



Departamento de
Química Analítica
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado

Determinación del vanadio en alimentos mediante espectroscopía de descomposición inducida por láser



María Solana Castells

Director:

Jesús Anzano Lacarte

Facultad de Ciencias

Diciembre, 2020

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por apoyarme siempre, por ayudarme a seguir este maravilloso, aunque a veces agobiante camino hacia mi futuro, ser Graduada en Química.

A mis amigos, en especial a todos aquellos que me han acompañado a lo largo de estos cinco años y lo siguen haciendo, ayudando a que las clases y los días fueran mucho más divertidos y se hicieran menos largos. También, a mis compañeras de piso, Paula y Julia ya que sois un pilar fundamental en mi vida y en mi día a día.

A Jesús Anzano, por ayudarme a emprender este último paso en mi carrera y acogerme en su grupo de investigación como a una más.

A Andrés Cruz, ya que gracias a él las horas de trabajo en el laboratorio fueron más amenas e hizo que el trabajo no resultara tan difícil como pensaba que sería al pisar por primera vez el laboratorio.

A César, Abrahan y demás personas que han pasado durante este curso y me han ayudado a resolver mis dudas, que no han sido pocas, con una sonrisa puesta.

Financiación

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación, Proyecto CTM2017-82929-R, el Fondo Social Europeo - Gobierno de Aragón, grupo Química y Medio Ambiente (E49_20R) y la Universidad de Zaragoza.



Acrónimos

| | |
|--------------|--|
| ASV | Anodic stripping voltammetry, (voltametría de redisolución anódica) |
| CCD | Coupled Charge Device, (dispositivo de transferencia de carga) |
| CL | Free Calibration, (Calibración Libre) |
| ICP | Inductively Coupled Plasma, (plasma de acoplamiento inductivo) |
| iCCD | Intensified Coupled Charge Device, (dispositivo de transferencia de carga) |
| LASER | Light Amplification by Simulated Emission of Radiation, (amplificación de la luz mediante emisión estimulada de radiación) |
| LIBS | Laser- Induced breakdown spectroscopy, (espectroscopía de descomposición inducida por láser) |
| Nd:YAG | Neodymium-dopped yttrium aluminium ganet. |
| ICP-MS | Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, (espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo) |
| ICP-AES | Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy, (espectroscopía de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo) |
| ICP-OES | Inductively Coupled Plasma Optical Emisión Spectrometry, (espectroscopía de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo) |
| EAA-ET/llama | Atomic Absorption Spectroscopy-Electrothermal atomization/flame, (Espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotérmica/ llama) |
| DES | Deep Eutectic Solvents, (disolventes eutécticos profundos) |
| LPME | Liquid-phase microextraction, (micro extracción en fase líquida) |
| XRF | X-Ray Fluorescence , (fluorescencia de rayos X) |
| SNR | Signal-noise ratio, (relación señal-ruido) |
| LTE | Local Termal Equilibrium, (equilibrio local termodinámico) |

Resumen

La espectrometría de descomposición inducida por láser (LIBS) es una técnica que nos ofrece infinidad de ventajas, entre ellas, la realización de análisis no destructivos y escaso tratamiento de muestra. Por ello, se emplea en este trabajo para la determinación de vanadio en harinas de pescado, una muestra sólida.

Debido a la complejidad de la matriz se hace uso de una metodología reciente llamada Calibración Libre (CL), que nos permite, sin necesidad de utilizar patrones internos, realizar un análisis cuantitativo sobre la muestra, basado en los parámetros físicos del plasma y su interacción con la muestra. Por consiguiente, es necesario antes de su utilización realizar una optimización de los parámetros instrumentales creando un diseño factorial.

Abstract

Laser- Induced breakdown spectrometry (LIBS) is a technique that offers us endless advantages, including non-destructive analysis and a limited sample processing. For this reason, it is used in this paper for the determination of vanadium in fishmeal, a solid sample.

Due to the complexity of the matrix, a recent methodology called Free Calibration (CL) is used, which allows us, without the need to use internal standards, to perform a quantitative analysis on the sample, based on the physical parameters of the plasma and its interaction with the sample. Therefore, it is necessary to perform an optimization of the instrumental parameters before its use by designing a factorial design.

Tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Finalidad y número de muestras preparadas | 16 |
| Tabla 2. Parámetros instrumentales empleados para la optimización | 17 |
| Tabla 3. Longitudes de onda correspondientes al vanadio para su estado fundamental (I) y su primera ionización (II) | 17 |
| Tabla 4. Parámetros utilizados para el estudio dela muestra con atmósfera inerte | 18 |
| Tabla 5. Diseño factorial realizado para la optimización | 19 |
| Tabla 6. Valores de SNR obtenidos en el diseño factorial | 23 |
| Tabla 7. Resultados obtenidos de la deseabilidad individual y global | 23 |

Figuras

| | |
|---|-------|
| Figura 1. Instrumentación utilizada para la determinación | 15 |
| Figura 2. Prensa hidráulica (Fig.2a) y pastillas generadas a partir de esta (Fig.2b)..... | 16 |
| Figura 3. Comparación de espectros utilizando argón para V I a 370.7 nm (Fig.3a), V I a 439.5 nm (Fig.3b) y variando las acumulaciones (Fig.3c) | 21-22 |
| Figura 4. Comparación entre V I a 370,3 nm (Fig.4a), V I a 439,5 nm (Fig.4b) y V II a 268,8 nm (Fig.4c) para distintos experimentos realizados en el diseño factorial .. | 24-25 |

Anexos

| |
|---|
| Anexo 1. Patente del método LIBS-CL |
| Anexo 2. Reciente publicación sobre análisis de alimentos mediante LIBS, del grupo Química y Medio Ambiente (LIBS) |
| Anexo 3. Normas específicas y hoja de compromiso en el laboratorio láser |

Índice

| | | |
|------|---|----|
| 1. | Introducción | 8 |
| 1.1. | Importancia del vanadio en los alimentos | 8 |
| 1.2. | Técnicas analíticas para la determinación de vanadio en alimentos | 9 |
| 1.3. | Espectroscopía de descomposición inducida por láser..... | 9 |
| 1.4. | Objetivos | 14 |
| 2. | Experimental | 15 |
| 2.1. | Muestras analizadas..... | 15 |
| 2.2. | Instrumentación y software | 15 |
| 2.3. | Procedimiento | 16 |
| 3. | Resultados y discusión | 21 |
| 3.1. | Optimización de los parámetros | 21 |
| 4. | Conclusiones | 26 |
| 5. | Referencias..... | 27 |
| 6. | Anexos..... | 29 |

1. Introducción

Cuando se habla del elemento químico Vanadio (V) tenemos que remontarnos al año 1801 cuando fue identificado por primera vez, pero sin mucho éxito, por Andrés Manuel del Río Fernández, mineralogista español. El primer nombre para este fue “Eritonio”, pero no fue hasta 1831 cuando se logró su purificación y su redescubrimiento como un elemento nuevo por Nils Gabriel Sefström que le dio el nombre actual haciendo referencia a la diosa Vanadis de la mitología escandinava.¹

Actualmente el Vanadio se encuentra en el grupo de los metales de transición con número atómico veintitrés y se encuentra dentro del grupo 5 de la tabla periódica. Debido a sus variadas propiedades químicas y físicas sus aplicaciones industriales son diversas, además destacar su importancia a nivel biológico en determinados organismos.

1.1. *Importancia del vanadio en los alimentos*

El vanadio es importante en aspectos biológicos como la receptividad de la insulina y prevención de enfermedades vasculares. También es necesario para el metabolismo de la glucosa, carbohidratos, lípidos, fosfolípidos y colesterol. Sin embargo, a concentraciones elevadas puede causar efectos adversos a nivel bioquímico o reproductivo debido al deterioro de las funciones realizadas en los huesos, riñones, hígado y bazo, principales lugares donde se acumula este elemento, siendo sus compuestos inorgánicos y las especies pentavalente las más tóxicos respecto a las tetravalente y trivalentes.^{2,3}

El vanadio se encuentra en los alimentos a nivel de ultra traza siendo los estados de oxidación más abundantes (IV) y (V)⁴, a pesar de ello, según un estudio realizado a una población italiana la principal fuente de exposición para la población es la ingesta, en la que alimentos como el pescado, legumbres, cereales y dulces poseen las mayores concentraciones; entre 6,28 µg.kg⁻¹ para el pescado hasta 12,20 µg.Kg⁻¹ en legumbres. Finalmente la estimación de ingesta diaria rondaría los 10,36 µg/día⁵ y se encontraría dentro del rango estimado por la EFSA; entre 10 y 20 µg/día. Cabe destacar, que aunque no exista un valor nutricional máximo para este elemento, puesto que no se ha demostrado que sea necesario para los humanos, la FNB recomienda “un nivel máximo de ingesta de 1,8 mg/día en adultos”.⁶

En este trabajo se ha utilizado muestras de harinas de pescado, las cuales son generadas a partir de los subproductos de pescado que no son destinados para consumo humano y que se originan en ciertas industrias. De esta forma, las industrias pueden valorizar estos subproductos y darles otras funciones. El principal uso de las harinas de pescado es en la alimentación animal y acuícola como piensos, en los que el principal producto es la proteína (harina) que constituye un 60-75 %, además de incorporar un alto contenido en aminoácidos esenciales.⁷ Ahora bien, el vanadio se encuentra presente en estas y se puede considerar un mineral esencial minoritario, sin embargo, determinados estudios relacionados con las dietas avícolas hablan sobre la presencia del vanadio como contaminante en fosfatos de baja calidad presentes en los piensos.⁸ Las primeras investigaciones concluyeron que, para concentraciones de 10 ppm suministradas durante 7 días de alimentación, la calidad de la albúmina en los huevos disminuía significativamente.⁹ A demás,

otros trabajos demostraron que a niveles superiores de 15 $\mu\text{g.g}^{-1}$ el vanadio generaba la despigmentación en el cascarón marrón de los huevos.¹⁰

1.2. Técnicas analíticas para la determinación de vanadio en alimentos

Las técnicas más utilizadas para realizar determinaciones de vanadio en alimentos, agua y muestras ambientales son ICP-MS, ICP-AES, ICP-OES, EAA-ET/llama o ASV. Sin embargo, como se ha nombrado anteriormente, el vanadio se encuentra en cantidades de ultra traza en este tipo de muestras por ellos es interesante hablar sobre técnicas de pre-concentración y métodos de separación. Dentro de estas técnicas podemos destacar un método actual de pre concentración “verde” que consiste en realizar una micro extracción en fase líquida (LPME) dispersiva utilizando disolventes eutécticos profundos (DES). Esta técnica se ve favorecida respecto a otras debido a su simplicidad, sensibilidad, facilidad de análisis, obtención de un alto factor de pre concentración y menor consumo de disolventes orgánicos, ya que la mayor parte de disolventes que se utilizaban anteriormente para las extracciones eran orgánicos y generaban mayores problemas ambientales. La utilización de disolventes eutécticos profundos ha supuesto una disminución del envenenamiento sobre líquidos iónicos, así como, una reducción en la utilización de sustancias tóxicas que podrían causar efectos adversos en el medio ambiente. Esto se debe a que son formulados mediante combinaciones de dos a tres compuestos menos tóxicos y económicos, entre los cuales uno de los más utilizados es el cloruro de colina, interaccionando entre ellos a través de asociaciones de hidrógeno. También es habitual aplicar ultrasonidos para disgregar el disolvente en gotículas pequeñas y finas para reducir los tiempos de extracción y aumentar la eficiencia.^{11,4}

Respecto a las técnicas empleadas para realizar el análisis cuantitativo sobre alimentos destacamos que, las principales técnicas utilizadas son la EAA-ET/llama y la utilización de ICP-AES , aunque debido a las grandes ventajas que posee la técnica LIBS, se ha convertido en una técnica utilizada en diferentes estudios para este tipo de análisis.^{2,3,4,11}

1.3. Espectroscopía de descomposición inducida por láser

La espectroscopía de descomposición inducida por láser, LIBS, también conocida como espectroscopía de plasma inducida por láser, LIPS es una técnica de análisis rápido sobre cualquier estado de la materia: gas, líquido y sólido. Su funcionamiento es bastante sencillo, sin embargo, los procesos físicos que ocurren debido a la interacción entre el láser y la materia son complejos.¹²

Fundamentos. - Se trata de una técnica de emisión atómica que se fundamenta en la utilización de una fuente láser pulsada que generalmente es un láser de Nd:YAG cuyo principal objetivo es la focalización del haz láser hacia una muestra y la formación de un plasma. Cuando se produce la incidencia del haz con la muestra gran parte de la radiación es absorbida a través de su interacción con los electrones, dando lugar a un aumento de la temperatura y superando los calores latentes de fusión, vaporización y finalmente la atomización.¹³ En otras palabras, debido a la alta intensidad del flujo láser se produce la ablación de una parte de la muestra (pluma) generando un proceso de excitación y la formación de un plasma ablacionado en expansión que es un gas

parcialmente ionizado formado por electrones, iones, átomos, moléculas y partículas sólidas que se encuentra a una temperatura entre 5.000 K y 20.000 K¹² debido a las colisiones electrónicas y al aumento de las ionizaciones.

Una vez formado el plasma se expande a velocidades supersónicas generando ondas de choque desde la superficie de la muestra hacia la atmósfera del gas circulante. Transcurrido un tiempo, el plasma comienza a enfriarse y a disminuir su velocidad de propagación debido a procesos de recombinación y procesos donde los electrones son desacelerados debido a coques con el gas circulante. Es entonces cuando se produce la transición de los electrones desde el estado excitado superior hasta el estado fundamental de menor energía. Este proceso recibe el nombre de relajación y es el responsable de la emisión de radiación que es recolectada por un monocromador y analizada en un detector para poder obtener una determinación de la composición elemental de la muestra gracias a la interpretación de un espectro de emisión.¹³

Características. - Existe un estrecho vínculo entre esta técnica y las técnicas analíticas de emisión y espectroscopía de masas que utilizan plasma de acoplamiento inductivo. De hecho, una de las ventajas que posee es su compatibilidad con otros métodos y otras técnicas de análisis como LA-ICP-MS, LA-ICP-AES o LI-MS.¹⁴

Ventajas:

- La preparación de la muestra es mínima y en ocasiones, nula. Por ello, hay una escasa utilización de reactivos químicos
- Se pueden realizar determinaciones tanto en muestras gaseosas, líquidas o sólidas
- Técnica que puede utilizarse en análisis remoto
- Amplia región espectral y adquisición espectral simultánea
- Compatible con otros métodos y técnicas, lo que nos permite trabajar en metodología tandem
- Es una técnica multivalente, es decir, posee capacidad de adaptarse a un amplio número de datos quimiométricos multivariados
- Permite realizar análisis multielementales
- Simple, económico y rápido
- Posibilidad de ser portátil y realizar mediciones *in situ* y a tiempo real
- No destructivo o estrictamente hablando, mínimamente destructivo ya que al ablacionar se genera un pequeño cráter en la muestra
- Amplia variedad de aplicaciones

Inconvenientes:

- Interferencias espectrales y efecto matriz
- Bajo límite de detección del orden de ppm en el rango de 0.029-0.59 ppm
- Limitada precisión y exactitud
- Reproducibilidad típica del orden de 5-20 % RSD por lo que en ocasiones es necesario trabajar con patrones de referencia que son difíciles de encontrar en según qué análisis

Instrumentación^{13,15}

Láser Nd: YAG. - El láser es el componente responsable de la formación del plasma y el más utilizado es el láser de estado sólido Nd: YAG, lo que significa que su material activo es un sólido, un cristal transparente de itrio, aluminio y granate dopado con neodimio(Nd⁺³). Suele ir acompañado de un sistema de bombeo óptico como una lámpara flash o de destello, generalmente de Xe. La longitud de onda fundamental a la que trabaja es de 1064 nm, aunque se puede acortar mediante técnicas de generación de armónicos, reduciéndose así a 532, 354.7 y 266 nm.

Espectrofotómetro Echelle. - Existen varios tipos de espectrofotómetros utilizados para esta técnica como Czerny-Turner, Paschen-Runge y Echelle. En nuestro caso, nos vamos a centrar en este último ya que va a ser el que tengamos en nuestro laboratorio. Los dos primeros se basan en el uso de un solo elemento de dispersión como puede ser una rejilla de difracción holográfica o reglada. Son selectores de longitud de onda limitados en cuanto a resolución y alcance espectral, causando problemas en la detección ya que puede haber superposición entre líneas y disminuyen la capacidad de realizar análisis multielemental. Para muestras con composición no homogénea es necesario una medición simultánea del espectro óptico completo lo que puede lograrse utilizando un espectrofotómetro Echelle, espectrofotómetro compacto que se caracteriza por ofrecer al mismo tiempo un alto poder de resolución ($\lambda/\Delta\lambda$ hasta 10.000 y superior) además de una amplia gama de longitudes de onda (generalmente desde 200 a 1000 nm). En ellos, a diferencia de los dos nombrados anteriormente, se utiliza dos elementos dispersivos; una rendija gruesa con menos de 300 ranuras por milímetro con un ángulo de incidencia significativamente mayor que los espectrofotómetros convencionales y un segundo elemento de dispersión cruzada que puede ser una rejilla o un prisma dispuesto a 90° respecto a la anterior rendija, utilizada para evitar superposiciones en el plano focal de diferentes líneas espectrales. Se puede observar que en los tres tipos se utilizan rejillas como elementos selectores de longitud de onda, aunque existen también filtros ópticos que realizan la misma función, pero su uso es menor.

Detector ICCD. - La función principal del detector es transformar la señal óptica generada por el espectrofotómetro en una señal eléctrica que pueda ser interpretada y registrada por un sistema de procesamiento, como un ordenador. Podemos encontrar dispositivos CCD (Dispositivo de captura de carga) y ICCD (Dispositivo de captura de carga intensificada). Se caracterizan por ser circuitos integrados, anclados a una superficie de silicio que forma áreas microscópicas sensibles a la luz, llamados píxeles. En este trabajo se utiliza un detector ICCD debido a que abarca mayor número de píxeles (40.000 frente a los 3000-2500 que abarca el CCD) y por ello su resolución espacial es mucho mayor, permitiendo registrar simultáneamente múltiples espectros.

Análisis cuantitativo. - Es una técnica que permite realizar análisis multielementales rápidos, *in situ*, con la que podemos realizar medidas cuantitativas utilizando desde los métodos convencionales de calibración hasta métodos más actuales como la Calibración Libre de la que se hablará más adelante. Esto es posible debido a que la intensidad emitida por nuestro plasma es proporcional a la abundancia de un elemento presente en la muestra, por tanto, analizando el espectro de emisión obtenido, observando la intensidad y la posición de las líneas de emisión, podemos obtener información sobre las especies químicas que se encuentran en nuestra muestra.¹⁶ Sin embargo, nos encontramos ante dos inconvenientes importantes a tener en cuenta: En primer lugar, cuando se quiere conocer la concentración de una especie a partir de su curva de calibración es necesario la utilización de patrones, los cuales deben tener la misma matriz que la muestra y

esto, en ocasiones, es difícil de encontrar especialmente en muestras sólidas, como es nuestro caso.

El otro problema a tener en cuenta son las interferencias que se pueden dar, como la autoabsorción, la superposición espectral y el efecto matriz. Para realizar un análisis con éxito es conveniente eliminarlas o minimizarlas lo máximo posible. El efecto matriz es el más importante ya que, la relación final que nosotros obtenemos al analizar el espectro y obtener la concentración de analito depende de la matriz en la que este nuestra muestra. Este efecto afecta a la interacción que se produce entre el láser y la muestra, y podemos corregirlo usando una atmósfera de Argón, evitando así las interferencias producidas por el aire, mejorando la sensibilidad de las líneas de transición y el fenómeno de autoabsorción.^{17,18} Otra solución, es usando una técnica alternativa a la calibración convencional llamada Calibración Libre, un enfoque sin calibración, con la que se evita la preparación de materiales de referencia, disminuyendo así los posibles efectos matriz causados por estos.¹⁶

Calibración libre¹⁹. - Este tipo de calibración (CF-LIBS) es una técnica alternativa desarrollada en 1999 por Ciucci et al.,²⁰. Los creadores propusieron que para poder llevar a cabo un algoritmo consistente el cual nos permitiera realizar un estudio y una descripción cuantitativa de los espectros complejos, el plasma que se generaba tenía que cumplir una serie de requisitos, si no se daban no se podría aplicar este método²¹. La patente del método se encuentra en el Anexo 1.

Utilizando este método los análisis cuantitativos se basan en la ley de distribución de Boltzmann (Ec.1) y la ecuación de Saha (Ec.2), donde se consideran la densidad del número de electrones, la concentración de un elemento se calcula a partir de su altura máxima y aparecen parámetros relacionados con cada pico, como temperatura y densidad electrónica.

$$\ln\left(\frac{I_{sij}}{A_{sij}g_{si}}\right) = -\frac{E_{si}}{Kb*T} + \ln\left(\frac{F N_s}{U_s(T)}\right) \quad \text{Ec.1}$$

$$N_e \frac{N_s^{II}}{N_s^I} = \frac{(2\pi m_e K_b T)^{3/2}}{h^3} \frac{2 U_s^{II}(T)}{U_s^I(T)} e^{-E_{ion}/K_b T} \quad \text{Ec.2}$$

Siendo: I_{sij} la intensidad de la línea espectral (unidades arbitrarias), A_{sij} la probabilidad de la transición (s^-), g_{si} la degeneración de la transición, E_{si} la energía del nivel superior de la transición (e V), K_b la Constante de Boltzmann (e V K⁻¹), F es un parámetro instrumental, N_s es la densidad electrónica emitida, $U_s(T)$ es la función de partición, N_s^{II} y N_s^I , corresponden a las densidades electrónicas correspondientes a los átomos (I) o a los iones (II) en cm⁻³, E_{ion} es el potencial de ionización (e V), m_e es la masa del electrón y h es la constante de Planck (e V * s).

La ecuación de Boltzmann se utiliza para calcular la temperatura del plasma, parámetro muy importante ya que la distribución de población en los niveles excitados va a depender de ella, por ello es muy importante calcularla rigurosamente. Para ello, se realizan representaciones gráficas de las intensidades obtenidas y de la información espectral de diferentes energías de excitación emitidas por un mismo elemento. Idealmente, estas representaciones se tendrían que hacer para todos los elementos distintos que se encuentran en la muestra y con todas las transiciones que se producen, pero esto suele ser difícil. Aun así, se aconseja utilizar el máximo número de elementos

y sus correspondientes transiciones. Una vez obtenidas esas representaciones y realizada una regresión línea de los puntos obtenidos para cada elemento, la pendiente obtenida nos proporcionará el valor de la temperatura del plasma (Ec.3).

$$m = -\frac{1}{Kb * T} \quad \text{Ec.3}$$

Otro parámetro que se debe estimar, es la densidad electrónica. Esta se calcula a partir del ensanchamiento de Stark en las líneas de emisión donde se toma generalmente la línea del hidrógeno, asumiendo que no existen otras fuentes de ensanchamiento o que estas pueden compensarse.

Como se ha comentado anteriormente, para aplicar estas ecuaciones y este método, es necesario que se cumplan una serie de requisitos que son los siguientes:

- El plasma debe encontrarse en *equilibrio local termodinámico (LTE)* durante el tiempo en el que se realiza la medida. Esto conlleva a que el plasma debe mantener sus propiedades termodinámicas (temperatura y densidad electrónica) sin que se produzca ninguna variación. Esto ocurre cuando se cumple el criterio de McWhirter.
- No se debe producir autoabsorción, es decir, las *líneas espectrales* incluidas en el cálculo deben ser ópticamente finas.
- Plasma debe ser considerado una *fuente homogénea*.
- La *composición del plasma* debe ser lo suficientemente representativa de la composición de nuestra muestra, es decir, la ablación debe ser “estequiométrica” para poder obtener resultados fiables.

El criterio de McWhirter (Ec.4) establece el valor mínimo de densidad electrónica en el plasma necesario para que se cumpla el Equilibrio Local Termodinámico. Sin embargo, por si solo no es suficiente para concluir que se cumpla y es necesario criterios adicionales, parámetros como el tiempo de relajación y la variación de la duración del plasma. De esta forma, se puede conseguir LTE, seleccionando un tiempo de delay y de medida óptimo.

$$N_e \geq 1,6 * 10^{12} T^{1/2} \Delta E^3 \quad \text{Ec.4}$$

Siendo: T (K) y ΔE (e V) la mayor energía de transición.

Aplicaciones

Industria metalúrgica. – En este tipo de industrias tiene gran importancia el análisis a nivel industrial de aleaciones metálicas y las medidas in line de estas, se pueden realizar utilizando LIBS que compite en este ámbito con la técnica XRF. Generalmente, se utiliza LIBS cuando los tiempos de medición son críticos, cuando las superficies están corroídas o no son completamente representativas de la composición global de la aleación o cuando no es posible realizarse un análisis a corta distancia.²²

Aerosoles. - Esta técnica es de gran utilidad en estos análisis debido a la naturaleza específica del plasma del LIBS, así como la de las partículas de los aerosoles. Actualmente, es necesario medirlos con alta precisión y sensibilidad debido a los efectos adversos que suponen frente a la salud humana y al medio ambiente.²³

Aplicaciones espaciales. – Esta técnica se ha utilizado en misiones a la Luna, Venus y Marte, cuyo principal objetivo era la determinación geoquímica de la superficie planetaria debido, entre otras cualidades, a que puede proporcionar información remota a una distancia de varios metros

y de forma rápida con el uso de un único instrumento. A demás, el entorno espacial proporciona grandes limitaciones para el uso de determinados instrumentos, por ello se necesita instrumentación robusta, que se pueda miniaturizar y automatizarse, características que cumple el LIBS.²⁴

Aplicación geológica. - Su principal aplicación es en suelos. Sin embargo, son análisis complejos debido a la diversa composición química que tienen, ya que podemos encontrar componentes como minerales, materia orgánica, microorganismos, fósiles, aire y agua. Esta técnica se ha aplicado, entre otras cosas, para la medición de nutrientes, para realizar seguimientos on-line de elementos contaminantes como el cromo o determinaciones de oligoelementos en muestras de suelo volcánico.²⁵ El uso de esta técnica para la identificación de suelos tiene un gran interés en aplicaciones agrícolas, ambientales y forenses.

Aplicaciones forenses. - La espectroscopía de descomposición inducida por láser se ha utilizado con éxito en análisis forenses de vidrio, pinturas, huellas dactilares, material biológico como pelo, uñas o hueso debido a la mínima preparación de muestra que se necesita para su aplicación, la posibilidad de obtener información multielemental simultáneamente y su posibilidad de aplicación en tiempo real.²⁶

Medioambiente. - En concreto, se ha utilizado esta técnica para realizar identificaciones de polímeros ya que la peor consecuencia del consumo y fabricación de los plásticos es su efecto adverso y el deterioro del medioambiente, por ello es necesario realizar una buena identificación y clasificación de los tipos de polímeros existentes. Es importante destacar, que al incidir con un láser en estas muestras puede existir la perdida de información molecular debido a su alta intensidad, por ello se suelen utilizar diferentes técnicas quimiométricas para solventarlo como métodos de correlación, método de coordenadas normalizadas, entre otros.²⁷

1.4. *Objetivos*

Búsqueda bibliográfica acerca del Vanadio en harinas de pescado, así como de la propia técnica que vamos a utilizar para realizar las determinaciones, LIBS.

Aprendizaje sobre el manejo de los equipos y la optimización de parámetros instrumentales: delay, tiempo de medida y la energía, además de realizar un estudio con Argón para valorar si obtenemos mejores resultados al utilizar atmósfera inerte.

Utilizar bases de datos como el NIST y softwares para el tratamiento de nuestros datos y espectros con los cuales realizaremos un estudiopectral e identificaremos las líneas de emisión correspondientes al Vanadio.

Manejo de Calibración Libre, con la cuál podremos obtener una composición porcentual de la composición de nuestra muestra realizando un tratamiento de muestra muy simple y sencillo. A continuación, realizaremos unos ensayos variando el tiempo de medida, delay y energía, además de realizar ensayos con y sin Argón.

Realizar un diseño factorial para obtener las mejores condiciones de los parámetros por las cuales la relación señal-ruido se vea lo más minimizada posible.

Analizar las muestras con las condiciones óptimas mediante CL-LIBS.

2. Experimental

2.1. Muestras analizadas

Harinas de pescado procedentes de una empresa de Manta (Ecuador). Estos subproductos son transformados en harinas por esta empresa para finalmente ser utilizadas como piensos. La muestra ha estado conservada entre 5-6°C en el departamento de Química Analítica de la Universidad de Zaragoza (España).²⁸

2.2. Instrumentación y software

Láser de Nd:YAG Q-switched (Brilliant Quantel Ultra CFR) cuyas características son: Longitud de onda 1024 nm, energía máxima de 50 mJ por pulso y una duración de pulso de 8 ns. La entrada de la fibra óptica, junto con una entrada para introducir argón, se encuentra dentro de una cámara de muestras junto al portamuestras. La fibra óptica se encuentra conectada a un espectrómetro Echelle (Andor Mechelle ME5000, 195 mm de distancia focal, F/7,1/A1 5000). Este dispone de un detector ICCD (Andor iStar DH734, 1024*1024 pixeles 13.6 *13.6 μm^2 por pixel, 18 mm de diámetro de intensificador). Se utilizó un puntero láser para ayudar a alinear la fibra, como una lámpara de argón-mercurio (Ocean Optics, HG-1,Hg-Ar lines 253-922 nm) para la calibración de detector. Todo ello se muestra de forma esquemática en la Figura 1.

Los programas a utilizar son Origin 2019B de Origen Labs, Matlab y LIBS ++

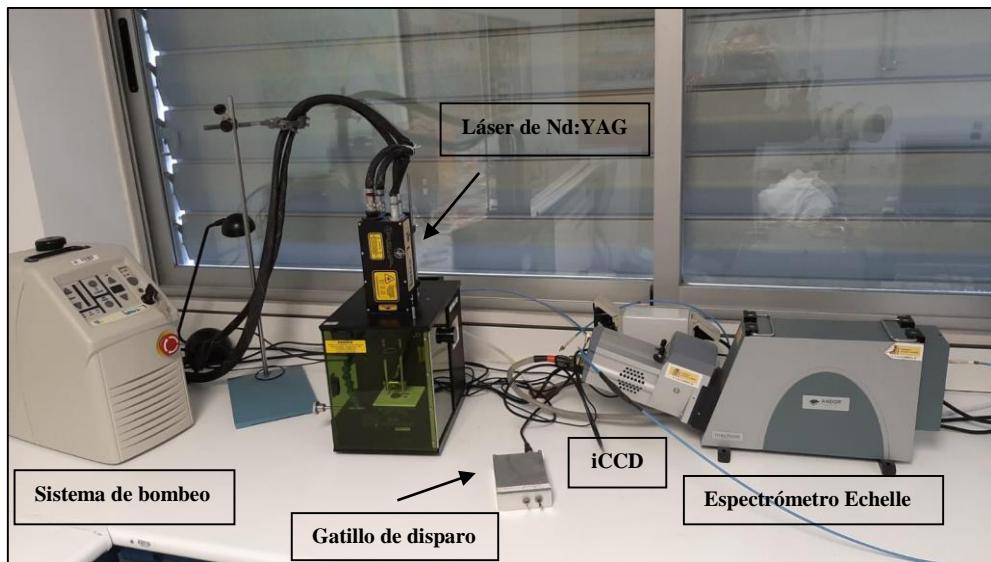


Fig. 1. Instrumentación utilizada para la determinación

2.3. Procedimiento

Preparación de la muestra. - Se tomó aproximadamente 0.25 gramos de harina de pescado, sólido disgregado en pequeñas partículas, y se preparó una pastilla utilizando una prensa hidráulica manual (Perkin Elmer, Modelo: B0062566) tomando la pesada e introduciéndola en un molde circular, el cual se somete a una presión de 10×10^4 N durante 2 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, se quita la presión y se separa la pastilla ya formada del molde. Finalmente, se observa que no existe ninguna grieta en ella y estos pasos se repitieron hasta generar 25 pastillas. En la Tabla 1 se indica el número de pastillas que se utiliza en cada ensayo y que tipo de ensayo se realiza y en la Figura 2 se puede observar las pastillas utilizadas y la prensa.

Tabla 1. Finalidad y número de muestras preparadas.

| Nº Muestras | Finalidad |
|-------------|--|
| 6 | Estudio con atmósfera inerte (uso de Argón) |
| 6 | Estudio de los parámetros a optimizar (delay, tiempo de medida y energía) |
| 13 | Estudio del diseño factorial |

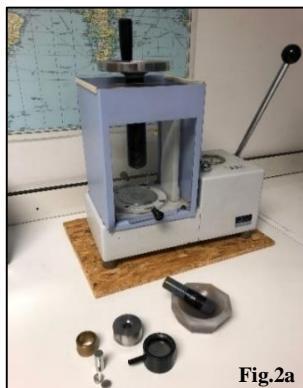


Fig.2a



Fig.2b

Fig. 2. Prensa hidráulica (Fig.2a) y pastillas generadas a partir de esta (Fig.2b)

Optimización de los parámetros²⁹.- En primer lugar, vamos a realizar seis estudios variando parámetros instrumentales como el delay, el tiempo de medida y la energía del pulso con el fin de realizar una predicción de ellos. Se estudian estos parámetros debido a que:

i) **Delay o tiempo de retraso en la lectura** se define como el tiempo que transcurre desde que se origina el disparo hasta que la señal llega al detector, es importante optimizarlo ya que a tiempos bajos nuestro analito puede no haber emitido todavía o lo ha hecho pero de forma débil y por tanto no podremos identificarlo, además como ya sabemos el plasma puede pasar por diferentes etapas y al inicio de su formación este posee mucha energía y elevada temperatura englobando gran cantidad de átomos excitados y su densidad electrónica es muy alta ($> 10^{18} \text{ cm}^{-1}$), por ello al inicio existirán muchas especies que estarán emitiendo a lo largo del espectro, generándose así un continuo, señal intensa y continua que no nos servirá para las determinaciones. También para tiempos muy largos para los cuales el plasma se expande y ha perdido temperatura como consecuencia de que las especies han vuelto a su estado fundamental, tampoco nos será útil ya que obtendremos señales poco intensas.

ii) **La energía** es importante, ya que cuanto mayor sea mayor proporción de muestra se ablaciona. De esta forma, el plasma que se genera es más energético y las señales que obtengamos serán más intensas, por este motivo, para analitos que se encuentren en bajas cantidades o elementos trazas es recomendado utilizar energías elevadas.

iii) **El tiempo de medida**, es tiempo durante el cual se produce la medida, es decir, el tiempo durante el cual la fibra óptica está capturando la emisión del plasma generado. Este parámetro está estrechamente relacionado con el ruido de fondo, por ello hay que buscar un valor en el cuál podamos obtener señales con una intensidad relativamente buena y con el menor ruido de fondo posible.

Antes de realizar los experimentos es importante comprobar que el detector se encuentra a -20 °C. Además, se debe calibrar el detector utilizando la lámpara de Hg:Ar y se debe alinear la fibra óptica con el disparo con la ayuda del punto láser. Una vez que se realizan estos pasos podemos comenzar. Para ellos se realizaron 6 experimentos con diferentes valores en los parámetros comentados anteriormente, como se observa en la Tabla 2, destacando que trabajamos con un número de acumulaciones fija para todos ellos, 10 acumulaciones.

Tabla 2. Parámetros instrumentales empleados para la optimización.

| Nº Experimento | Parámetros a optimizar | | |
|----------------|------------------------|-------|------------------|
| | Energía | Delay | Tiempo de medida |
| 1 | 8,5 | 1000 | 2000 |
| 2 | 9,5 | 500 | 2000 |
| 3 | 9,5 | 1000 | 2000 |
| 4 | 9,5 | 1000 | 5000 |
| 5 | 9,5 | 3000 | 2000 |
| 6 | 9,5 | 5000 | 2000 |

Se estudiaron los espectros, en los cuales se comparó la longitud de onda a la cual salía nuestro analito con las líneas espectrales de emisión que aparecen en la base de datos del NIST para así poder elegir las mejores condiciones en las que el pico correspondiente a nuestro analito sea lo más fino posible, exista buena relación señal-ruido y minimicemos las interferencias causadas por otras señales cercanas a este. Las líneas espectrales elegidas para el estudio fueron las que aparecen en la Tabla 3.

Tabla 3. Longitudes de onda correspondientes al vanadio para su estado fundamental (I) y su primera ionización (II)

| Elemento | V I | V I | V II |
|----------------|-------|-------|-------|
| λ (nm) | 439,5 | 370,3 | 268,8 |

En segundo lugar, se realiza un estudio para determinar si el uso de atmósfera inerte, utilizando argón, mejora nuestros experimentos. Para ellos se realizan seis pruebas, una de ellas sin Ar y cinco con Ar, pero en todas ellas se establecen los mismos valores de energía, delay y tiempo de medida (9.5 J, 500 ns y 2000 ns) cambiando únicamente las acumulaciones en la última prueba como se recoge en la Tabla 4.

Tabla 4. Parámetros utilizados para el estudio de la muestra con atmósfera inerte.

| Nº Experimento | Argón | Acumulaciones |
|----------------|-------|---------------|
| 1 | No | 40 |
| 2 | Si | 40 |
| 3 | Si | 40 |
| 4 | Si | 40 |
| 5 | Si | 40 |
| 6 | Si | 80 |

Por último, se realiza un diseño factorial con el objetivo de construir un modelo capaz de predecir las mejores condiciones instrumentales para dar la mejor respuesta posible. En este, se realiza una optimización que corresponde a la optimización de cada señal/ruido de fondo para cada una de las señales que estoy utilizando con el objetivo de buscar, utilizando una matriz, los coeficientes de cada variable teniendo en cuenta la interacción entre variables, en mi caso, únicamente optimizamos las variables del delay y el tiempo de medida ya que la energía debe ser elevada porque las líneas espectrales del vanadio solo se ven con valores elevados debido a que está presente en la muestra a muy bajas concentraciones. También se suele utilizar este tipo de diseños cuando tenemos pocos experimentos ya que nos permite tener un rango amplio de condiciones con las que poder trabajar.

El número de experimentos y las condiciones que se han elegido aparecen en la Tabla 5 y son las siguientes. Se realizaron trece experimentos, los cuatro primeros corresponderán a condiciones propias de un diseño factorial convencional (para un diseño factorial convencional, se utilizan 2^n experimentos, siendo n el número de variables a optimizar) y se encuentran normalizados entre 1 y -1, los cinco siguientes corresponden a las condiciones referentes a puntos centrales, es decir, estas condiciones son una media entre los valores más bajos y más altos de los dos parámetros y se encuentran normalizados en 0, y finalmente los cuatro últimos, son condiciones que corresponden a los puntos más extremos, llamados puntos estrella, que se encuentran normalizados siguiendo la ecuación 5. La normalización se realiza únicamente para obtener valores más manipulables y menos complejos.

$$Vn(\text{estrella}) = \frac{(Vr - Vpc)}{\left(\frac{Vmax - Vmin}{2} \right)} \quad \text{Ec.5}$$

Siendo: Vr =Valor de la variable

Vpc =Valor punto central

$Vmax$ = Valor máximo, $Vmin$ = Valor mínimo

Tabla 5. Diseño factorial realizado para la optimización

| Experimento | Delay time (ns) | | Gate width (ns) | | Energy (mJ) | |
|-------------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|
| | Real | Normalizado | Real | Normalizado | Real | Normalizado |
| 1 | 500 | -1 | 1000 | -1 | | |
| 2 | 500 | -1 | 3000 | 1 | | |
| 3 | 1500 | 1 | 1000 | -1 | | |
| 4 | 1500 | 1 | 3000 | 1 | | |
| 5 | 1000 | 0 | 2000 | 0 | | |
| 6 | 1000 | 0 | 2000 | 0 | | |
| 7 | 1000 | 0 | 2000 | 0 | | |
| 8 | 1000 | 0 | 2000 | 0 | | |
| 9 | 1000 | 0 | 2000 | 0 | | |
| 10 | 293 | -1,4142 | 2000 | 0 | | |
| 11 | 1707 | 1,4142 | 2000 | 0 | | |
| 12 | 1000 | 0 | 586 | -1,4142 | | |
| 13 | 1000 | 0 | 3414 | 1,4142 | | |

Una vez elegidos los experimentos y sus condiciones, pasamos a evaluar la relación señal-ruido (SNR) de cada experimento para determinados picos correspondientes a las especies que aparecen en la Tabla 3, anteriormente descrita. Para realizar esta evaluación utilizaremos el programa MATLAB que nos calcula la SNR para cada línea, para ello es importante transformar la longitud de onda de nanómetros a pixeles ya que este programa trabaja así, una vez realizado, buscamos estos pixeles en el programa ajustando dos o tres pixeles por arriba y por abajo del pico y así obtenemos de cada experimento y para cada elemento que estamos estudiando, su relación señal-ruido.

A continuación, calculamos la deseabilidad individual, normalización de todos los valores obtenidos, que va a estar entre 0 y 1 para luego poder elegir solo una condición, un experimento, el que mejor relación señal-ruido nos dé. Para esto, en primero lugar obtenemos para cada señal que hemos analizado el valor máximo y el valor mínimo obtenidos y en segundo lugar, aplicando la ecuación 6 calculamos la deseabilidad individual (D.I).

$$D.I = \frac{(V_{exp} - V_{min})}{(V_{max} - V_{min})} \quad \text{Ec.6}$$

Siendo: V_{exp} =Valor de SNR de cada experimento para el correspondiente elemento

V_{min} =Valor mínimo obtenido para ese elemento en todos los experimentos

V_{max} =Valor máximo obtenido para ese elemento en todos los experimentos

Al observar los valores obtenidos, idealmente tendríamos que tener un valor normalizado igual a uno para todos los elementos en un mismo experimento, pero si no fuera así debemos calcular la deseabilidad global, promedio de los valores obtenidos de deseabilidad individual de cada experimento, para poder elegir un único experimento y aplicarlo finalmente para realizar la determinación cuantitativa del vanadio que se explicará a continuación.

Determinación de vanadio en harina de pescado mediante CL-LIBS

El procedimiento que se seguiría para realizar la determinación de vanadio en nuestra muestra sería la combinación del LIBS junto a la calibración libre (CF-LIBS), para ello los pasos que habría que realizar serían los siguientes:

i) **Obtención de los espectros.** Para ello con los parámetros instrumentales optimizados, se dispara a nuestras muestras, en la cual lo ideal es que estos disparos se repartan uniformemente

por toda la pastilla y así cubran la mayor superficie posible. Una vez que se realizan los disparos, se recogen los espectros utilizando el programa LIBS ++, con el cual podemos abrir espectros individuales o seleccionar varios y el programa nos da el espectro promedio.

ii) **Corrección del desplazamiento.** En general una vez que abrimos los espectros en el programa suelen estar desplazados entre 0.5 y 1 nm aproximadamente, por ello buscamos una señal conocida en el espectro y ordenamos al programa que esa señal tenga la misma longitud de onda que la que obtenemos de la base de datos del NIST y el programa nos desplaza el espectro en base a esa diferencia de señales.

iii) **Identificación de la mayor parte de señales posibles en el espectro.** Para realizarlo podemos empezar de izquierda a derecha en nuestro espectro o eligiendo primero las señales con mayor intensidad e ir afinando las de menor intensidad después. Cabe destacar, que es un trabajo laborioso ya que hay que realizar esta acción para cada una de las señales en todos los espectros obtenidos, tanto de las líneas correspondientes al estado fundamental como las de la primera ionización. También es importante tener una idea *a priori* de la composición de la mezcla ya que nos servirá para elegir adecuadamente que elemento corresponde a cada línea.

iv) **Integración de los picos obtenidos.** Una vez identificadas todas las señales con su correspondiente elemento, pasamos a integrar los picos y así saber su intensidad, para ello debemos cuadrarlo bien para que este quede solo y el propio programa nos calcula su intensidad y su anchura.

v) **Cálculo de la densidad electrónica y resolución de ecuación Saha-Boltzmann.** Llegados a este punto, a partir de la anchura de la señal de hidrógeno a 656.28 nm el software calcula la densidad electrónica correspondiente. A continuación, genera una representación gráfica donde se representa $\ln((I/gk/A_{\text{H}}))$ frente a $E_i + E_k$ donde se observan las rectas correspondientes a cada elemento que tenemos en nuestra muestra. A partir de su pendiente podemos calcular la temperatura del plasma, pero el propio programa nos la da directamente. En este paso, podemos seleccionar o desechar algunas líneas. Lo ideal es que la temperatura que sale para cada línea de cada elemento sea parecida entre ellos y por tanto que el valor de sus pendientes también sea lo más parecido, por ello un paso fundamental es realizar un estudio de líneas en el cuál observando los puntos que tengamos podamos quitar aquellos en los que ha podido haber autoabsorción o que estén desplazados.

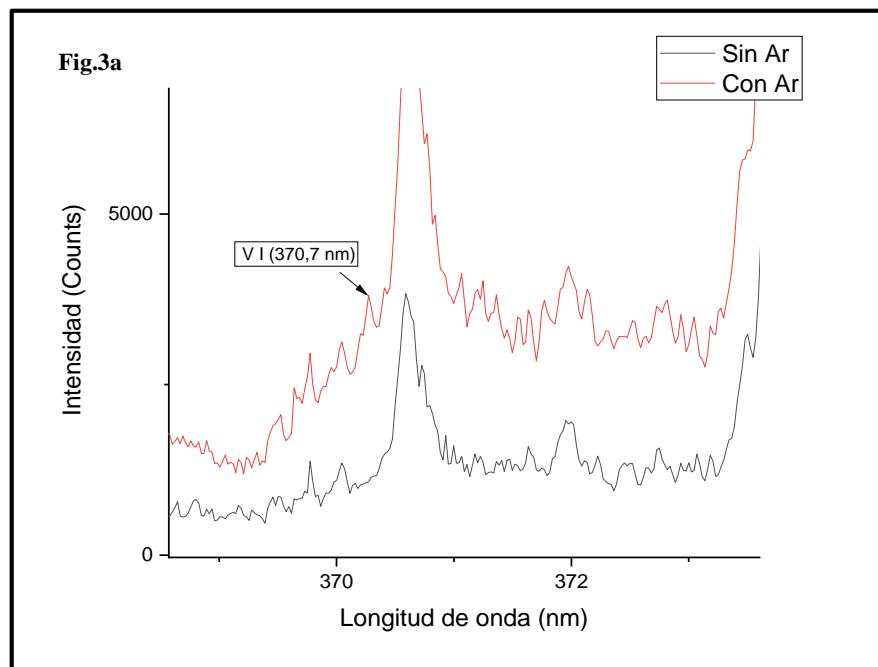
vi) **Resultados de composición.** Una vez obtenidos los parámetros de densidad electrónica y temperatura del plasma, el software nos genera un diagrama de composición, donde se representa la composición de nuestra muestra en porcentaje en masa para cada elemento.

3. Resultados y discusión

3.1. Optimización de los parámetros

En primer lugar, se realiza una predicción de los parámetros; energía de pulso, tiempo de delay y tiempo de medida con las condiciones explicadas en el apartado dos. Los mejores resultados los obtenemos con las condiciones del experimento número dos; Energía 9.5, Delay 500 ns, Tiempo de medida 2000 ns.

En segundo lugar, seleccionando los valores de los parámetros anteriores y se realiza el estudio con atmósfera inerte y sin ella obteniendo mejores resultados con el experimento número seis; utilizando argón y al disparar con ochenta acumulaciones. Esto lo podemos observar en la Figura 3 donde se muestran distintos espectros donde comparamos, en primer lugar, la utilización del argón observando la intensidad obtenida para las distintas líneas de emisión del vanadio a diferentes longitudes de onda. Y, en segundo lugar, realizamos una comparación entre un valor de acumulación de cuarenta frente a una acumulación de ochenta.



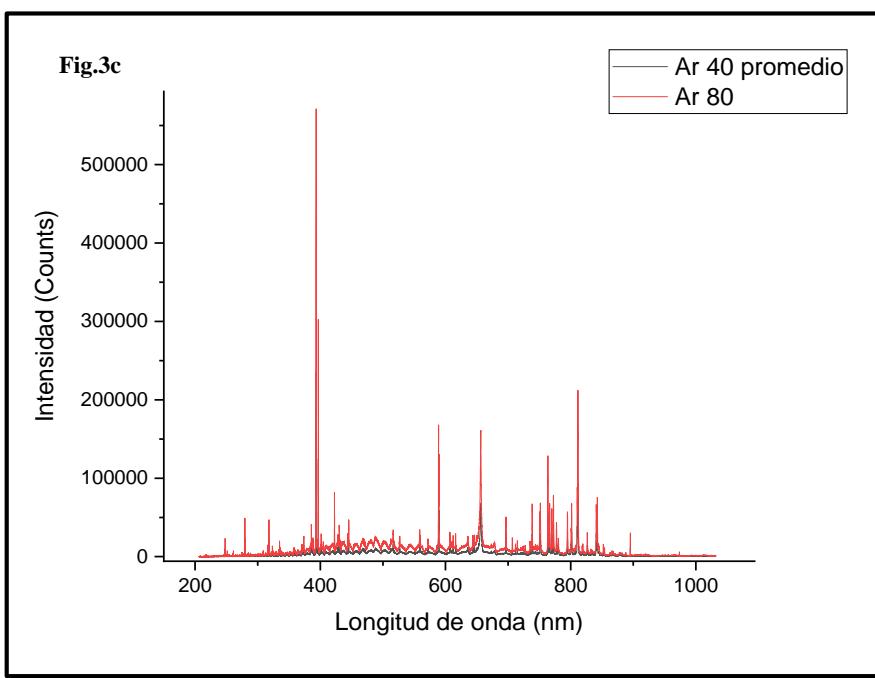
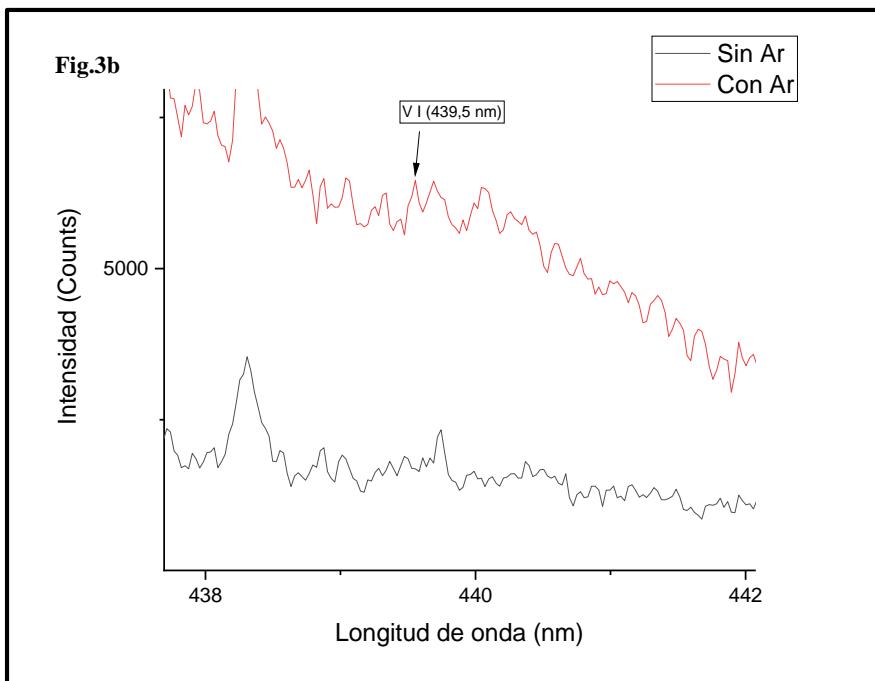


Fig. 3. Comparación de espectros utilizando argón para V I a 370.7 nm (Fig.3a), V I a 439.5 nm (Fig.3b) y variando las acumulaciones (Fig.3c)

Finalmente se lleva a cabo el diseño factorial. Al realizar este diseño obtenemos la relación SNR para cada elemento, así como su valor máximo y mínimo, descritos en la Tabla 6.

Tabla 6. Valores de SNR obtenidos en el diseño factorial

| Exp. | Relación señal-fondo | | |
|------|----------------------|--------|--------|
| | V I | V I | V II |
| 1 | 1,1175 | 1,1289 | 1,3938 |
| 2 | 1,0888 | 1,0927 | 1,3397 |
| 3 | 1,1807 | 1,1947 | 2,2304 |
| 4 | 1,1412 | 1,2276 | 1,3919 |
| 5 | 1,0457 | 1,0943 | 2,5974 |
| 6 | 1,1153 | 1,2466 | 1,834 |
| 7 | 1,0941 | 1,1539 | 2,1256 |
| 8 | 1,1012 | 1,2074 | 1,7153 |
| 9 | 1,0995 | 1,1729 | 3,0831 |
| 10 | 1,0672 | 1,058 | 1,2101 |
| 11 | 1,1437 | 1,4527 | 5,2061 |
| 12 | 1,0980 | 1,1497 | 2,7683 |
| 13 | 1,0508 | 1,1467 | 2,6138 |
| Max | 1,1807 | 1,4527 | 5,2061 |
| Min | 1,0457 | 1,058 | 1,2101 |

Al obtener estos datos, se calcula la deseabilidad individual obteniendo los resultados que aparecen en la Tabla 7, donde se observa que el mejor experimento que nos proporciona mejor señal-ruido, el que tenga el valor igual a uno, no es el mismo para los tres elementos analizados, por ellos, para poder elegir un único experimento es necesario calcular la deseabilidad global.

Tabla 7. Resultados obtenidos de la deseabilidad individual y global.

| Exp. | Deseabilidad individual | | | Deseabilidad global |
|------|-------------------------|-------------|-------------|---------------------|
| | V I 439,5 | V I 370,3 | V II 268,8 | |
| 1 | 0,531851852 | 0,179630099 | 0,045970971 | 0,252484307 |
| 2 | 0,319259259 | 0,087914872 | 0,032432432 | 0,146535521 |
| 3 | 1 | 0,346338992 | 0,25533033 | 0,533889774 |
| 4 | 0,707407407 | 0,429693438 | 0,045495495 | 0,39419878 |
| 5 | 0 | 0,091968584 | 0,347172172 | 0,146380252 |
| 6 | 0,515555556 | 0,477831264 | 0,156131131 | 0,38317265 |
| 7 | 0,358518519 | 0,242969344 | 0,229104104 | 0,276863989 |
| 8 | 0,411111111 | 0,378515328 | 0,126426426 | 0,305350955 |
| 9 | 0,398518519 | 0,29110717 | 0,468718719 | 0,386114802 |
| 10 | 0,159259259 | 0 | 0 | 0,05308642 |
| 11 | 0,725925926 | 1 | 1 | 0,908641975 |
| 12 | 0,387407407 | 0,232328351 | 0,38993994 | 0,336558566 |
| 13 | 0,037777778 | 0,224727641 | 0,351276276 | 0,204593898 |

Con los valores ya calculados de la deseabilidad global, escogemos el que mayor valor tenga, en este caso el experimento número once (0.9086), seguido del experimento número tres (0.5339). Si nos fijamos en las condiciones de ambos, son los que mayor tiempo de delay tienen (1707 ns y 1500 ns, respectivamente). Por otro lado, el experimento número diez es el que peor deseabilidad global nos da, teniendo el menor tiempo de delay de todos los experimentos.

Por ello, podemos afirmar que las condiciones óptimas serán altos tiempos de delay, además de tiempos bajos de medida ya que, si nos fijamos en el experimento tres y cuatro donde para un mismo valor de delay tenemos distintos tiempos de medida, en el tres con tiempos de medida más bajos obtenemos mejor valor de deseabilidad global. Por ello, podríamos emplear tanto las condiciones de optimización del experimento tres como las del once. Para ilustrar estos resultados podemos fijarnos en los espectros de la figura 4, en ellos se compara la intensidad de los picos obtenida al realizar el experimento número tres y once donde se observa que para la línea espectral correspondiente al V I a 370,3 nm es mucho más clara y no se solapa con ningún otro pico al utilizar el experimento número once, sin embargo, para el V I correspondiente a 439,5 nm ocurre lo contrario, las condiciones óptimas serían las del experimento tres debido a que nos proporciona mayor intensidad y además el pico se observa con claridad y no se tumba. Para finalizar, se puede observar también que para el pico correspondiente al V II a 268,8 nm podríamos utilizar ambos experimentos ya que los picos obtenidos para cada experimento son similares.

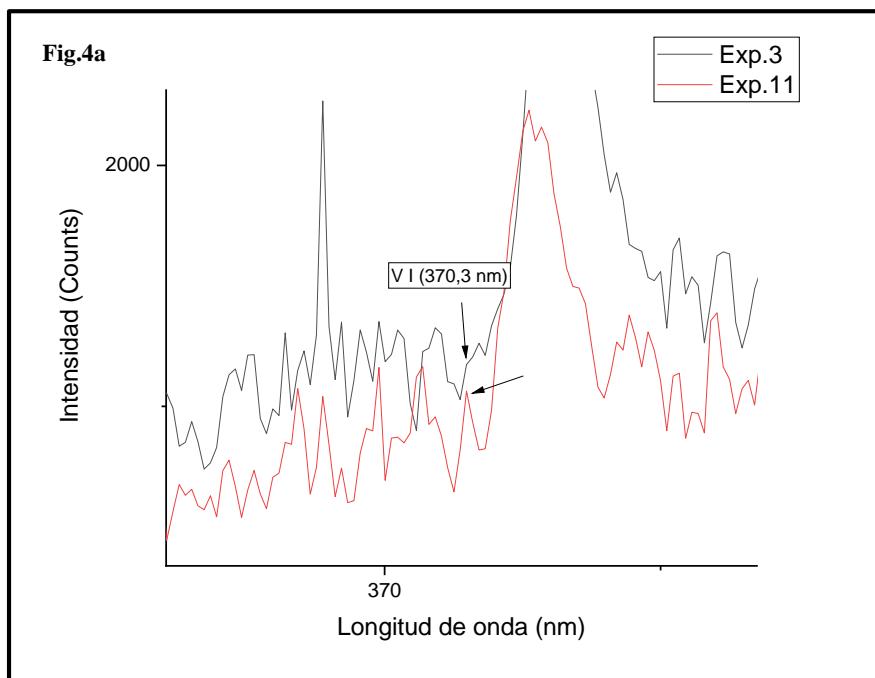


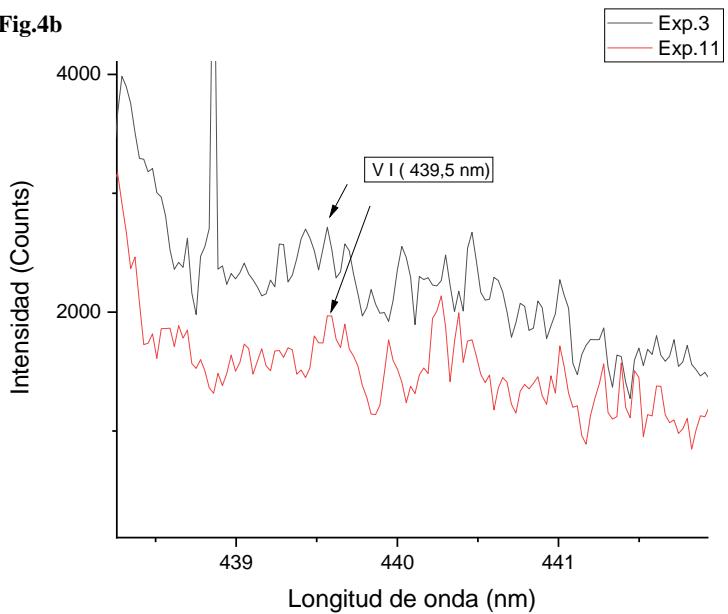
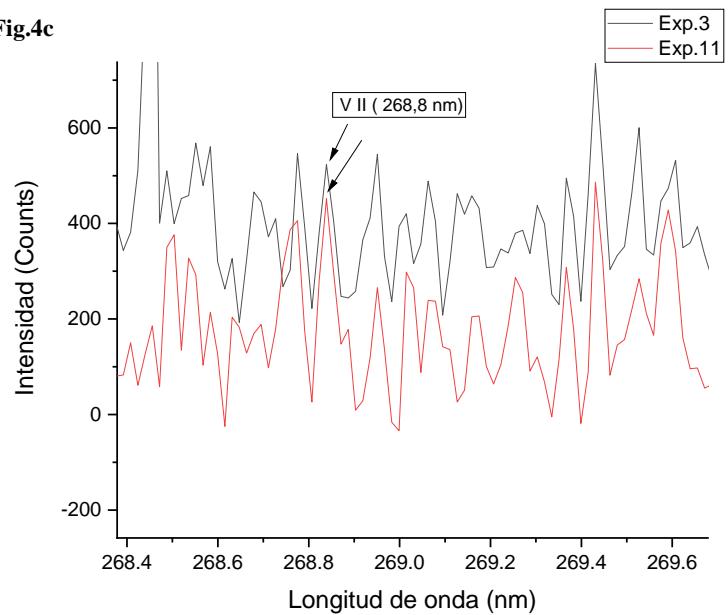
Fig.4b**Fig.4c**

Fig. 4. Comparación entre V I a 370,3 nm (Fig.4a), V I a 439,5 nm (Fig.4b) y V II a 268,8 nm (Fig.4c) para distintos experimentos realizados en el diseño factorial

4. Conclusiones

De acuerdo con el trabajo realizado y los objetivos planteados se puede concluir que:

1. El uso de argón nos permite disminuir el efecto matriz y nos proporciona mayor intensidad en las señales, lo que nos permite realizar una mejor identificación para el vanadio.
2. Al realizar el diseño factorial se han optimizado los siguientes parámetros instrumentales, de acuerdo a la SNR más favorable: Tiempo de delay y tiempo de medida.

Los resultados óptimos fueron:

| Energía de pulso | Tiempo de delay (ns) | Tiempo de medida (ns) |
|------------------|----------------------|-----------------------|
| 9,5 | 1500 | 1000 |
| 9,5 | 1707 | 2000 |

3. Podemos concluir que las mejores condiciones experimentales para realizar este análisis son tiempos altos de delay y tiempos de medida bajos. Por otro lado, la energía de pulso que se utiliza tiene que ser elevada ya que nuestro analito se encuentra en niveles de traza.

4. El uso de la calibración libre es fundamental ya que al trabajar con muestras sólidas nos hemos encontrando ante el problema de no disponer de patrones de referencia para las harinas de pescado, además de esta ventaja, también mejora los problemas relacionados con el efecto matriz.

5. Referencias

- (1) Guevara García, J. A. Una Semblanza de La Química Bioinorgánica Del Vanadio. *Educ. Química* **2018**, 7 (4), 185. <https://doi.org/10.22201/fq.18708404e.1996.4.66648>.
- (2) Gürkan, R.; Korkmaz, S.; Altunay, N. Preconcentration and Determination of Vanadium and Molybdenum in Milk, Vegetables and Foodstuffs by Ultrasonic-Thermostatic-Assisted Cloud Point Extraction Coupled to Flame Atomic Absorption Spectrometry. *Talanta* **2016**, 155, 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.04.012>.
- (3) Lanocha-Arendarczyk, N.; Kosik-Bogacka, D. I.; Kalisinska, E.; Sokolowski, S.; Kolodziej, L.; Budis, H.; Safranow, K.; Kot, K.; Ciosek, Z.; Tomska, N.; Galant, K. Influence of Environmental Factors and Relationships between Vanadium, Chromium, and Calcium in Human Bone. *Biomed Res. Int.* **2016**, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/8340425>.
- (4) Zounr, R. A.; Tuzen, M.; Khuhawar, M. Y. Novel Ultrasonic-Assisted Deep Eutectic Solvent-Based Dispersive Liquid–Liquid Microextraction for Determination of Vanadium in Food Samples by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry: A Multivariate Study. *Appl. Organomet. Chem.* **2018**, 32 (3), 1–9. <https://doi.org/10.1002/aoc.4144>.
- (5) Filippini, T.; Tancredi, S.; Malagoli, C.; Malavolti, M.; Bargellini, A.; Vescovi, L.; Nicolini, F.; Vinceti, M. Dietary Estimated Intake of Trace Elements: Risk Assessment in an Italian Population. *Expo. Heal.* **2019**, No. 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s12403-019-00324-w>.
- (6) Journal, T. E. Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies [NDA] Related to the Tolerable Upper Intake Level of Vanadium. *EFSA J.* **2004**, 2 (3), 1–22. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2004.33>.
- (7) CECOPESCA. Guía Para El Aprovechamiento de Los Subproductos de Pescado. *CPAGE*. 2012, pp 7–15.
- (8) Zavierzo, D. Como Mejorar La Calidad Del Huevo. *nutriNew*. 2016, pp 114–121.
- (9) Miles, R. D.; Henry, P. R. Effect of Time and Storage Conditions on Albumen Quality of Eggs from Hens Fed Vanadium. *J. Appl. Poult. Res.* **2004**, 13 (4), 619–627. <https://doi.org/10.1093/japr/13.4.619>.
- (10) Odabaşı, A. Z.; Miles, R. D.; Balaban, M. O.; Portier, K. M.; Sampath, V. Vitamin C Overcomes the Detrimental Effect of Vanadium on Brown Eggshell Pigmentation. *J. Appl. Poult. Res.* **2006**, 15 (3), 425–432. <https://doi.org/10.1093/japr/15.3.425>.
- (11) Ali, J.; Tuzen, M.; Kazi, T. G. Green and Innovative Technique Develop for the Determination of Vanadium in Different Types of Water and Food Samples by Eutectic Solvent Extraction Method. *Food Chem.* **2019**, 306, 125638. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125638>.
- (12) Anzano, J.; Lasheras, R.-J.; Bello-Gálvez, C. Espectroscopía de Descomposición Inducida Por Láser (LIBS): Una Técnica Emergente En La Química Analítica. *CIENCIA* **2010**, 18 (September), 179–187.
- (13) Musazzi, S.; Perin, U. LIBS Instrumental Techniques. In *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy Theory and Applications*; Springer: New York, 2014; Vol. 182, pp 59–89. https://doi.org/10.1007/978-3-642-45085-3_7.
- (14) Hahn, D. W.; Omenetto, N. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS), Part II: Review of Instrumental and Methodological Approaches to Material Analysis and

- Applications to Different Fields. *Appl. Spectrosc.* **2012**, *66* (4), 347–419. <https://doi.org/10.1366/11-06574>.
- (15) Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, J.; Crouch, S. R. Instrumentos de Espectrometría Óptica. In *Fundamentos de química analítica*; 2015; pp 683–721.
- (16) Harmon, R. S.; Russo, R. E.; Hark, R. R. Applications of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy for Geochemical and Environmental Analysis: A Comprehensive Review. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **2013**, *87*, 11–26. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2013.05.017>.
- (17) Lasheras, R. J.; Bello-Gálvez, C.; Anzano, J. M. Quantitative Analysis of Oxide Materials by Laser-Induced Breakdown Spectroscopy with Argon as an Internal Standard. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **2013**, *82*, 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2013.01.005>.
- (18) Hai, R.; He, Z.; Yu, X.; Sun, L.; Wu, D.; Ding, H. Comparative Study on Self-Absorption of Laser-Induced Tungsten Plasma in Air and in Argon. *Opt. Express* **2019**, *27* (3), 2509. <https://doi.org/10.1364/oe.27.002509>.
- (19) Takahashi, T.; Thornton, B. Quantitative Methods for Compensation of Matrix Effects and Self-Absorption in LIBS Signals of Solids. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **2017**, *138*, 31–42. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2017.09.010>.
- (20) Ciucci, A.; Corsi, M.; Palleschi, V.; Rastelli, S.; Salvetti, A.; Tognoni, E. New Procedure for Quantitative Elemental Analysis by Laser-Induced Plasma Spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* **1999**, *53* (8), 960–964. <https://doi.org/10.1366/0003702991947612>.
- (21) Tognoni, E.; Cristoforetti, G.; Legnaioli, S.; Palleschi, V. Calibration-Free Laser-Induced Breakdown Spectroscopy: State of the Art. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **2010**, *65* (1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2009.11.006>.
- (22) Legnaioli, S.; Lorenzetti, G.; Pardini, L.; Palleschi, V.; Cavalcanti, G. H. Applications of LIBS to the Analysis of Metals. In *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy Theory and Applications*; New York, 2014; pp 169–191.
- (23) Dimaker, P. K. Laser Induced Breakdown Spectroscopy for Analysis of Aerosols. In *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy Theory and Applications*; New York, 2014; pp 227–255.
- (24) Cremers, D. A. Space Applications of LIBS. In *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy Theory and Applications*; New York, 2014; pp 257–283.
- (25) Ashraf Gondal, Mohammed A. Dastageer, M. Elemental Analysis of Soils by Laser Induced Breakdown Spectroscopy. In *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy Theory and Applications*; New York, 2014; pp 293–308.
- (26) Hark, R. R.; East, L. J. Forensic Applications of LIBS. In *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy Theory and Applications*; New York, 2014; pp 377–413.
- (27) Anzano, J. M.; Bello-Gálvez, C.; Lasheras, R. J. Identification of Polymers by Means of LIBS. In *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy Theory and Applications*; New York, 2014; pp 421–438.
- (28) Casanova Pinilla, M. E. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS MAYORITARIOS EN HARINAS DE PESCADO MEDIANTE TÉCNICAS DE ANÁLISIS RÁPIDO, Universidad de Zaragoza, 2020.
- (29) Cruz Conesa, A. Caracterización de Suelos de La Antártida Mediante Espectroscopía de Plasmas Inducidos Por Láser, Universidad de Zaragoza, 2018.

6. Anexos

ANEXO 1. Patente del método LIBS-CL.



(12) **United States Patent**
Palleschi et al.

(10) **Patent No.:** US 6,657,721 B1
(45) **Date of Patent:** Dec. 2, 2003

(54) **METHOD FOR QUANTITATIVE ANALYSIS OF ATOMIC COMPONENTS OF MATERIALS BY LIBS SPECTROSCOPY MEASUREMENTS**

(75) Inventors: **Vincenzo Palleschi**, Pisa (IT);
Elisabeth Tognoni, Pisa (IT);
Allesandro Ciucci, Livorno (IT);
Simone Rastelli, Massa e Cozzile (IT)

(73) Assignee: **Consiglio Nazionale Delle Ricerche**,
Rome (IT)

(*) Notice: Subject to any disclaimer, the term of this patent is extended or adjusted under 35 U.S.C. 154(b) by 0 days.

(21) Appl. No.: **09/646,608**

(22) PCT Filed: **Mar. 18, 1999**

(86) PCT No.: **PCT/EP99/01842**

§ 371 (c)(1),
(2), (4) Date: **Sep. 20, 2000**

(87) PCT Pub. No.: **WO99/49301**

PCT Pub. Date: **Sep. 30, 1999**

(Under 37 CFR 1.47)

(30) **Foreign Application Priority Data**

Mar. 20, 1998 (IT) PI98A0023

(51) Int. Cl.7 G01N 21/63; G01N 21/71

(52) U.S. Cl. 356/318

(58) Field of Search 356/317, 318

(56) **References Cited**
FOREIGN PATENT DOCUMENTS

WO WO 97/15811 A 5/1997

OTHER PUBLICATIONS

Goodard B J: "Materials analysis using laser-based spectroscopic techniques" Transactions of the Institute of Measurement and Control, 1991, UK, vol. 13, No. 3, pp. 128-139.

Song K et al: "Applications of Laser-Induced Breakdown Spectrometry" Applied Spectroscopy Reviews, vol. 32, No. 3, Aug. 1997, pp. 183-235.

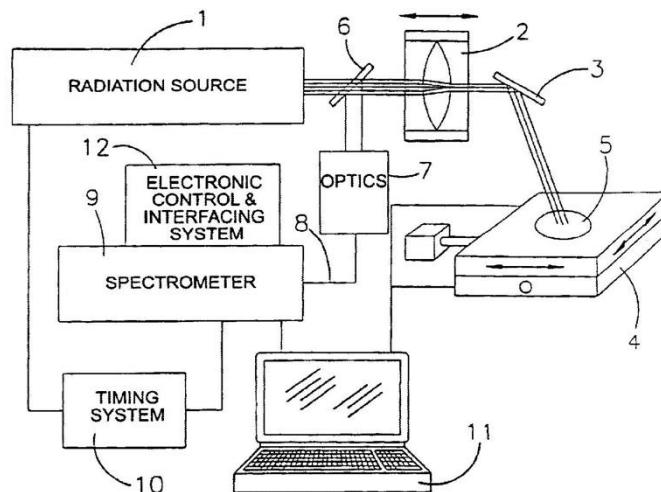
Primary Examiner—F. L. Evans

(74) Attorney, Agent, or Firm—Nixon & Vanderhye, P.C.

(57) **ABSTRACT**

A method based on the LIBS technique is described, which allows to determine, without calibration of the measurement system, the concentration of atomic components in solid, liquid and aerial samples. The method comprises: (a) obtaining the plasma temperature (T) of at least one species of the emitted radiation; (b) determining the partition function $U(T)$ of each species of the emitted radiation at the plasma temperature; (c) calculating the concentration value of each species once deducted an experimental factor (F); (d) calculating the concentration value of each non-individuated species by Saha equation; (e) calculating the concentration of atomic components as sum of the corresponding species concentrations; (f) measurement of the concentration of components by eliminating the experimental factor through normalization.

15 Claims, 4 Drawing Sheets



ANEXO 2. Reciente publicación sobre análisis de alimentos mediante LIBS, del grupo Química y Medio Ambiente (LIBS)

APPLIED SPECTROSCOPY REVIEWS
<https://doi.org/10.1080/05704928.2020.1810060>



Check for updates

Rapidly growing trends in laser-induced breakdown spectroscopy for food analysis

Abrahan Velásquez-Ferrín^{a,b}, Diego Victor Babos^{a,c}, César Marina-Montes^a, and Jesús Anzano^a

^aLaser Laboratory, Chemistry & Environment Group, Faculty of Sciences, Department of Analytical Chemistry, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain; ^bFaculty of Agricultural Sciences, Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, Manta, Ecuador; ^cGroup of Applied Instrumental Analysis, Department of Chemistry, Federal University of São Carlos, São Carlos, Brazil

ABSTRACT

Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) is a simple, rapid, and sensitive analytical technique that has been employed in a number of scientific disciplines (e.g., chemistry, physics, geology, engineering, material science, polymer science, environmental science, and metallurgy) for almost two decades. LIBS became vastly popular in industry, especially in steel, automobile, and aircraft manufacturing due to the availability of portable instruments and rapid analysis. As the technique can be employed for simultaneously analyzing both light and heavy elements, LIBS has attracted global attention for its food analysis capabilities to characterize micronutrients, essential constituents, and toxicants present in food items. No other technique provides such comprehensive analytical data in a short period of time without any substantial sample treatment. This paper reviews applications of LIBS for food analysis in recent years and discusses its potential to advance the characterization of components in food.

KEYWORDS

Laser-induced breakdown spectroscopy; food adulteration; food classification; spectroscopic techniques

ANEXO 3. Normas específicas y hoja de compromiso en el laboratorio láser.



Departamento de
Química Analítica
Universidad Zaragoza



- D./Dña....., con DNI matriculado en el Grado/Máster/Doctorado de.....en la asignatura de....., he sido informado(a) y soy conocedor(a) del contenido del documento "lásares: riesgos en su utilización", he realizado el curso "on line" de seguridad láser facilitado por el laboratorio láser de la Universidad de Zaragoza y me comprometo a cumplir las normas de trabajo y seguridad que se me indican:
- Avisar al responsable del laboratorio de que se va a utilizar un equipo láser.
 - Me comprometo a leer toda la información que se me facilite de seguridad láser.
 - Conectar la luz de visualización de funcionamiento láser en la puerta del laboratorio.
 - Prestar especial atención al alto voltaje del equipamiento electro-óptico del laboratorio.
 - Utilizar siempre gafas especiales dependiendo de la longitud de onda del láser.
 - Proteger las manos con guantes especiales.
 - Apagar el teléfono cuando se trabaja con el láser.
 - Ubicar al láser de manera que el haz no esté a la altura de los ojos.
 - Nunca alinear el haz usando el ojo.
 - Los blancos donde se dirija el haz deberían ser de un material absorbente de luz, para prevenir reflexiones.
 - No usar cadenas, relojes u objetos que puedan reflejar un haz indeseadamente.
 - Consultar a un oftalmólogo si nota que su ojo ve una "imagen fantasma" en la retina.
 - Evitar a "curiosos" en la zona de trabajo.

Por lo que firmo la presente en Zaragoza, a de 2017.

Firma de la alumna
Firma del alumno

