

IV. MÉTODOS EXPERIMENTALES.

IV. MÉTODOS EXPERIMENTALES.

1. CONSIDERACIONES GENERALES.

Para la realización del presente proyecto se han llevado a cabo diversos muestreos a lo largo de la zona objeto de nuestro estudio. En concreto, han sido seleccionados nueve puntos, distribuidos tanto por las aguas de la bahía de Cádiz como la de Algeciras, de *balanus spp.*, así como veintitrés muestras de aguas localizadas en la misma área.

Las distintas muestras de *balanus spp.* fueron recogidas en dos muestreos sucesivos, correspondientes a cada una de las bahías gaditanas, a principios del mes de Febrero del año 2003, mientras que las muestras de aguas fueron conseguidas a partir de cuatro muestreos repartidos a lo largo del año 2002.

2. TOMA DE MUESTRAS.

2.1 INTRODUCCIÓN.

En el proceso de muestreo y transporte al laboratorio fueron adoptadas las medidas necesarias para mantener intacta la composición de las muestras y conseguir así conservar la representatividad de las mismas.

La toma y preservación de las muestras se han realizado de acuerdo con las normas ISO (ISO 5667/3-1985 E) y con las recomendaciones recogidas en el "Standar Methods" (SM 1060 B y 1060 C).

2.2 LOCALIZACIÓN DE LOS PUNTOS DE MUESTREO.

La ubicación de los distintos puntos donde fueron tomadas las muestras, tanto de aguas como de *balanus spp.*, para la determinación del contenido en

metales de las dos bahías, se llevó a cabo con el objetivo de que los datos obtenidos fueran representativos del área bajo estudio.

Para ello se han seguido dos criterios fundamentales:

1. Obtener una distribución espacial homogénea de los puntos de muestreo a lo largo de las aguas costeras de ambas bahías.
2. Conseguir detectar la posible influencia de los núcleos industriales y urbanos localizados en la zona de estudio.

En función de estos criterios, la localización de los puntos se llevó a cabo de la siguiente forma:

a) Para los *balanus spp.* se fijaron nueve enclaves distribuidos según:

- Cinco puntos en la bahía de Algeciras (ver figura 9).
- Cuatro puntos en la bahía de Cádiz (ver figura 10).

En las tablas 10 y 12 se muestra la ubicación de los puntos.

b) Para las muestras de aguas se fijaron veintitrés enclaves distribuidos según:

- Trece puntos en la bahía de Algeciras (ver figura 9).
- Diez puntos en la bahía de Cádiz (ver figura 10).

En las tablas 9 y 11 se muestra la ubicación de los puntos.

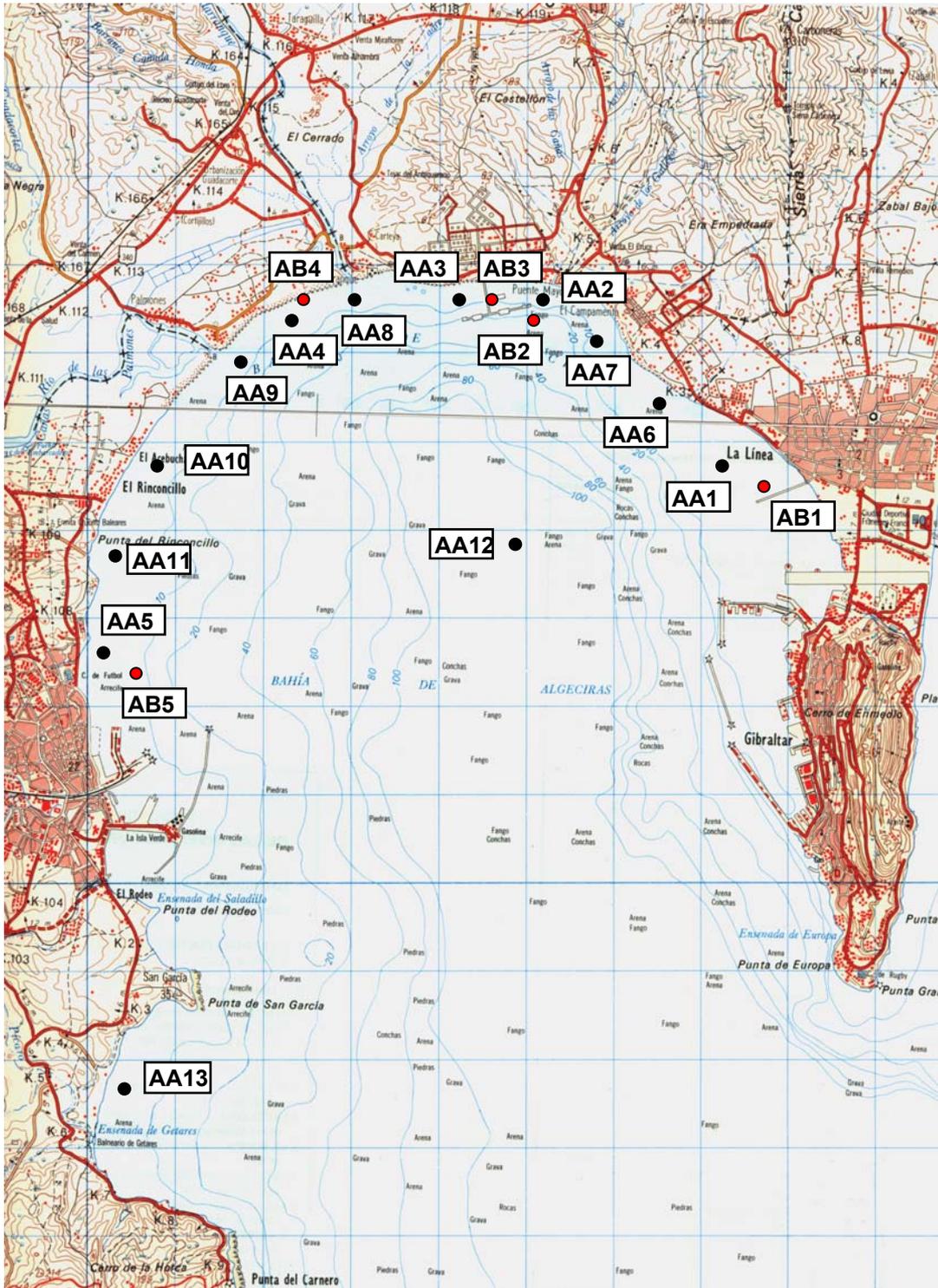


Figura 9. Localización de los puntos de toma de muestras de aguas y *balanus spp.* en la bahía de Algeciras.

- Muestreos de aguas.
- Muestreos de *balanus spp.*

Tabla 9: Situación de los puntos de muestreo de aguas en la bahía de Algeciras.

ZONA DE ESTUDIO	DENOMINACIÓN	COORDENADAS UTM	LOCALIZACIÓN
BAHÍA DE ALGECIRAS	AA1	X 287206,8 Y 4004566,1	La Línea de la Concepción
	AA2	X 285235,4 Y 4006716,1	Puente Mayorga
	AA3	X 285235,4 Y 4006716,1	Pantalán de CEPSA
	AA4	X 282467,3 Y 4006284,2	Puerto de Gibraltar-Intercar
	AA5	X 280173,5 Y 4002567,5	Algeciras
	AA6	X 286849,3 Y 4005361,7	La Línea de la Concepción
	AA7	X 284224,1 Y 4006625,5	Astilleros de Crinavis
	AA8	X 283124,6 Y 4006503,3	Desembocadura del río Guadarranque
	AA9	X 281602,5 Y 4005938,3	Desembocadura del río Palmones
	AA10	X 280922,1 Y 4005027,3	Playa del Rinconcillo
	AA11	X 280483,9 Y 4003920,3	Playa del Rinconcillo
	AA12	X 284135,1 Y 4004021,9	Centro de la bahía
	AA13	X 280508,1 Y 4997685,3	Ensenada de Getares

Tabla 10: Situación de los puntos de muestreo de *balanus spp.* en la bahía de Algeciras.

ZONA DE ESTUDIO	DENOMINACIÓN	COORDENADAS UTM	LOCALIZACIÓN
BAHÍA DE ALGECIRAS	AB1	X 287875,8 Y 4003979,7	Muelle pesquero de La Línea de la Concepción
	AB2	X 285373,2 Y 4006602,3	Puente Mayorga
	AB3	X 284426,8 Y 4006719,8	Muelle petrolero de CEPSA
	AB4	X 282740,2 Y 4006344,5	Muelle de la central térmica Los Barrios
	AB5	X 280344,4 Y 4001800,2	Muelle pesquero de Algeciras

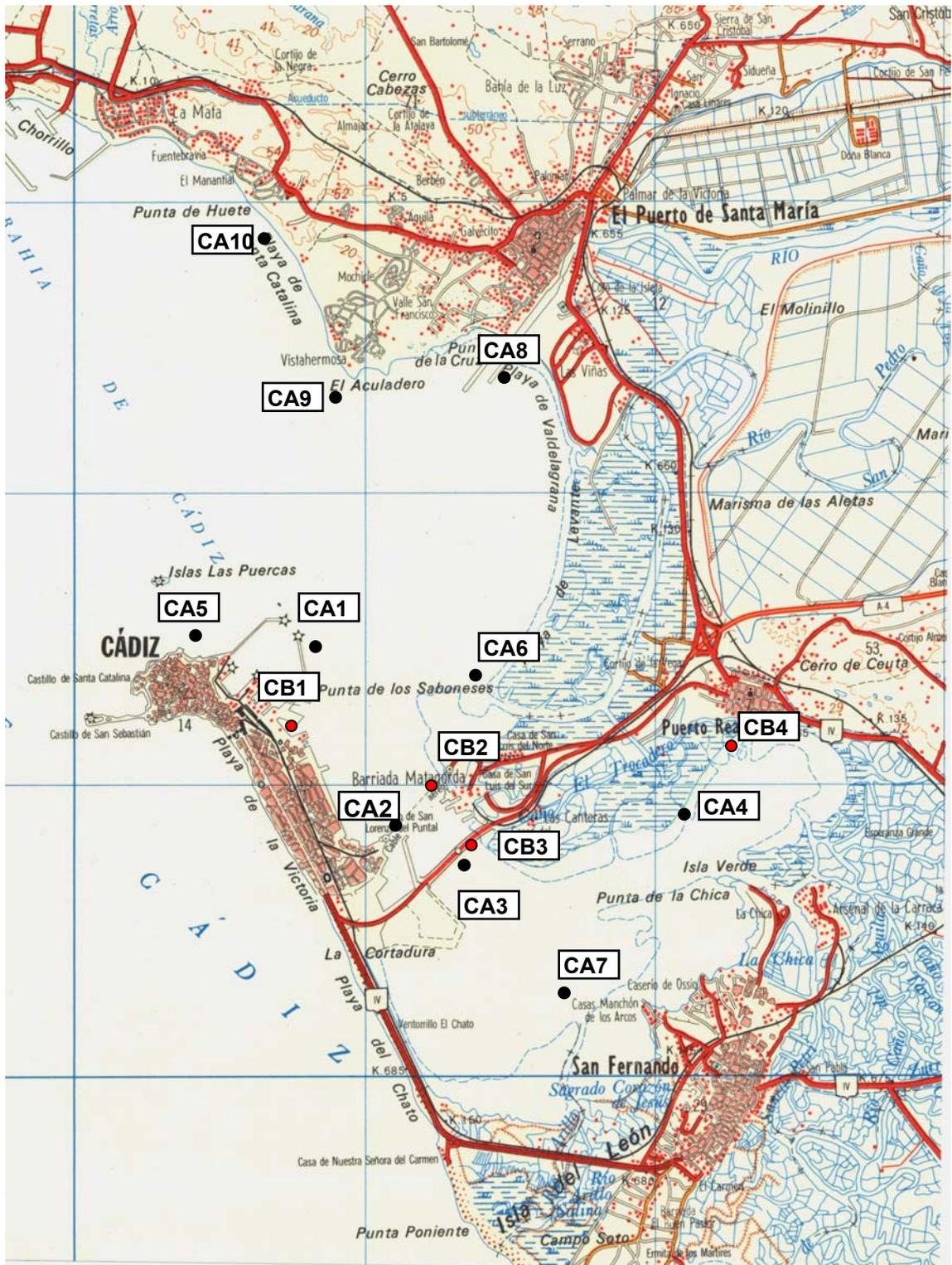


Figura 10: Localización de los puntos de toma de muestras de agua y *balanus spp.* en la bahía de Cádiz.

- Muestreos de aguas.
- Muestreos de *balanus spp.*

Tabla 11: Situación de los puntos de muestreo de aguas en la bahía de Cádiz.

ZONA DE ESTUDIO	DENOMINACIÓN	COORDENADAS UTM	LOCALIZACIÓN
BAHÍA DE CÁDIZ	CA1	X 207281,7 Y 4049098,0	Cádiz (Puerto comercial)
	CA2	X 208219,3 Y 4045790,8	Club Náutico
	CA3	X 209346,4 Y 4044870,7	Puente Ramón de Carranza
	CA4	X 212798,3 Y 4045245,6	Isla Verde
	CA5	X 205003,0 Y 4049509,5	Cádiz
	CA6	X 209940,2 Y 4049066,4	Playa de Levante
	CA7	X 211345,7 Y 4043246,3	San Fernando
	CA8	X 210858,0 Y 4052721,8	Playa de Valdelagrana
	CA9	X 207742,0 Y 4052819,8	Vistahermosa
	CA10	X 206201,9 Y 4056030,2	Playa de Santa Catalina

Tabla 12: Situación de los puntos de muestreo de *balanus spp.* en la bahía de Cádiz.

ZONA DE ESTUDIO	DENOMINACIÓN	COORDENADAS UTM	LOCALIZACIÓN
BAHÍA DE CÁDIZ	CB1	X 207090,85 Y 4048682,54	Puerto de la planta Delta
	CB2	X 209383,26 Y 4045584,85	Puerto de Astilleros de Puerto Real
	CB3	X 209114,16 Y 4045064,86	Puente Ramón de Carranza
	CB4	X 214390,39 Y 4046996,96	Puerto pesquero de Puerto Real

3. PRESERVACIÓN DE LAS MUESTRAS.

3.1 INTRODUCCIÓN.

Un factor fundamental a tener en cuenta en el proceso de toma y análisis de una muestra es el tiempo transcurrido desde su obtención en el lugar de muestreo y su posterior análisis en el laboratorio. Durante este período pueden producirse modificaciones en el estado de las muestras debido a factores como la temperatura, composición de los recipientes, etc. Por esta razón es necesario tomar las medidas adecuadas para asegurar la preservación de las muestras y de esta manera conseguir unos resultados que reflejen fielmente el valor del parámetro a analizar.

3.2 PRESERVACIÓN DE LAS MUESTRAS DE AGUA.

Sobre la base de la información bibliográfica disponible, se empleó la siguiente sistemática de preservación de las muestras de agua:

- Los envases utilizados en la toma de muestra, el tipo de agente preservante y el tiempo máximo que puede transcurrir entre la toma y la determinación de los parámetros se muestran en la tabla 13.
- Los envases empleados fueron tratados con ácido nítrico diluido [1:1] y posteriormente se enjuagaron repetidas veces con agua pura hasta la eliminación total de la acidez.
- El material de laboratorio empleado fue tratado previamente con ácido nítrico diluido [1:1], para después ser aclarado sucesivamente con agua destilada, bidestilada y ultrapura.

Tabla 13: Condiciones de preservación de muestras de aguas.

PARÁMETRO	TIPO DE ENVASE	TÉCNICAS DE PRESERVACIÓN	TIEMPO MÁXIMO
Arsénico, Níquel, Cobre, Manganeso, Cinc, Hierro, Plomo, Cromo y Cadmio	Polietileno	Filtración con filtro 0,45 μm y posterior acidificación hasta $\text{pH} < 2$ con HNO_3	2 meses
Mercurio	Polietileno	Filtración con filtro 0,45 μm , adición 2ml/l de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 20% (p/v) en HNO_3 (1:1) y refrigeración a 4°C	2 meses

3.3 PRESERVACIÓN DE LAS MUESTRAS DE *BALANUS SPP.*

El proceso de preservación y preparación de las muestras se extiende desde la toma hasta el posterior ataque y análisis de las mismas.

El esquema seguido fue el siguiente:

- Toma de muestras en los puntos elegidos según los criterios del apartado 2.2. A continuación se muestran unas imágenes de un grupo de *balanus spp.* adherido a los pilotes de los muelles, de donde son desprendidos mediante espátulas.



Fotografía 4: Grupo de *balanus spp.* adherido a los pilotes de los muelles.



Fotografía 5: Grupo de *balanus spp.* adherido a los pilotes de los muelles.

- Transporte en neveras desde el punto de muestreo hasta los laboratorios para evitar la putrefacción de los organismos.
- Colocación de las muestras sobre papel secante en la mesa de trabajo.
- Extracción de los escaramujos de su “caparazón” mediante palillos de madera para evitar una posible contaminación. Esta operación requiere un especial cuidado en orden a conseguir una extracción “limpia” del escaramujo, es decir, sin restos de conchas o líquenes que llevarían a la obtención de resultados no representativos en el análisis.
- Colocación de los escaramujos obtenidos en cápsulas Petri previamente identificadas con la muestra con la que se está trabajando.
- Congelación de las cápsulas Petri hasta el momento de la digestión y análisis de las muestras.

4. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

4.1 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE AGUA.

4.1.1 INTRODUCCIÓN.

En la siguiente figura se muestran los tratamientos previos al análisis así como los parámetros analizados en las muestras de aguas:

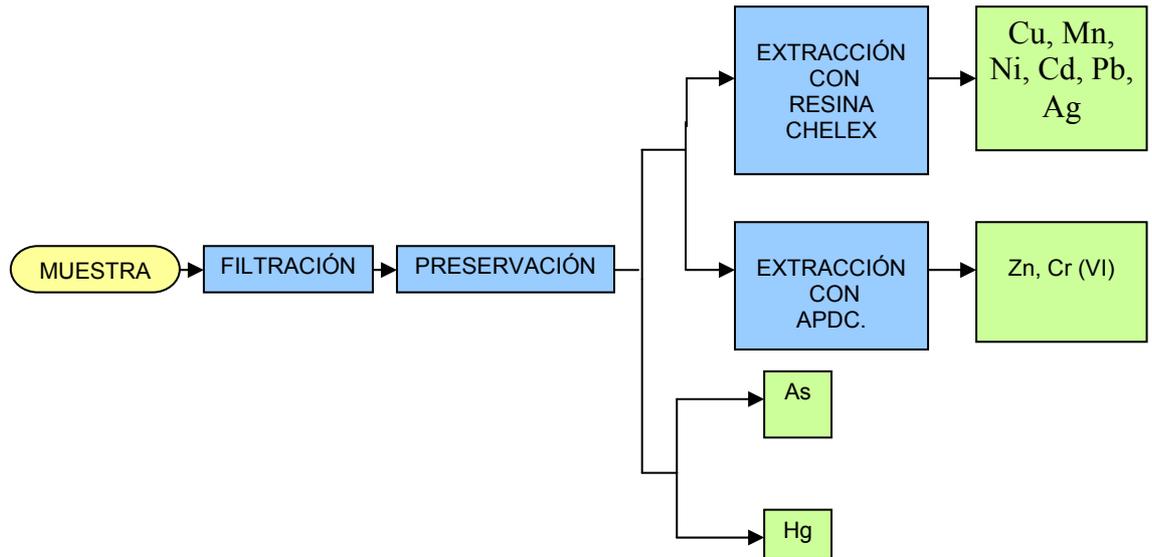


Figura 11: Parámetros analizados y tratamientos previos de las muestras de aguas.

En este estudio ha sido necesario cuantificar bajas concentraciones de metales en una matriz, que debido a su alto contenido en sales, podía ocasionar interferencias. Por este motivo se han empleado técnicas que concentran estos elementos y los separan de su matriz interferente.

En los métodos de extracción y concentración seleccionados, los metales se separaron sobre una fase orgánica.

4.1.2 PROCESOS DE EXTRACCIÓN Y CONCENTRACIÓN DE METALES.

Extracción y concentración con APDC-MIBC de zinc y cromo (VI).

a) Fundamento del método.

En este método, los metales se acomplejan, empleando como agente quelante el pirolidin ditiocarbamato de amonio (APDC), y estos complejos se extraerán con metil isobutil cetona (MIBC). Este

procedimiento tiene la ventaja de que, al menos, parte de los componentes de la matriz se quedan en el disolvente acuoso, lo que derivan en una reducción de las interferencias. Este método permite alcanzar un factor de concentración de 10 para 250 ml de muestra.

b) Reactivos.

1. Agua ultrapura ($<18,3 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$).
2. Acido nítrico 65% de MERCK, calidad suprapur®.
3. Metil isobutil cetona (MIBC) de MERCK, calidad para análisis por extracción.
4. Solución de amonio pirolidin ditiocarbamato (APDC) al 2%. Se preparó diariamente disolviendo 2 g de APDC sal amónica de MERCK para análisis en 100 ml de agua ultrapura.
5. Solución de hidróxido sódico (NaOH al 20%). Disolver en un vaso de precipitado 20 g de NaOH de MERCK para análisis de 100 ml de agua ultrapura.
6. Solución de cloruro amónico de pH 9. Se disolvieron 25 g de sal en 100 ml de agua ultrapura. El pH se ajustó con solución de NaOH al 20 %.
7. Soluciones patrón de cinc, hierro y cromo (VI) de 1000 mg/l de MERCK.
8. Sulfato sódico anhidro de MERCK para análisis.

c) Equipos

- PH-metro modelo microPH 2001 de CRISON.
- Agitador de vaivén modelo AVV-1 serie B de SBS.

- Agitador magnético “Agimatic-N” de J:P:SELECTA.

d) Calibración.

En matraces aforados de 500ml se prepararon diversas concentraciones crecientes de soluciones patrón de cinc, cromo (VI) y hierro, añadiendo en todas ellas 1 ml de HNO₃ concentrado y enrasando con agua ultrapura. A continuación se trataron igual que las muestras, salvo en la adición de APDC al 2% y MIBC, donde se doblaron los volúmenes añadidos para mantener las proporciones,

e) Procedimiento.

- Medir 250 ml de muestra en una probeta graduada.
- Pasar a un vaso de precipitado, lavando las probetas con 10 ml de agua ultrapura.
- Elevar el pH entre 2 y 2.5 con NaOH al 20% concentrado. Ajustar posteriormente el pH a 3.5 ± 0.1 con la solución de CINH₄. En este rango de pH los metales forman complejos más estables con el agente quelante.
- Verter sobre un embudo de decantación de 1 litro, lavando los vasos con 25 ml de agua ultrapura.
- Añadir 25 ml de solución de APDC al 2% y tras homogeneizar bien con el fin de que se produzca la quelación del metal con el APDC, añadir 25 ml de MIBC mediante dosificador para extraer este complejo. Agitar durante 10 minutos en un agitador de vaivén o bien durante 5 minutos de forma manual.

- Dejar decantar durante una hora como mínimo en la oscuridad y preferentemente a baja temperatura.
- Recoger la fase orgánica en tubos de ensayo donde previamente se habrá añadido SO_4Na_2 anhídrido para eliminar trazas de agua.

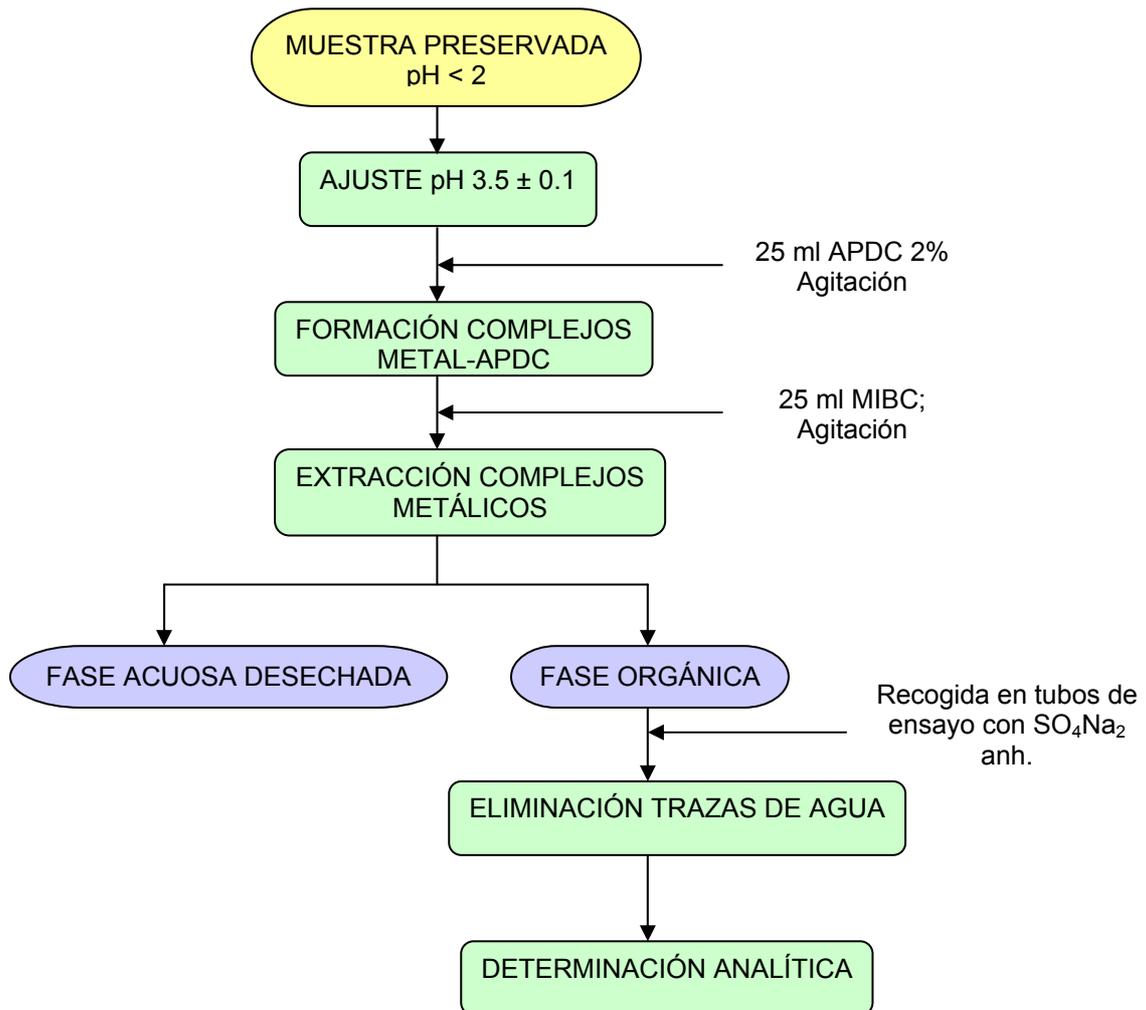


Figura 12: Método de extracción y concentración de cinc y cromo (VI).

Extracción y concentración con resina CHELEX-100 de cobre, manganeso, cadmio, níquel, plomo y plata en agua de mar.

a) Fundamento del método:

Preconcentración y eliminación de interferencias de las muestras a su paso a través de una resina de intercambio iónico. Posteriormente los contenidos de Cu, Mn, Cd, Ni, Pb y Ag se determinaron mediante espectrofotometría de absorción atómica electrotérmica (SM 3113A) con corrector Zeeman. Este método permite alcanzar un factor de concentración de 40 para 1000 ml de muestra, habiéndose partido para su elaboración de los trabajos publicados por Kingston et al. (1978) y Batistoni et al. (1996) con ligeras modificaciones.

b) Reactivos:

1. Ácido nítrico 2.5 M; se prepara a partir de HNO₃ suprapur[®] mediante diluciones adecuadas.
2. Solución de amoníaco 2 M; se prepara a partir de NH₃ suprapur[®] mediante las diluciones adecuadas.
3. Solución de amoníaco suprapur[®] mezclado a volúmenes iguales con agua ultrapura.
4. Solución de acetato de amonio 1 M (pH 5.2): disolver 77.08 grs. De acetato de amonio para análisis con agua ultrapura, ajustando el pH con HNO₃ suprapur[®] sin diluir, antes de enrasar a 1000 ml.. A continuación, se pasa la solución a través de la resina CHRLEX-100 de manera análoga a como se haría con una muestra, eliminando la etapa de elusión selectiva de metales interferentes (Na, K, Ca, Mg).
5. Agua ultrapura (18.3 MΩ cm⁻¹).
6. Soluciones patrón de cobre, manganeso, cadmio, níquel, cromo y plata 1000mg/l de MERCK.
7. Resina de intercambio iónico CHELEX-100 (200-400 mallas) de laboratorios BIO RAD, en su forma sódica.

c) Material y equipos:

- Agitador magnético "Agimatic-N" de J.P.SELECTA.
- Balanza SARTORIUS BL 1500.
- pH-metro mod. GLP 21, de la casa CRISON, al igual que las soluciones buffer empleadas.
- Columnas cromatográficas para intercambio iónico de vidrio, suministradas por la casa ÁLAMO (mod. N° 2) de 20 cm. de longitud y 2 cm. de diámetro interior, con llaves de paso de teflón y disco de vidrio sinterizado soldado en su base.

d) Preparación de la columna y procedimiento de purificación:

- Rellenar la columna con resina CHELEX-100 (200-400 mallas) en su forma sódica. Para 1000 ml de muestra utilizar 6 ml de resina.
- Lavar la resina con 30 ml de HNO_3 2.5 M, en porciones de 5 ml, para eliminar posibles contaminaciones por metales traza presentes en la columna y, con 2 volúmenes de 5 ml de agua ultrapura con el fin de eliminar el ácido.
- Añadir 15 ml de amoníaco 2 M en alícuotas de 5 ml, con el fin de transformarla resina a la forma NH_4^+ ; chequear el pH del efluente para asegurar la basicidad de éste, y en caso contrario, adicionar otros 5 ml de amoníaco 2 M.
- Lavar, por último, la resina con 15 ml de agua ultrapura en alícuotas de 5 ml para eliminar el exceso de amoníaco.

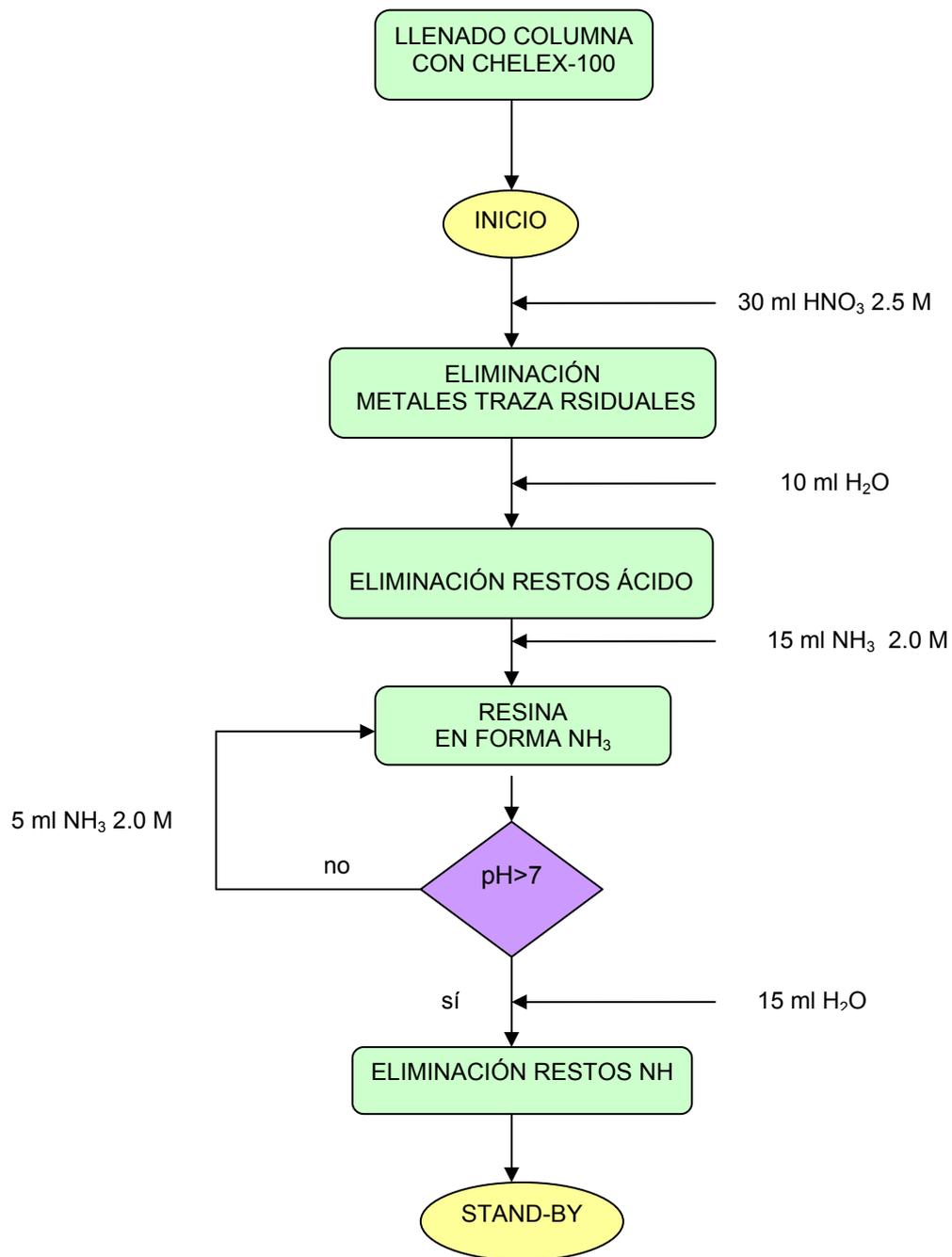


Figura 13: Preparación de la columna y procedimiento de purificación.

e) Preparación de la muestra:

Tomar 1000 ml de muestra y añadir 5 ml de acetato de amonio 1 M para ayudar a tamponar el sistema. A continuación ajustamos su pH a 5.20 ± 0.05 mediante la adición del reactivo 3. Si fuera necesario bajar el pH durante el ajuste, se emplearía HNO_3 suprapur[®] diluido.

f) Procedimiento de separación y preconcentración:

Una vez preparada la muestra y situada en el embudo en altura, se procede como sigue:

- Lavar la resina con 15 ml de agua ultrapura para eliminar el posible exceso de amoníaco.
- Hacer fluir la muestra a través de la columna con una velocidad inferior a 0.2 ml/min (aprox. 20 segundos entre gota y gota) hasta que la concentración de la resina se haya completado (2 a 3 minutos) y aumentar entonces el flujo a 1.0 ml/min.
- A continuación pasar a través de la columna 70 ml de acetato de amonio 1 M (pH 5.2) con una velocidad de flujo de 0.5 ml/min. De esta forma se produce una elusión selectiva de los metales alcalinos y alcalinotérreos (Na, K, Ca, Mg).
- Lavar la columna con 15 ml de agua destilada, en alícuotas de 5 ml, con el fin de eliminar el acetato de amonio.
- Fluir por último, los metales traza con 5 alícuotas de 5 ml de HNO_3 2.5 M. El eluato se recoge en un matraz aforado de 25 ml.
- Finalmente, y a la espera de medir el eluato recogido en el espectrofotómetro, se procede a preservar la resina hasta la siguiente muestra, repitiendo cada uno de los pasos de la etapa d), a excepción del primero.

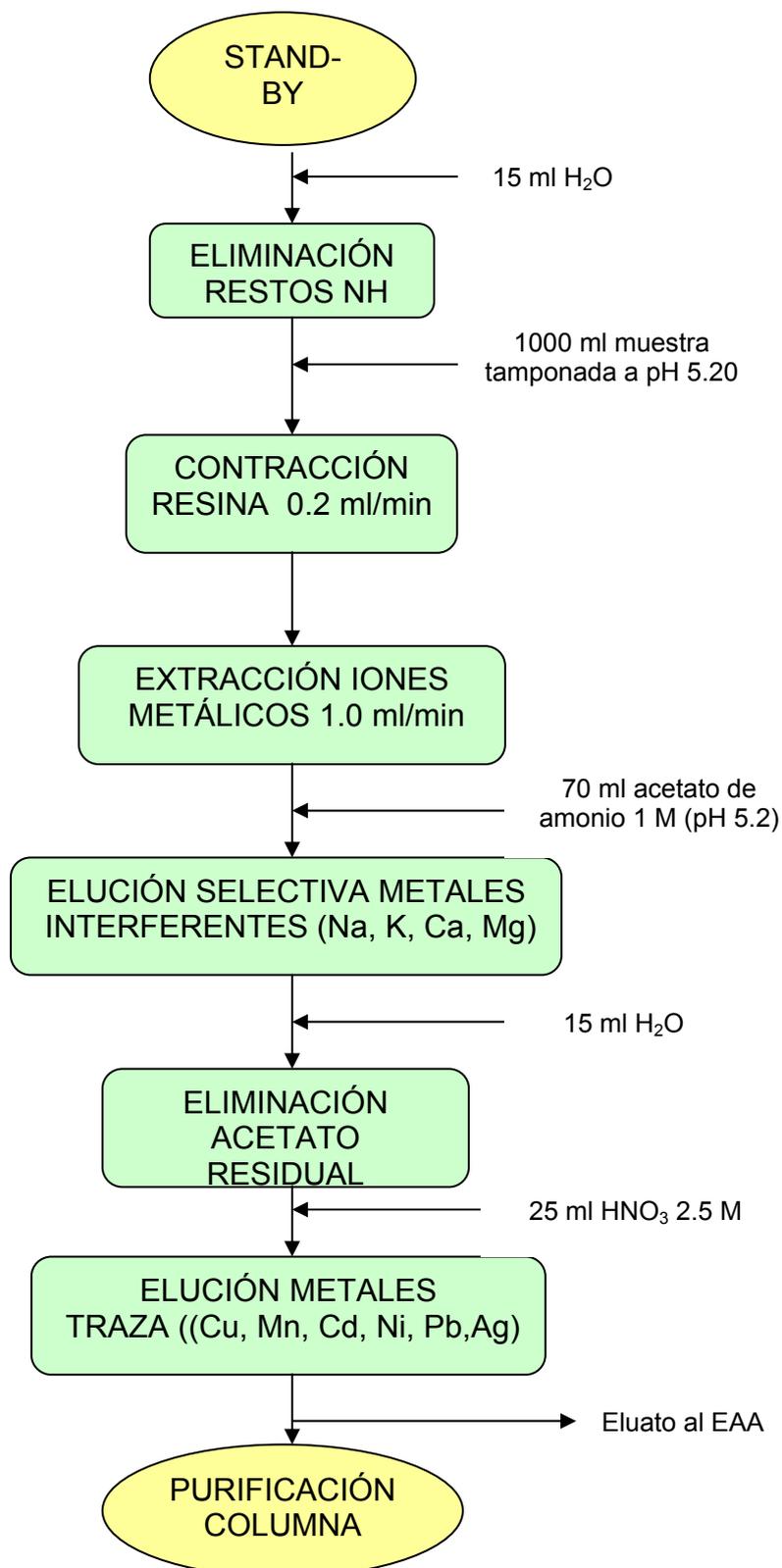


Figura 14: Procedimiento de separación y preconcentración.

4.2 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE *BALANUS SPP.*

4.2.1 INTRODUCCIÓN.

A continuación, aparece un esquema de los tratamientos previos a los que fueron sometidas las muestras de *balanus spp.* Así como de los parámetros analizados en las mismas:

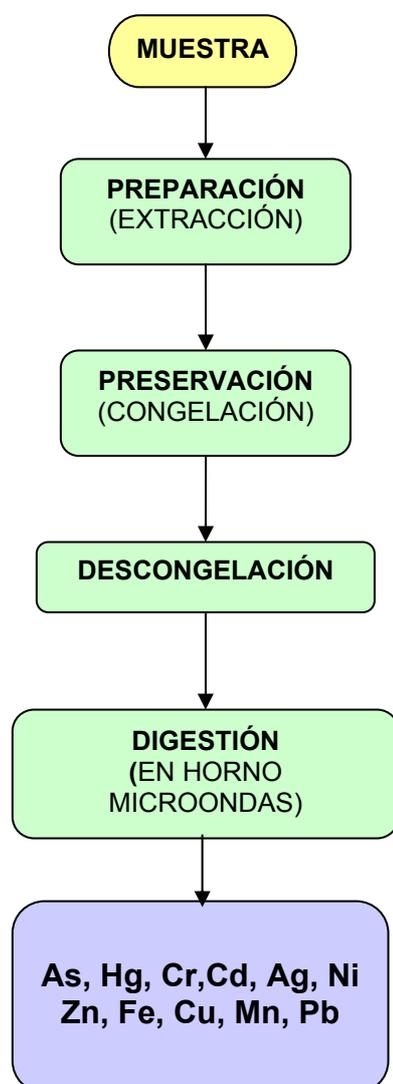


Figura 15: Parámetros analizados y tratamientos previos de las muestras de *balanus spp.*

4.2.2 DIGESTIÓN DE LAS MUESTRAS DE *BALANUS SPP.*

La disolución de las muestras se hizo por vía húmeda en recipientes cerrados, utilizando un horno microondas.

a) Fundamento.

Las radiaciones emitidas por el horno microondas provocan la rotación de las moléculas o iones, lo que da lugar a fricciones entre las mismas y por tanto un calentamiento.

Normalmente se utilizan recipientes que son transparentes a las radiaciones de microondas de manera que esta penetra en el sólido o líquido calentando toda la masa y no solo las moléculas superficiales.

En nuestro caso los recipientes utilizados son de teflón, los cuales se caracterizan por ser inertes químicamente, es decir, no se ven atacados por los ácidos calientes, y además son transparentes a las radiaciones. Estos recipientes (llamados también reactores) van provistos de una válvula de seguridad y una tapadera para que queden herméticamente cerrados (ver Figura 16).

Aunque el fin principal de utilizar recipientes cerrados es trabajar con una mayor presión, este hecho tiene otras dos ventajas, no existe pérdida de volátiles y no hay riesgo de contaminación.

Una de las ventajas de los hornos microondas es su rapidez, por un lado las ondas microondas atraviesan el recipiente sin problemas llegando a toda la masa de ácido y por otro lado se trabaja a alta presión y temperatura (ver Figura 17).

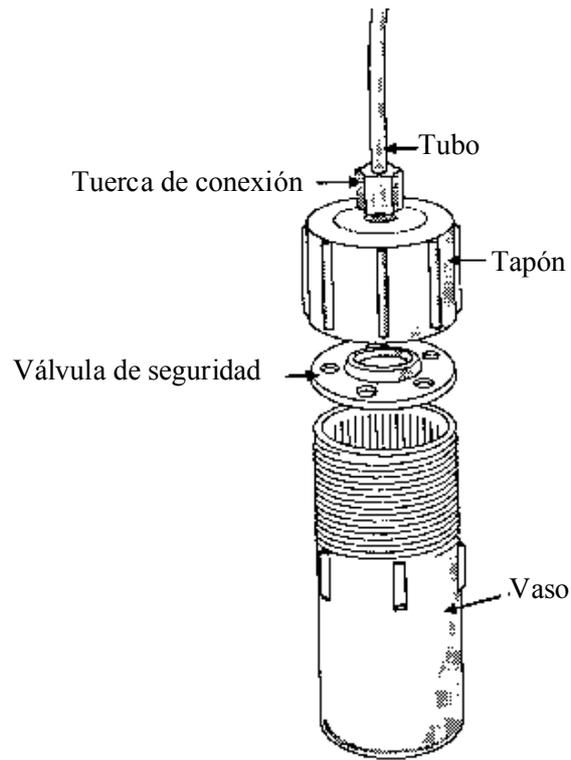


Figura 16: Reactor de teflón.

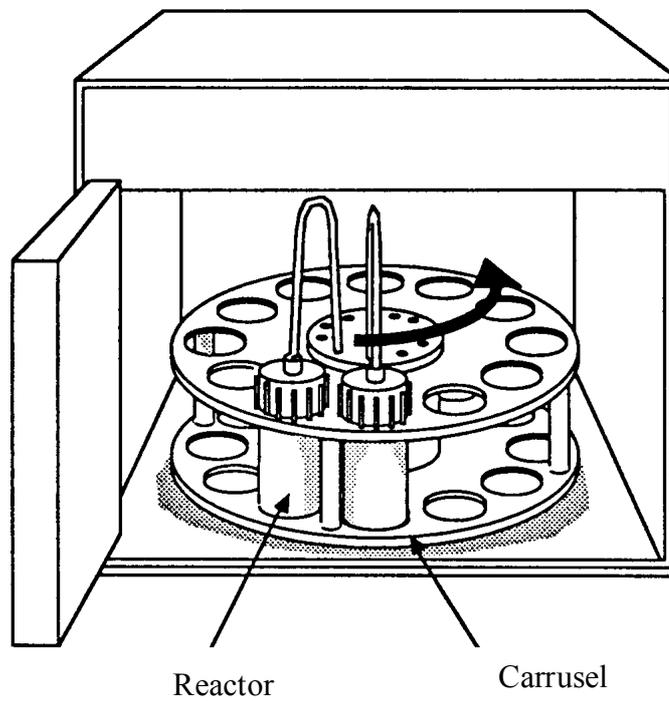


Figura 17: Horno microondas

b) Reactivos.

1. Acido nítrico 65% de MERCK, calidad suprapur®.
2. Peróxido de hidrogeno 30% de MERCK, calidad suprapur®.
3. Agua ultrapura ($<18,3 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$).

c) Equipos.

- Horno microondas MILESTONE MLS 1200.
- Balanza analítica.

d) Procedimiento.

La secuencia de operaciones realizada con cada muestra (analizadas por duplicado) fue la siguiente:

- Pesar 3g aproximadamente de cada una de las muestras en una balanza analítica mediante el uso de vidrios de reloj (se debe conocer la cantidad exacta de muestra pesada).
- Introducir la cantidad de muestra pesada en los reactores del microondas y añadir 5ml de ácido nítrico. Dejar reposar durante 30 min.
- Cerrar los reactores e introducirlos en el horno microondas donde se someten a un primer ataque según el programa 6 (tiempo: 5 min, potencia: 240 w; tiempo: 5 min, potencia: 480 w).
- Extraer los reactores y dejar enfriar. Una vez fríos, retirar la tapa y añadir 1 ml de peróxido de hidrógeno. A continuación volver a cerrar e introducir de nuevo en el horno para someterlos a un segundo y último ataque según el programa

7 (tiempo: 5 min, potencia: 300 w; tiempo: 5 min, potencia: 600 w).

- Finalizado el ataque, retirar los reactores y dejarlos enfriar hasta temperatura ambiente. Seguidamente, abrir y verter el contenido de los mismos en matraces aforados de 50 ml para enrasarlos posteriormente con agua pura.

NOTA: Todo el material empleado en el proceso de ataque descrito fue tratado previamente con ácido nítrico diluido [1:1], agua destilada y agua pura sucesivamente, para evitar la contaminación de las muestras con los metales que se iban a analizar.

5. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS.

5.1 INTRODUCCIÓN

La determinación de los diferentes metales se llevó a cabo mediante distintas técnicas de espectroscopia de absorción atómica (EAA) que aparecen expuestas en las siguientes tablas:

Tabla 14: Técnicas empleadas con las muestras de *balanus spp.*

ELEMENTOS	TÉCNICA ANALÍTICA
Arsénico	EAA con generador de hidruros
Mercurio	EAA sin llama con técnica de vapor frío
Zinc	EAA con llama aire-acetileno previa dilución de la muestra
Cobre, Manganeso, Hierro	EAA con llama aire-acetileno sin dilución de la muestra
Plomo, Cromo, Plata, Níquel, Cadmio	EAA electrotérmica con corrector Zeeman

EAA: Espectroscopia de Absorción Atómica.

Tabla 15: Técnicas empleadas con las muestras de aguas.

ELEMENTOS	TÉCNICA ANALÍTICA
Arsénico	EAA con generador de hidruros
Mercurio	EAA sin llama con técnica de vapor frío
Cromo (VI), Zinc	EAA con llama aire-acetileno previa extracción con APDC/MIBC
Cobre, Manganeso, Cadmio, Níquel, Plomo, Plata.	EAA electrotérmica con corrector Zeeman, previa extracción con resina CHELEX-100.

EAA: Espectroscopia de Absorción Atómica.

La elección de uno u otro método se realizó en función de la cantidad de elemento presente en cada muestra, permitiendo la cámara de grafito medir concentraciones varios órdenes de magnitud inferiores a las medidas con la llama. Además se observa que algunos de los elementos a medir requieren técnicas específicas que permiten una mayor sensibilidad en la medida, como es el caso del As y el Hg.

En las muestras de agua, los análisis de cadmio, cinc, cobre, cromo (VI), manganeso, níquel, plomo y plata se realizaron en las soluciones obtenidas en los procesos de extracción y concentración descritos anteriormente. Estos análisis se efectuaron sobre la base de patrones multielementos y blancos sometidos al mismo tratamiento que las muestras. La determinación del contenido en arsénico y en mercurio se efectuó por medida directa sobre las muestras previamente filtradas.

En el caso de las muestras de *balanus spp.*, la determinación se llevó a cabo mediante el empleo de diferentes patrones de los distintos elementos, siendo necesaria una dilución 3:25 en el caso del Zn debido a que los altos niveles en las muestras hacían imprecisa su medida.

A continuación se realiza una descripción de las diferentes técnicas empleadas.

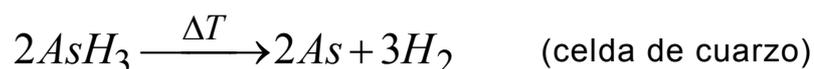
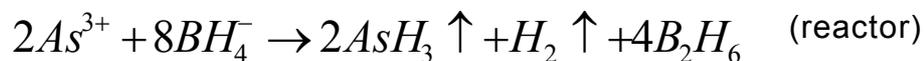
5.2 ESPECTROSCOPÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON GENERADOR DE HIDRUROS (UNE-EN ISO 11969:1997).

Con este método se determina el contenido de arsénico en las muestras.

a) Fundamento.

En presencia de borohidruro sódico, el arsénico se reduce a hidruro de arsénico (III) y es arrastrado por una corriente de argón a la celda de medida, donde un atomizador apropiado finalmente lo transforma en un vapor atómico susceptible de absorber la longitud de

onda característica del arsénico procedente de una fuente de cátodo hueco.



b) Reactivos.

Todos los reactivos empleados fueron de calidad para análisis de MERCK:

1. Ácido sulfúrico (H₂ SO₄).
2. Ácido clorhídrico (HCl).
3. Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)
4. Hidróxido sódico (NaOH).
5. Solución de borohidruro sódico al 3% (p/v) y de hidróxido sódico al 1% (p/v). Se disuelve 1 g de hidróxido sódico en, aproximadamente 20 ml de agua. Se añaden 3 g de borohidruro sódico (NaBH₄), se filtra (0,45 μm) y se diluye con agua hasta 100 ml. Se prepara la solución el día que va a utilizarse.
6. Solución patrón de arsénico de 1000 mg/l. A partir de la misma se prepararon soluciones de calibración que abarcasen el rango de concentraciones esperadas. En cada caso se añadió HCl hasta un 2% antes de enrasar los matraces. Las soluciones de calibración se prepararon diariamente, y se trataron del mismo modo que las muestras.

7. Solución en blanco. Se transfieren mediante una pipeta 2 ml de HCl a un matraz aforado de 100 ml de capacidad nominal, y se enrasa con agua. A la solución en blanco se le realiza el mismo tratamiento que a las muestras.

c) Equipos

- Espectrofotómetro de absorción atómica de doble haz, PERKIN ELMER modelo 2280.
- Lámpara de cátodo hueco Intensitron® de PERKIN ELMER, de arsénico.
- Sistema de generación de hidruros PERKIN ELMER modelo MHS-10.

d) Procedimiento

- Reducción de As(V) a As(III): para 50 ml de muestra, se añaden 20 ml de ácido clorhídrico, a fin de lograr la máxima absorbancia, y 4 ml de solución de yoduro potásico-ácido ascórbico. Se calienta durante 15 minutos a 50 °C. Por último se enfría la solución de la muestra y se transfiere cuantitativamente a un matraz aforado con una capacidad nominal de 100ml. Se diluye hasta dicho volumen con agua.
- Para comenzar el análisis propiamente dicho de la muestra, se ajustan todos los parámetros de funcionamiento del EAA de acuerdo con el manual de operación del fabricante (longitud de onda: 193,7 nm) y se optimiza la posición de la célula de absorción para obtener una transmisión máxima del haz de luz.

- Se calibra el equipo con la solución blanco y con los patrones, reactor y se conecta al sistema de generación de hidruros.
- Esperar a que el argón purgue el aire del sistema, pulsar al mismo tiempo los botones de adición de NaBH₄ y de lectura del EAA y registrar la señal en altura de pico.
- Realizar el mismo procedimiento con las muestras.

5.3 ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA SIN LLAMA, MEDIANTE TÉCNICA DEL VAPOR FRIO (UNE-EN 1483:1997).

Con este método se determina el contenido en mercurio de las muestras.

a) Fundamento.

Esta técnica es específica para este elemento. En este caso se sustituye el mechero del EAA por una celda especial de medida provista de ventanas de cuarzo. Se trata de proceder a la oxidación y mineralización del Hg de la muestra, que posteriormente se reduce y en estado elemental se volatiliza, siendo arrastrado por una corriente de



aire seco que lo lleva hasta la célula de medida. El resto de las técnicas hace uso de una lámpara de cátodo hueco del elemento y sigue los mismos requerimientos que para las demás técnicas de absorción atómica, pero determinándose la absorción sin llama (técnica del vapor frío).

b) Reactivos

1. Solución patrón de mercurio de 1000 mg/l de MERCK.
2. Solución de borohidruro sódico al 3% (p/v) y de hidróxido sódico al 1% (p/v). Se disuelve 1 g de hidróxido sódico en, aproximadamente 20 ml de agua. Se añaden 3 g de borohidruro sódico (NaBH_4), se filtra ($0,45 \mu\text{m}$) y se diluye con agua hasta 100 ml. Se prepara la solución el día que va a utilizarse.
3. Solución de permanganato potásico (MnO_4K) al 5% (p/v).

c) Equipos

- Espectrofotómetro de absorción atómica de doble haz, PERKIN ELMER modelo 2280.
- Lámpara de cátodo hueco Intensitron® de PERKIN ELMER, de arsénico.
- Sistema de generación de hidruros PERKIN ELMER modelo MHS-10.

d) Procedimiento

- Partiendo de la solución de 1000 mg/l se preparó una solución patrón diluida de 0,1 mg/l de concentración, diluyendo con ácido nítrico al 1,5 % (v/v) y estabilizando con unas gotas de solución de permanganato potásico. De la solución preparada, se tomaron distintos volúmenes, con el fin de construir una curva de calibrado en la que interpolar la lectura de las muestras y deducir el contenido de mercurio de las mismas.

5.4 ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON LLAMA AIRE-ACETILENO.

Los elementos que se determinan empleando esta técnica vienen especificados en las tablas 14 y 15.

a) Fundamento.

Se trata de formar un vapor atómico dentro de una llama producida por un mechero especial, alimentado por un flujo constante de aire-acetileno. A través de la llama se hace entonces incidir un haz de radiación procedente de una lámpara de emisión del propio elemento problema. La disminución en la potencia del haz después de atravesar ésta, se hallará relacionada con la concentración del analito en la disolución problema, dentro de unos determinados límites operativos, según la ley de Beer.

b) Reactivos

1. Solución patrón de los elementos a determinar de 1000 mg/l de MERCK.
2. Agua ultrapura ($18,3 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$).
3. Ácido nítrico de MERCK calidad suprapur®.

c) Equipos

- Espectrofotómetro de absorción atómica de doble haz, PERKIN ELMER modelo 2280.

- Lámpara de cátodo hueco Intensitron® de PERKIN ELMER, de los elementos a medir con esta técnica. (ver tablas 14 y 15).

d) Procedimiento

- Una vez ajustado en el equipo de medida la longitud de onda correspondiente a la línea del elemento a determinar, se efectuaron medidas con las soluciones patrón de distintas concentraciones crecientes, elaboradas paralelamente a las muestras y pertenecientes al rango lineal de cada elemento, y se construyó la curva de calibrado, deduciéndose así el contenido del elemento analizado en la muestra en función de sus absorbancias.

5.5 ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA ELECTROTÉRMICA (SM 3113A) CON CORRECTOR ZEEMAN.

Los elementos que se determinan utilizando esta técnica vienen especificados en las tablas 14 y 15.

a) Fundamento.

La espectroscopía de absorción atómica electrotérmica, a diferencia de la atomización directa con llama emplea como atomizador un horno de grafito en lugar de una cabeza de quemador. Se trata de formar un vapor atómico mediante el calentamiento secuenciado de la disolución que contiene la muestra, un volumen pequeño que se habrá introducido previamente en la cámara de grafito. Esta se calentará eléctricamente según un programa de temperatura característico para cada metal. En estas secuencias la muestra se secará, se someterá a calcinación, pirolisis y se atomizará.

Una vez la muestra atomizada, a través del vapor atómico se hace incidir un haz de radiación de una lámpara de emisión del propio elemento problema. La disminución en la potencia del haz después de atravesar el vapor esta relacionada con la concentración de la muestra en el analito de acuerdo a la ley de Beer, en un determinado intervalo de concentraciones.

b) Reactivos

1. Solución patrón de, los elementos a determinar de, 1000 mg/l de MERCK.
2. Agua ultrapura ($18,3 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$).
3. Acido nítrico de MERCK calidad suprapur®.

c) Equipos

- Espectrofotómetro de absorción atómica PERKIN ELMER modelo 4100 ZL, con corrector de fondo Zeeman.
- Lámparas de cátodo hueco Intensitron® de PERKIN ELMER de los elementos a medir con esta técnica (ver tablas 14 y 15).
- Inyector automático de toma de muestra PERKIN ELMER modelo AS-72.

d) Procedimiento.

- Se seleccionó la longitud de onda y anchura de banda apropiada para el elemento a determinar, siguiendo las

instrucciones concretas del manual de operación, así como el tiempo de inyección de muestra, rampa de temperatura aplicadas a la cámara de grafito (secado, calcinación, pirólisis y atomización), tiempo de integración de la medida, intensidad de corriente aplicada a la lámpara y volúmenes inyectados tanto de muestra como de modificador de matriz en la cámara de grafito. La adición del modificador de matriz persigue eliminar problemas de interferencias que pudiese causar la matriz de las muestras, donde los posibles restos de cloruro sódico, con una elevada temperatura de volatilización, ofrecerán resistencia a volatilizarse durante la etapa de calcinación del horno sin pérdida de analito (kingston et al. 1978). A continuación se paso a obtener su curva de calibrado, con este fin se inyectaron en el horno de grafito, mediante el inyector automático, soluciones patrones de distintas concentraciones crecientes, así como un blanco con agua ultrapura exenta del metal a muestrear y a la que se habrá añadido la misma cantidad de aditivo (HNO_3) que a la muestra y los patrones.

- Posteriormente, se inyectaron las muestras, empleándose el mismo volumen que el utilizado para preparar la curva de calibrado y el mismo programa prefijado. Las concentraciones de los elementos analizados en las muestras se dedujeron interpolando los valores obtenidos en las curvas de calibrado, siendo fundamentalmente tramos lineales de relación entre absorbancia medida por el equipo y concentración de estándar.

6. CALIDAD DE LOS RESULTADOS ANALÍTICOS.

Con el objetivo de comprobar la calidad del análisis de las muestras de *balanus spp.* se realizó el mismo ataque al que fueron sometidas estas muestras sobre un patrón certificado (*Mytilus edulis*).

En dicho patrón se llevaron a cabo las medidas de los contenidos en cromo, cadmio, plomo, manganeso, cobre y zinc, empleándose para todos ellos la técnica de espectroscopia de absorción atómica con horno de grafito, excepto para el zinc, cuya concentración más elevada, sugirió el uso de la técnica de llama aire-acetileno.

En la siguiente tabla se muestran los resultados del análisis del patrón realizado en el laboratorio así como los valores certificados del mismo. Se puede apreciar que la diferencia entre los valores respectivos es mínima, pudiéndose garantizar así la calidad de los resultados del presente estudio.

Tabla 16: Valores certificados y valores obtenidos en el laboratorio del contenido en metales (mg/kg) del patrón certificado.

ELEMENTO	VALORES CERTIFICADOS (mg/kg)	VALORES LABORATORIO (mg/kg)
Cadmio	0.348	0.395
Cobre	9.45	10.2
Cromo	0.780	0.970
Manganeso	7.69	7.74
Plomo	2.00	2.23
Zinc	83.1	84.0