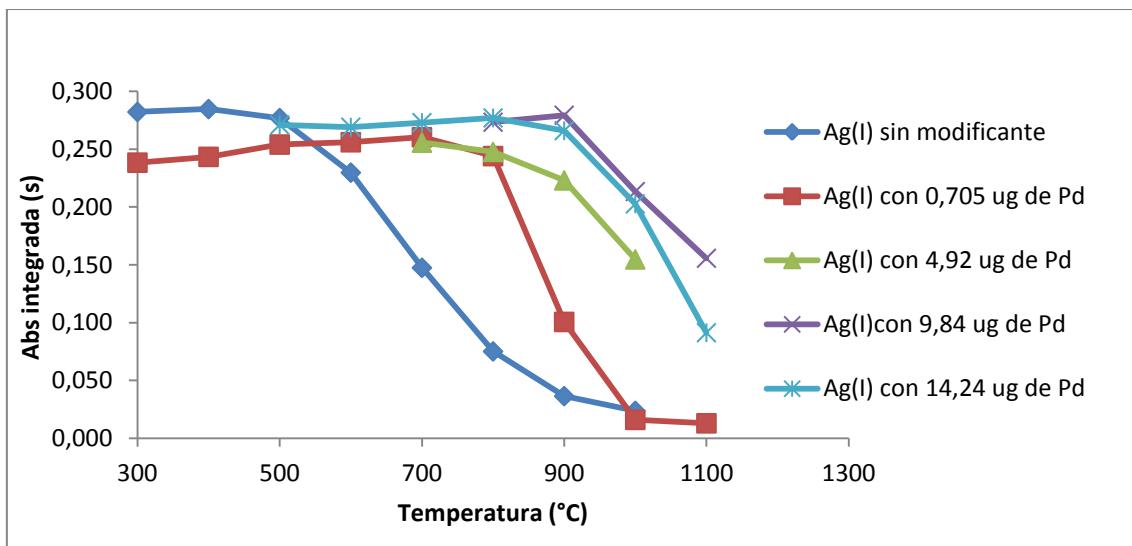


Figura 5. Curvas de calcinación obtenidas para diferentes cantidades de modificador químico (en μg) inyectado. T^{a} de atomización 2000°C . Masa de Ag inyectada $0,1 \text{ ng} \cdot \text{HNO}_3 1\% (\text{v/v})$.

En la figura 5 se puede observar que existe una relación entre la cantidad de paladio inyectado y la temperatura de calcinación a la que podemos trabajar.

En la figura 6 podemos ver que no se observa un incremento significativo de señal por encima de $10 \mu\text{g}$ por lo que consideramos que aumentar la masa de Pd por encima de esa masa ya no genera un beneficio directo en la señal integrada obtenida.

Según los resultados que se exponen en las figuras 5 y 6 la cantidad óptima de Pd a inyectar, trabajando en un medio de HNO_3 al 1% sería de $10 \mu\text{g}$.

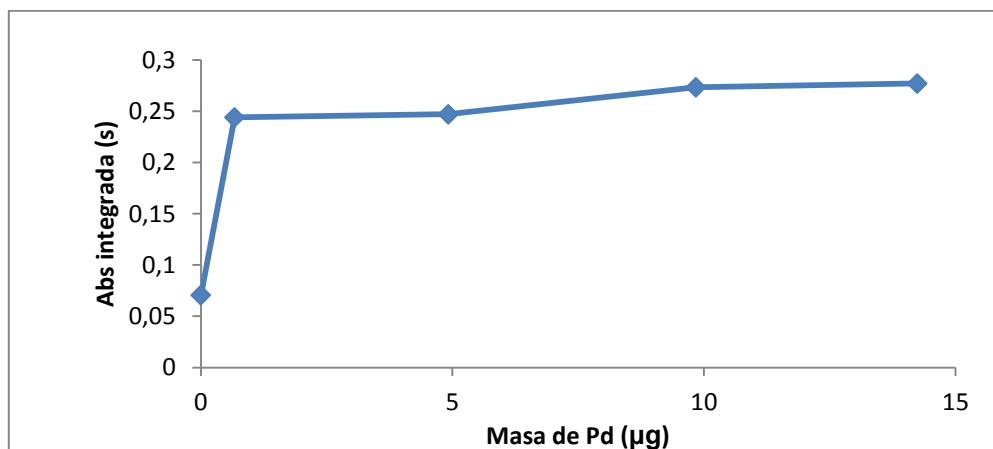


Figura 6. Variación de la señal con la masa de Pd añadido como modificador químico. Masa de Ag (I): $0,1 \text{ ng}$. T^{a} de calcinación: 800°C , T^{a} de atomización: 2000°C .

4.1.3.- Programa de temperaturas con modificador químico.

Una vez que se optimizó la cantidad de paladio a emplear, se llevaron a cabo las curvas de atomización y calcinación que se obtenían con dicha masa inyectada de modificador químico, para, de este modo, encontrar el programa de temperaturas óptimo en un medio de HNO_3 1% (v/v) y una cantidad de modificador químico de 10 μg . Las curvas obtenidas se presentan en la figura 7.

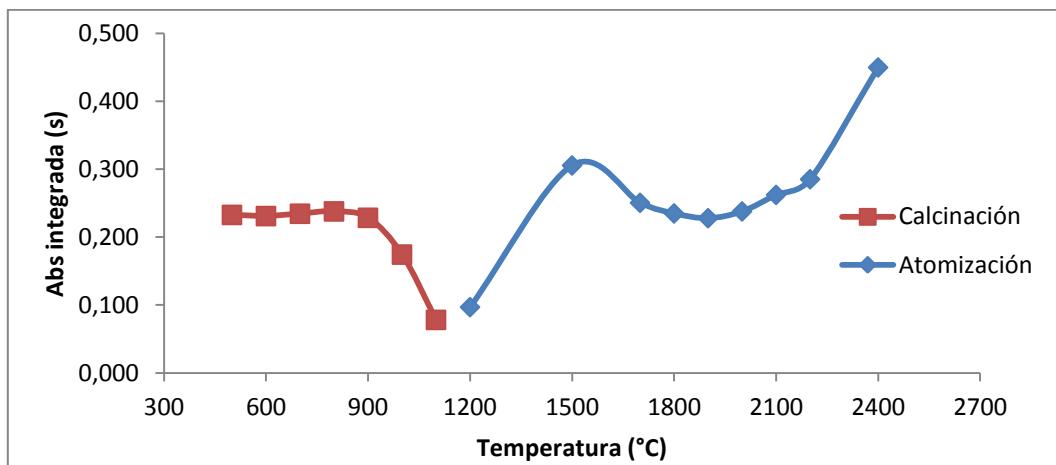


Figura 7. Curvas de calcinación y atomización. Modificador químico: Pd (10 μg).
Masa de Ag (I): 0,1 ng. HNO_3 1% (v/v).

En la figura 8 presentamos uno de los picos obtenidos, dicho pico presenta un buen perfil y podríamos obtener una señal correcta, obtenida como absorbancia integrada.

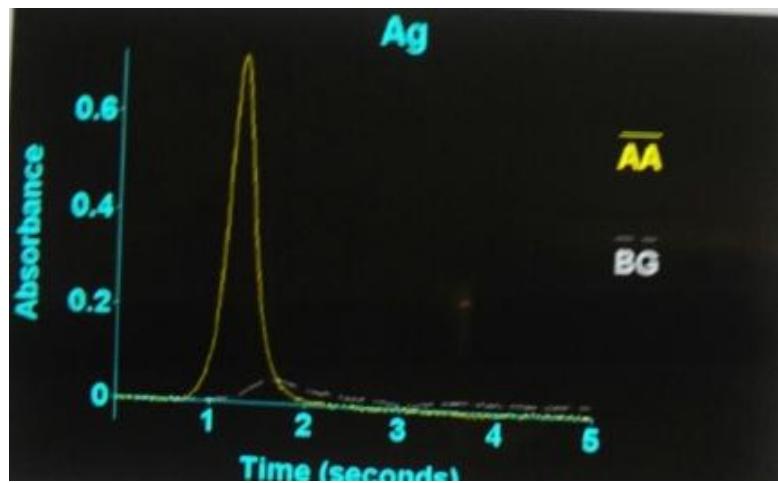


Figura 8. Pico de absorbancia. T^a atomización 2000°C T^a calcinación 800°C. Masa de Pd: 10 μg .
Masa de Ag (I): 0,1 ng. HNO_3 1% (v/v).

Atendiendo a la señal, la forma de la curva de calcinación y atomización y los picos de absorbancia obtenidos, inyectando una masa de 10 μ g de modificador químico, el programa de temperaturas óptimo quedó del modo que se presenta en la tabla 2.

Tabla 2. Programa de temperaturas óptimo en HNO₃.

| Etapa | Temperatura(°C) | Rampa(s) | Estancia (s) | Flujo de gas (mL min ⁻¹) |
|-------------|-----------------|----------|--------------|--------------------------------------|
| Secado | 150 | 15 | 20 | 250 |
| Calcinación | 800 | 10 | 40 | 250 |
| Atomización | 2000 | 0 | 5 | 0 |
| Limpieza | 2500 | 1 | 3 | 250 |

4.2.- Determinación de plata en medio de TMAH.

Al sustituir el medio de ácido nítrico al 1% (v/v) por medio de digestión, que contiene TMAH, cisteína y Tritón X-100, se observó que durante la etapa de secado se formaban espumas en la plataforma, lo que generaba medidas muy irreproducibles. Para solucionar este problema se añadió una etapa más de secado a menor temperatura (80°C), de manera que el secado se producía de un modo más progresivo y más reproducible.

Para valorar si el resto de condiciones trabajo seleccionadas en la primera parte del trabajo (temperaturas de calcinación y atomización, cantidad de modificador) eran adecuadas para trabajar con el medio de TMAH, se comparó la sensibilidad obtenida utilizando ácido nítrico al 1% (v/v) y medio de TMAH. En la figura 9 se presentan las rectas de calibrado obtenidas para los dos diluyentes estudiados.

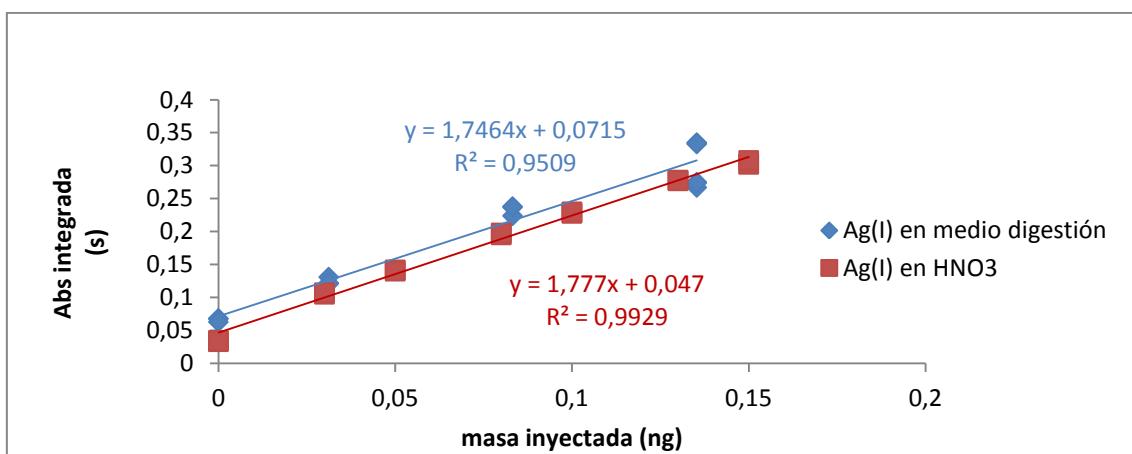


Figura 9. Rectas de calibrado en distintos medios. Masa modificador químico=10 μ g.
T^a calcinación=800°C, T^a atomización=2000°C.

Como se muestra en la figura 9, no obtuvimos diferencias significativas entre las rectas de calibrado obtenidas al trabajar con HNO₃ y la obtenida al emplear el medio de digestión (TMAH) para solubilizar la plata, empleando una cantidad de 10 μ g de modificador químico.

Por este motivo se podrá emplear cualquiera de los dos diluyentes y no será necesario optimizar la cantidad de Pd a inyectar en el tubo de grafito porque consideraremos que la plata presenta un comportamiento análogo en ambos diluyentes.

El programa de temperaturas final se recoge en la tabla 3.

Tabla 3. Programa de temperaturas óptimo en el medio de digestión.

| Etapa | Temperatura(°C) | Rampa (s) | Estancia (s) | Flujo de gas (mL min ⁻¹) |
|-------------|-----------------|-----------|--------------|--------------------------------------|
| Secado | 80 | 5 | 40 | 250 |
| Secado | 150 | 5 | 10 | 250 |
| Calcinación | 800 | 25 | 40 | 250 |
| Atomización | 2000 | 0 | 5 | 0 |
| Limpieza | 2500 | 1 | 3 | 250 |

4.3.- Prestaciones analíticas del método para la determinación de plata mediante ETAAS.

Se estudiaron las prestaciones analíticas proporcionadas por los métodos desarrollados, así como el efecto que tiene el medio en que se encuentra presente la plata.

Para ello se realizaron rectas de calibrado para Ag (I) en los siguientes medios: HNO₃ 1 %, y medio de TMAH.

Las prestaciones analíticas estudiadas fueron:

- El rango lineal que se define como el rango de concentraciones en el que es aplicable el método analítico.
- La concentración o masa característica, es una medida de la sensibilidad en espectrometría de absorción atómica y se define como la concentración o masa, respectivamente, que produciría de una señal de absorbancia integrada igual a 0,0044 unidades.
- El límite de detección (LD) se define como la cantidad o concentración mínima de sustancia que puede ser detectada con fiabilidad por un método analítico determinado. Se calcula como tres veces la desviación estándar del blanco partido por la sensibilidad. Siendo en nuestro caso el número de réplicas de la medida del blanco igual a tres.
- Precisión. La precisión es el nivel de concordancia entre los resultados obtenidos cuando aplicamos varias veces el mismo método analítico a la misma muestra. Se presentará la precisión como repetitividad que da una idea del tipo de variabilidad que se puede esperar cuando el método es desarrollado por un mismo analista, en un mismo laboratorio con un mismo instrumento analítico y en un periodo corto de tiempo. El número de medidas realizadas para el cálculo de la precisión fue igual a seis.

Tabla 4. Prestaciones analíticas de la determinación de plata mediante ETAAS

| Prestación analítica | HNO ₃ 1%(v/v) | Medio de TMAH |
|----------------------|--------------------------|-------------------------|
| Masa característica | 2,48 pg | 2,52 pg |
| Rango lineal | hasta 0,15 ng | hasta 0,15 ng |
| LD (masa) | 0,002 ng | 0,005 ng |
| LD (concentración) | 0,20 µg L ⁻¹ | 0,50 µg L ⁻¹ |
| Repetitividad | 0,5% | 1,8% |

Para el cálculo de dichas propiedades se han empleado las siguientes ecuaciones:

$$LD = \frac{3 \cdot S}{pte}$$

$$Repetitividad(%) = \frac{S * 100}{X}$$

Siendo s la desviación estándar del blanco, pte la sensibilidad y X la media de los resultados obtenidos como absorbancia integrada.

La diferencia entre los límites de detección, obtenidos para cada uno de los diluyentes utilizados, que se presentan en la tabla 4, se debe a la complejidad del medio de digestión lo que genera un aumento en la señal producida por las disoluciones de blanco con respecto a la que presentaba el blanco de HNO₃. En la tabla 5 se presentan, a modo de ejemplo, valores de las señales de blanco obtenidas para los dos medios utilizados.

Tabla 5. Medidas de blanco obtenidas en TMAH y en HNO₃.

| | Blanco con HNO ₃ | Blanco con medio TMAH |
|-------------------|-----------------------------|-----------------------|
| 1. | 0,035 | 0,068 |
| 2. | 0,034 | 0,068 |
| 3. | 0,033 | 0,063 |
| Media | 0,034 | 0,067 |
| Desviación | 0,001 | 0,003 |

4.4.- Validación del método: Análisis de DOLT-4

4.4.1.- Determinación de plata en DOLT-4.

Como ya comentamos en el apartado 2 del presente TFG, uno de los objetivos de éste es la determinación del contenido de plata total presente en muestras biológicas. Para ello se llevaron a cabo digestiones con TMAH de alícuotas de un material de referencia certificado a base de (DOLT-4), en tres días diferentes, mediante el procedimiento descrito en el apartado 3.7.2. de la presente memoria. Una vez finalizada la digestión, los tubos se centrifugan, separando el residuo sólido del sobrenadante y procediendo al análisis de este último. Las muestras se cuantificaron frente a patrones de Ag (I) preparados en el mismo medio de TMAH en el que se encontraban las muestras.

Los resultados obtenidos una vez realizada la corrección del blanco de procedimiento y de contenido en humedad del CRM fueron los presentes en la tabla 6.

Tabla 6. Determinación de plata en DOLT-4. Resultados medios para tres medidas.

| | Ag en DOLT-4 (mg kg⁻¹) | Desviación (mg kg⁻¹) |
|--------------------------|--|--|
| Ataque I | 1,03 | ±0,031 |
| Ataque II | 1,72 | ±0,050 |
| Ataque III | 1,20 | ±0,007 |
| Ataque IV | 0,87 | ±0,015 |
| Ataque V | 0,95 | ±0,023 |
| Ataque VI | 0,88 | ±0,014 |
| Ataque VII | 0,87 | ±0,004 |
| Ataque VIII | 0,91 | ±0,022 |
| Ataque IX | 0,86 | ±0,007 |
| Valor certificado | 0,93 | ±0,07 |

Como podemos apreciar el resultado del ataque II se aleja de los resultados obtenidos para el resto de ataques, por lo que vamos a estudiar si se puede considerar un valor anómalo por presentar un error accidental. Para confirmar o rechazar dicha suposición realizamos un test Q. Mediante la ecuación 1 se obtuvo una $Q_{calculada}=0,61$. Si se compara ahora con la tabulada para un nivel de confianza del 95% ($Q_{tabulada}=0,526$), como $Q_{calculada} > Q_{tabulada}$ podemos asumir que que el valor de $1,72 \text{ mg kg}^{-1}$ es un valor anómalo y por tanto puede ser eliminado.

$$Q = \frac{\text{Valor sospechoso} - \text{Valor más próximo}}{\text{Valor más alto} - \text{Valor más bajo}}$$
 Ecuación 1

Se presentan a continuación la media y la desviación estándar de los valores obtenidos:

$$0,95 \pm 0,11 \text{ mg kg}^{-1}$$

4.4.2. - *Ensayos de recuperación.*

Para verificar que la matriz de las muestras no era una fuente de errores sistemáticos proporcionales en el proceso de medida, se realizaron estudios de recuperación sobre las medidas de las muestras digeridas. Para llevar a cabo los ensayos de recuperación se utilizó el propio inyector automático del horno de grafito.

Tabla 7. Porcentajes de recuperación para dos de los ataques realizados.

| | Ataque IV | Ataque VI |
|----------------|-----------|-----------|
| % Recuperación | 101 | 102 |

Como observamos en la tabla 7 tenemos una buena recuperación para ambos ataques, lo que nos confirma que no hay errores sistemáticos proporcionales asociados a la etapa de medida.

4.4.3.- *Validación de los resultados: Test t*

Para demostrar que el resultado que hemos obtenido no presenta una diferencia significativa con el valor certificado, se realizó una prueba estadística mediante el test t.

Existen varias aplicaciones de este test estadístico entre ellas la que usaremos nosotros, que es la comparación de un valor medio experimental con un valor verdadero.

Los resultados obtenidos para la t tabulada y la experimental fueron 2,262 y 0,39, respectivamente. El valor calculado de t se ha obtenido empleando la Ecuación 2, mientras que el valor tabulado se ha obtenido con Excel, mediante la función DIST.T.INV. con un nivel de confianza del 95%.

$$t = \frac{(x-\mu)\sqrt{n}}{s} \quad \text{Ecuación 2}$$

Como el valor experimental de t, es menor que el tabulado, podemos concluir con un 95% de seguridad que se cumple la hipótesis nula y no hay evidencias de errores sistemáticos en la determinación de plata en tejidos biológicos de una muestra certificada mediante el método empleado.

4.5.- Determinación de plata en forma de nanopartículas mediante ETAAS.

Como ya comentamos previamente la forma más habitual de poner en disolución la plata presente en una muestra biológica consiste en realizar una digestión con ácidos, puesto que en este medio los cationes simples son más estables. Este tipo de digestiones no permite distinguir entre las diferentes especies de plata presentes en algunas muestras reales (por ejemplo, plata iónica y nanopartículas de plata). Empleando el método, anteriormente descrito, basado en una digestión alcalina con TMAH, solubilizamos la matriz biológica manteniendo la forma química de la plata presente. En el caso de la Ag (I), acomplejada con cisteína, y en el caso de las nanopartículas de Ag (0), como tales nanopartículas.

Aunque en nuestro trabajo no vamos a realizar la determinación de nanopartículas, hay numerosos situaciones en las que es conveniente determinar la proporción de plata iónica y de plata en forma de nanopartículas. Por este motivo resulta de interés conocer si la plata se comporta de forma distinta en función de su forma fisicoquímica en relación con su determinación mediante ETAAS.

4.5.1.- Efecto del Pd como modificador químico

En la figura 10 se pueden observar las diferencias de comportamiento encontradas para la plata en forma de nanopartículas y la plata iónica, empleando como diluyente agua, en ausencia y en presencia de modificador químico (10 µg).

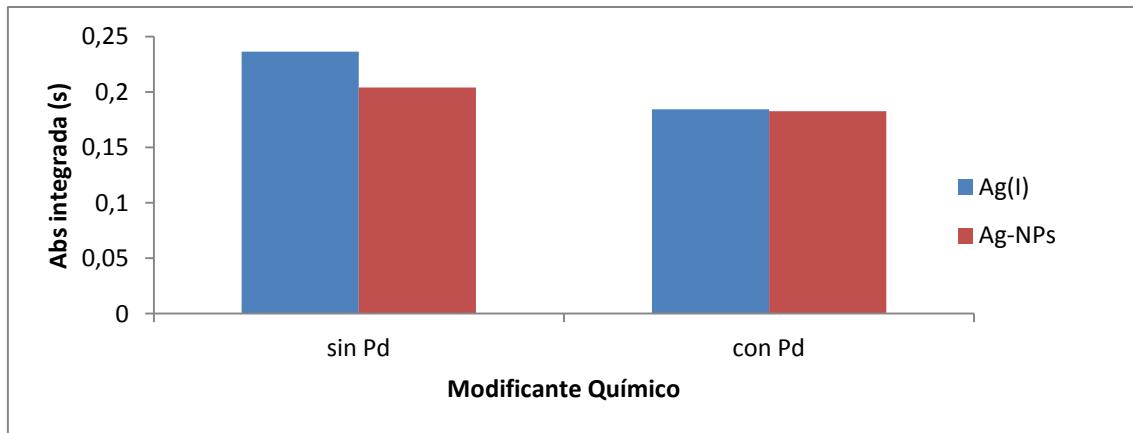


Figura 10. Comparación entre las medidas obtenidas para Ag-NPs y Ag (I) en H_2O , con diferentes cantidades de modificador químico. Masa de Ag (I)/NPs=0,1 ng.

En la figura 10 podemos ver que al trabajar sin modificador químico las diferencias de comportamiento que exponen ambas especies de plata es de un 16%, lo que se consideró como significativo. Al introducir modificador químico los resultados obtenidos para las dos especies son más similares. Debemos recordar que al trabajar sin paladio la temperatura de calcinación óptima era de 400°C.

4.5.2.- Efecto del medio de TMAH

Una vez que hemos determinado que al trabajar con modificador de matriz, empleando agua como diluyente, se reducen las diferencias de comportamiento que presentan las especies de plata, debemos considerar el estudiar si las nanopartículas de plata se comportaran de un modo similar que la plata iónica en un medio más complejo como es el medio que empleamos para la digestión, medio de TMAH. En la figura 11 se comparan las señales obtenidas para cada una de las dos especies tanto en un medio de TMAH como en agua ultrapura, inyectando una cantidad de modificador químico de 10 µg.

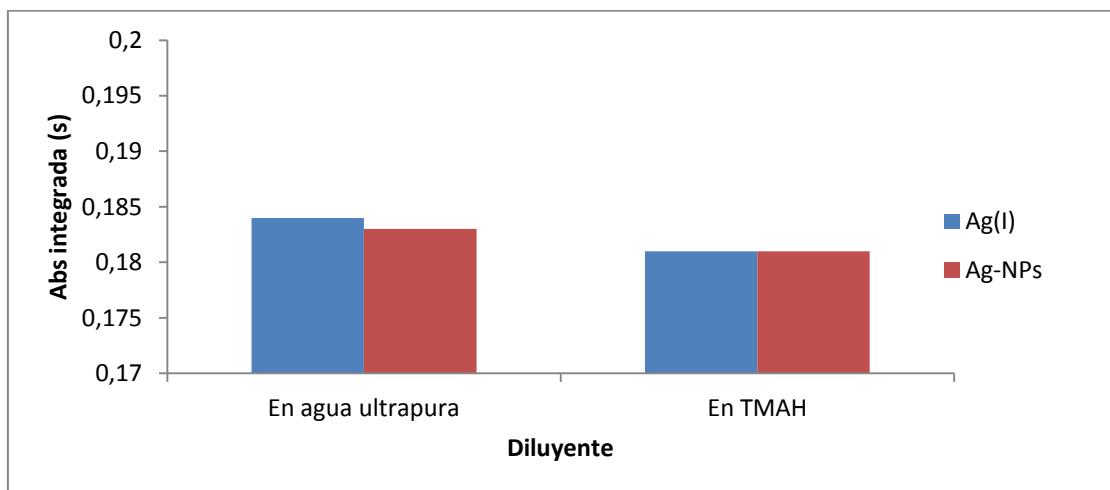


Figura 11. Comparación entre las medidas obtenidas para Ag-NPs y Ag (I) en TMAH y agua ultrapura.
Modificador químico (Pd)= 10 µg. Masa de Ag (I)/NPs=0,1 ng.

Tal y como podemos observar en la figura 11, las nanopartículas de plata y la plata iónica presentan un comportamiento similar tanto en el medio de digestión, como en agua ultrapura al trabajar con la cantidad de modificador químico seleccionado.

En este estudio previo a la determinación de nanopartículas de plata en tejidos biológicos, debemos determinar si el comportamiento de las nanopartículas de plata sería análogo en el medio de digestión (medio de TMAH) y en agua ultrapura, para ello fijándonos en la figura 11 podemos concluir que las respuestas proporcionadas en ambos diluyentes no difieren significativamente por lo que podremos trabajar indistintamente con ambos diluyentes.

4.5.3.- Programa de temperaturas para nanopartículas de plata.

Por último y para finalizar dicho estudio, previo a la determinación de nanopartículas de plata, debemos encontrar las temperaturas óptimas a emplear si lo que estamos analizando es una muestra que presenta nanopartículas de plata. Para ello realizamos las curvas de calcinación y atomización tal y como explicamos en el apartado 4.1.1. obteniendo lo que se presenta en la figura 12.

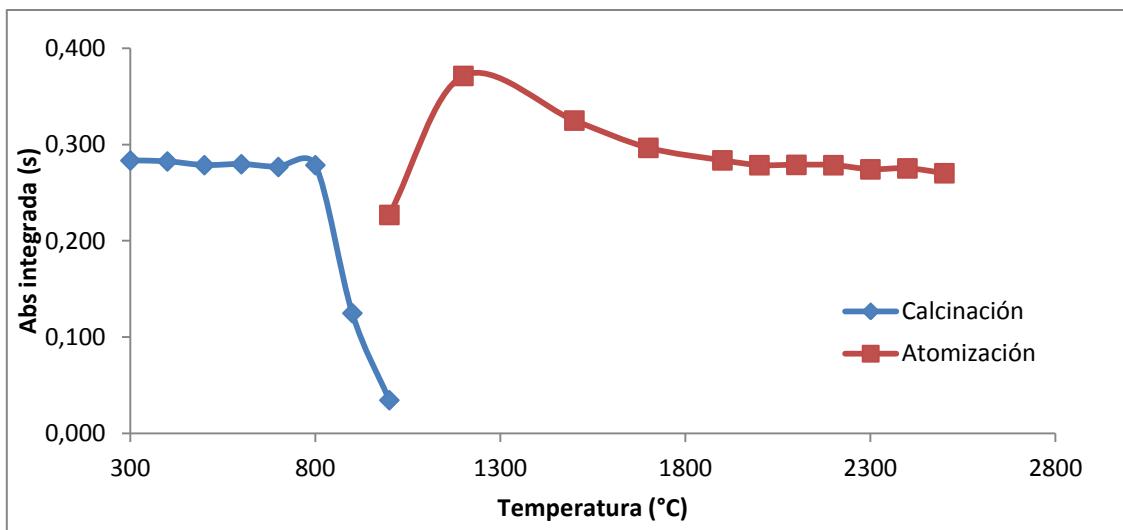


Figura 12. Curvas de calcinación y atomización. Masa modificante químico: Pd = 10 µg.
Masa Ag-NPs = 0,1 ng. Medio H₂O ultrapura.

Las temperaturas óptimas de calcinación y atomización, en agua ultrapura, atendiendo tanto a la forma de las curvas, como a los perfiles de los picos de absorbancia obtenidos, serán de 800°C y 2000°C, respectivamente.

Al presentar las nanopartículas de plata un comportamiento análogo tanto en agua ultrapura como en el medio de TMAH, tal y como hemos demostrado en la figura 11, podemos considerar que las temperaturas óptimas de trabajo serán iguales en ambos medios, por tanto el programa de temperaturas quedará del modo que se expone en la tabla 8.

Tabla 8. Programa de temperaturas óptimo en agua ultrapura para nanopartículas de plata

| Etapa | Temperatura(°C) | Rampa(s) | Estancia (s) | Flujo de gas (mL min ⁻¹) |
|-------------|-----------------|----------|--------------|--------------------------------------|
| Secado | 150 | 15 | 20 | 250 |
| Calcinación | 800 | 10 | 40 | 250 |
| Atomización | 2000 | 0 | 5 | 0 |
| Limpieza | 2500 | 1 | 3 | 250 |

Al introducir el medio de TMAH debemos recordar que en la etapa de secado aparecían unas espumas, por lo que tuvo que modificarse el programa con respecto al obtenido al trabajar en un medio más simple. El programa de temperaturas empleado al utilizar TMAH como agente de digestión será análogo al obtenido en la tabla 3.

5.- Conclusiones

Las conclusiones de este Trabajo de Fin de Grado son las siguientes:

1. Se han obtenido las condiciones óptimas de trabajo para la determinación de plata mediante espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica, refiriéndonos tanto al programa de temperaturas que debemos emplear como a la cantidad de paladio necesario, empleado como modificador químico, tanto en medio HNO_3 1% (v/v) como en un medio de digestión a base de hidróxido de tetrametilamonio.

Las temperaturas de calcinación y atomización óptimas fueron 800 y 2000°C, respectivamente. La cantidad óptima de modificador químico a emplear fue de 10 µg de Pd. Utilizando las condiciones anteriores no se encontraron diferencias entre el comportamiento de la plata iónica disuelta y las nanopartículas de plata metálica en ambos medios.

2. Se ha comprobado que en el caso de que una muestra biológica contuviese plata en forma de plata (I) y/o nanopartículas de plata metálica, la cuantificación de la plata total presente en la muestra digerida con TMAH sería independiente de la forma en la que se encontrase la plata en dicha muestra.

3. Se han obtenido las prestaciones analíticas proporcionadas por el método empleando ambos diluyentes (HNO_3 y Medio de digestión).

El rango lineal de trabajo llega hasta los 0,15 ng en todos los casos. Atendiendo a la sensibilidad, como masa característica, obtuvimos unos resultados de 2,48 y 2,52 pg al trabajar en HNO_3 1% (v/v) y medio de TMAH, respectivamente. Por otro lado el límite de detección del que disponemos al trabajar en medio de digestión es $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, mayor que el que se consigue trabajando en ácido nítrico al 1%, $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$, debido al mayor nivel de plata en los reactivos utilizados. En cuanto a la repetitividad también se obtiene un mejor resultado al trabajar en ácido nítrico, ya que las medidas obtenidas son algo más precisas que en el medio de digestión, siendo los valores 0,5% y 1,8%.

4. El método de determinación de plata mediante ETAAS, en combinación con la digestión de muestras biológicas mediante TMAH se ha aplicado a una muestra de referencia certificada (DOLT-4) con resultados satisfactorios, validando el procedimiento desarrollado.

6.- Agradecimientos

Quiero agradecer la realización del presente Trabajo Fin de Grado, a mi director, Francisco Laborda, por guiarme tanto en el desarrollo experimental del mismo, como en la realización de la presente memoria, al Grupo de Espectroscopía Analítica y Sensores (GEAS) por permitirme desarrollar el trabajo en sus laboratorios, así como al Instituto Universitario de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA).

6.- Referencias

1. J. Jiménez-Lamana, F. Laborda, E. Bolea, I. Abad-Álvaro, J.R. Castillo, J. Bianga, M. He, K. Bierla, S. Mounicou, L. Ouerdane, S. Gaillet, J.M. Rouanet, J. Szpunar. *Metalomic.* **2014**, 6, 2242-2249.
2. E. Bolea, J. Jiménez-Lamana, F. Laborda, I. Abad-Álvaro, C. Blade, L. Arola, J.R. Castillo. *Analyst.* **2014**, 139, 914–922.
3. E.P. Gray, J.G. Coleman, A.J. Bednar, A.J, Kennedy, J.F. Ranville and C.P. Higgins. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, 47, 14315-14323.
4. F. Laborda, M.P. Górriz, J.R. Castillo. *Talanta.* **2004**, 64, 631–636.
5. F. Laborda, B. Soria, M.P. Górriz, J.R. Castillo. *At. Spectrosc.* **2005**, 26(6), 215-220.
6. Douglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch en *Principios de Análisis instrumental*, 6^a Edición (Eds: S. Cervantes, A. Vega), CENGAGE Learning, **2008**, pp. 132-253.
7. Richard D. Beaty, Jack D. Kerber. *Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry*, 2^a Edición, **1993**, The Perkin-Elmer Corporation.
8. P. Martins, D. Pozebon, V.L. Dressler, G.A. Kemieciki. *Anal. Chim. Acta*. **2002**, 470, 195-204.