



DEPARTAMENTO DE ENERGÍA Y MECÁNICA

CARRERA DE INGENIERÍA EN PETROQUÍMICA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERO EN PETROQUÍMICA**

**TEMA: DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA
CUANTIFICAR METALES PESADOS EN MUESTRAS SÓLIDAS DE
MACROALGAS MARINAS UTILIZANDO ESPECTROFOTOMETRÍA
DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON HORNO DE GRAFITO**

AUTORA: PEÑAHERRERA VEINTIMILLA, JESSICA LORENA

DIRECTOR: DR. PH.D. RODRÍGUEZ MAECKER, ROMAN NICOLAY

LATACUNGA

2019



DEPARTAMENTO DE ENERGÍA Y MECÁNICA

CARRERA DE INGENIERÍA EN PETROQUÍMICA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “**DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR METALES PESADOS EN MUESTRAS SÓLIDAS DE MACROALGAS MARINAS UTILIZANDO ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON HORNO DE GRAFITO**” fue realizado por la señorita **Peñaherrera Veintimilla, Jessica Lorena** el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Latacunga, 01 de febrero del 2019.

Firma:

Dr. Rer. Nat., PhD Roman Rodríguez

C. C: 1712082120



DEPARTAMENTO DE ENERGÍA Y MECÁNICA

CARRERA DE INGENIERÍA EN PETROQUÍMICA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **Peñaherrera Veintimilla, Jessica Lorena**, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR METALES PESADOS EN MUESTRAS SÓLIDAS DE MACROALGAS MARINAS UTILIZANDO ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON HORNO DE GRAFITO** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Latacunga, 01 de febrero del 2019.

Firma

Peñaherrera Veintimilla Jessica

C.C.: 050399026-9



DEPARTAMENTO DE ENERGÍA Y MECÁNICA

CARRERA DE INGENIERÍA EN PETROQUÍMICA

AUTORIZACIÓN

Yo, **Peñaherrera Veintimilla, Jessica Lorena** autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR METALES PESADOS EN MUESTRAS SÓLIDAS DE MACROALGAS MARINAS UTILIZANDO ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON HORNO DE GRAFITO** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Latacunga, 01 de febrero del 2019.

Firma

Peñaherrera Veintimilla Jessica

C.C.: 050399026-9

DEDICATORIA

“No basta saber, se debe también aplicar. No es suficiente querer, se debe también hacer.”

Johann Wolfgang von Goethe

Me llena de gran satisfacción poder dedicar este proyecto de titulación, a Dios por darme un día más de vida y a mi amada familia por su apoyo incondicional, amor y sacrificio a lo largo de este camino.

Jessica Lorena Peñaherrera Veintimilla

AGRADECIMIENTOS

“La gratitud se da cuando la memoria se almacena en el corazón y no en la mente.”

Lionel Hampton

Quiero agradecer:

A Dios por guiarme a lo largo de este camino y darme la fortaleza para culminar esta nueva etapa de mi vida.

A mis padres, hermanas y mi pequeña sobrina por ser mi motivación para salir siempre adelante y alcanzar mis sueños, así también por creer y confiar en mi capacidad.

A mis profesores por brindarme sus conocimientos y apoyo constante, sobre todo al Dr. Rodríguez porque siempre estuvo enseñándome, apoyándome y mostrándome su incondicional aprecio.

A mi noble Universidad pues el recorrido por sus aulas fueron momentos inolvidables, pues conocí personas que hasta ahora forman parte importante de mi vida, de las cuales aprendí mucho, mis queridos/as amigos/as.

Gracias a todos por su aporte en mí.

Jessica Lorena Peñaherrera Veintimilla

ÍNDICE DE CONTENIDOS**CARÁTULA**

CERTIFICACIÓN	i
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	ii
AUTORIZACIÓN	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xv

CAPÍTULO I

GENERALIDADES	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Planteamiento del problema	3
1.3. Justificación e importancia	4
1.4. Objetivos	5

1.4.1. Objetivos General	5
1.4.2. Objetivos Específicos.....	5
1.5. Hipótesis	5
1.6. Variables de la investigación.....	5

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO.....	6
2.1. Metales pesados.....	6
2.1.1. Efectos de la contaminación por metales pesados	7
2.1.2. Fuentes de contaminación por metales pesados en el medio marino	9
2.2. Algas.....	10
2.2.1. Características y propiedades.....	11
2.2.2. Importancia	11
2.2.3. Tipos de algas marinas	12
2.2.4. Relación entre las algas y los metales pesados	13
2.2.5. Relación algas y la contaminación del agua de mar	15
2.3. Regulaciones Ambientales.....	16
2.3.1. Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente	16
2.4. Espectrofotometría de absorción atómica.....	18
2.4.1. Definición	18

2.4.2. Descripción	19
2.5. Equipo de absorción atómica ContrAA 700	19
2.5.1. Principio de Funcionamiento.....	20
2.5.2. Características del Analytik Jena ContrAA 700.....	22
2.6. Técnica de horno de grafito de espectrofotometría de absorción atómica	23
2.6.1. Características de la técnica de horno de grafito de tubo de grafito	24

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	26
3.1. Reactivos, estándares y equipos	26
3.1.1. Reactivos y estándares.....	26
3.1.2. Equipos.....	26
3.2. Métodos	27
3.2.1. Obtención de la muestra	27
3.2.2. Preparación de la muestra	29
3.2.3. Elaboración de curvas de calibración.....	30
3.2.4. Condiciones óptimas de análisis.....	31
3.3. Sensibilidad, Límite de detección y Límite de determinación.....	35
3.4. Comprobación del método	36
3.4.1. Material de referencia	36

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
4.1. Optimización del programa de temperaturas	38
4.2. Uso de modificador	39
4.3. Curvas de calibración.....	39
4.4. Desviación estándar y desviación relativa	46
4.5. Sensibilidad, Límite de detección y Límite de determinación	50
4.6. Concentración de metales en algas	50

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	51
5.1. Conclusiones	51
5.2. Recomendaciones	52
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ANEXOS	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 <i>Elementos tóxicos en el medio ambiente</i>	8
Tabla 2 <i>Diferenciación de grupos taxonómicos de algas según características particulares de clasificación</i>	13
Tabla 3 <i>Comparación entre los procesos de biosorción y bioacumulación</i>	14
Tabla 4 <i>Concentraciones metálicas medias encontradas en diferentes aguas naturales (ug/L)</i>	15
Tabla 5 <i>Criterios de calidad</i>	17
Tabla 6 <i>Límite de descarga a un cuerpo de agua marina</i>	18
Tabla 7 <i>Analytik Jena ContrAA 700 - Sistema óptico</i>	22
Tabla 8 <i>Analytik Jena ContrAA 700 – Lámpara</i>	23
Tabla 9 <i>Características horno de tubo de grafito</i>	25
Tabla 10 <i>Estándares Curvas de Calibración</i>	30
Tabla 11 <i>Secado de muestras</i>	32
Tabla 12 <i>Efectos de los modificadores de matriz</i>	34
Tabla 13 <i>Uso de modificadores</i>	35
Tabla 14 <i>Condiciones de atomización óptimas</i>	39
Tabla 15 <i>Valores de absorbancia para el plomo</i>	47
Tabla 16 <i>Valores de absorbancia para el Cadmio</i>	48
Tabla 17 <i>Valores de absorbancia para el Cobre</i>	49
Tabla 18 <i>Concentración de metales en algas</i>	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Efecto de los contaminantes sobre los organismos marinos	9
Figura 2. Comparación esquemática del principio de medición físico.	20
Figura 3. Espectrofotómetro de Absorción Atómica ContrAA 700	27
Figura 4. Recolección de macroalgas marinas	28
Figura 5. Almacenamiento de algas.	29
Figura 6. Diagrama de proceso para la preparación de la muestra.	30
Figura 7. Programa del horno de grafito.	32
Figura 8. Curva de calibración adición de patrón Pb	41
Figura 9. Curva de calibración por adición de patrón Cd.....	42
Figura 10. Curva de calibración por adición de patrón Cu.....	43
Figura 11. Curva de calibración adición de patrón- ERM-CD200 Pb.....	44
Figura 12. Curva de calibración por adición de patrón- ERM-CD200 Cd	45
Figura 13. Curva de calibración por adición de patrón- ERM-CD200 Cu	46

ABREVIATURAS

AA: Absorción Atómica

AAS: Espectrometría de Absorción Atómica

Abs: Absorbancia

°C: Grados Celsius

Cd: Cadmio

Cu: Cobre

SD: Desviación estándar relativa

ERM: Environmental Resources Management

FP: Full power

g/cm³: Gramos/centímetro cúbico

GFAAS: Espectrometría de Absorción Atómica con Horno de Grafito

HR-CS AAS: Espectrometría de absorción atómica de horno de grafito de fuente continua de alta resolución

mg/l: Miligramos/litro

nm: Nanometro

Pb: Plomo

ppb: Partes por billón

ppm: Partes por millón

RSD: Desviación estándar relativa

TULSMA: Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente.

UV: Ultravioleta

ug/L: Microgramos/litro

ZAAS: Zeeman Atomic Absorption Spectroscopy

RESUMEN

La presente investigación trata sobre el desarrollo de un método analítico que permite cuantificar metales pesados en muestras sólidas de algas marinas utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica con horno de grafito, con el propósito de evitar que las muestras sean alteradas al aplicar procedimientos de pretratamiento, donde generalmente el analito es diluido y además, se invierten mayores cantidades de tiempo y recursos. Se determinaron tres metales pesados: cobre (Cu), plomo (Pb) y cadmio (Cd), en algas rojas, pardas y verdes, de diferentes zonas costeras de la provincia de Manabí. Se determinó que las temperaturas de pirólisis y atomización adecuadas para el análisis de algas son: 1100 y 2300 °C para el Cu, 800 y 2300 °C para el Pb y 900 y 2000 °C para el Cd respectivamente. En los ensayos se obtuvo concentraciones entre 1.42-1.76 ppb de Pb, 13.22-24.38 ppb de Cu y 1.03-3.67 ppb de Cd. Para garantizar el buen comportamiento y aplicación del método, se realizó la comparación de curvas de calibración por medio del uso de estándar externo y adición de patrón, verificando que no existan interferencias y analizando un material de referencia certificado (ERM-CD200 "Seaweed"). A través del tratamiento de los resultados obtenidos se estableció la eficiencia del método desarrollado, su importancia en el análisis de muestras sólidas y se determinó el límite de detección, límite de cuantificación, error y precisión.

PALABRAS CLAVE:

- **METALES PESADOS**
- **ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA**
- **ALGAS MARINAS**

ABSTRACT

The present investigation deals about the development of an analytical method that allows to quantify heavy metals in solid samples in algae marinas in an atomic absorption spectrophotometer with graphite furnace, in order to avoid that the samples are altered when applying the pretreatment, where the analyte is usually diluted and also, greater amounts of time and resources are invested. Three heavy metals were determined: copper (Cu), lead (Pb) and cadmium (Cd), in red, brown and green algae, from different coastal areas of the province of Manabí. It was determined that the pyrolysis and atomization temperatures for the analysis of algae are: 1100 and 2300 °C for Cu, 800 and 2300 °C for Pb and 900 and 2000 °C for Cd respectively. In the tests were results obtained between 1.42-1.76 ppb of Pb, 13.22-24.38 ppb of Cu and 1.03-3.67 ppb of Cd. To guarantee the good behavior and the application of the method, the calibration curves were compared through the means of use the external standard and pattern addition, verifying that there is no interferences and analyzing of a certified reference material (ERM-CD200 "Seaweed"). Through the treatment of the results obtained was established the limit of detection, the limit of quantification, the error and the precision.

KEYWORDS:

- **HEAVY METALS**
- **ATOMIC ABSORPTION SPECTROPHOTOMETER**
- **SEAWEED**

CAPÍTULO I

GENERALIDADES

1.1. Antecedentes

La espectrometría de absorción atómica (AAS) empieza en 1955, cuando Alan Walsh publicó el artículo “The application of atomic absorption spectra to chemical analysis”, marcando el inicio para el desarrollo de una nueva técnica de análisis instrumental (L'vov, 2005).

Durante 12 años Alan Watts trabajó en espectroscopia de emisión atómica y en espectrometría de absorción molecular, en los cuales notó que no debía ignorar los espectros de absorción atómica. Alan Watts realizó varios estudios sobre espectrometría de absorción atómica con llama produciendo comercialmente un espectrómetro de absorción atómica, sin embargo, como este modelo fue montado sobre la base de un espectrofotómetro UV estándar sin modulación de señal, las llamas de alta temperatura no podían ser utilizadas en este equipo (L'vov, 2005).

En 1963, Perkin-Elmer fabricó el primer espectrofotómetro de absorción atómica de llama diseñado por Kahn y Slavin, y años después varias empresas comenzaron la producción de dichos instrumentos. Dos años más tarde colegas de Alan Watts, Amos y Willis propusieron una llama de acetileno-óxido nítrico a alta temperatura favoreciendo la expansión de espectrómetros AA.

L'vov fue el pionero en publicar un artículo sobre el uso de horno de grafito, añadiendo que esta técnica sería útil en el análisis directo de sólidos (Kurfürst, 1998). Desde 1956 L'vov realizó los primeros experimentos en espectrometría de absorción atómica utilizando un horno de grafito en lugar de una llama, basado estudios realizados por Alan Watts (L'vov, 2005).

Entre 1972 y 1978 en el Laboratorio Lawrence Berkeley, se desarrolló una investigación para la detección directa de elementos en una muestra sólida por ZAAS (Zeeman Atomic Absorption Spectroscopy), dando como resultado la necesidad de potenciar la técnica de Espectrometría de Absorción Atómica corrigiendo problemas presentes que limitaban el análisis de muestras biológicas. Es así que su primer análisis fue la detección de mercurio en los alimentos, ya que éste era un problema ambiental muy importante (Hadeishi & McLaughlin, 1985).

Existen varios estudios sobre la recuperación de metales pesados y la descontaminación acuática y terrestre utilizando biomasa. En el año 2007 se realizó un estudio comparativo sobre la biosorción de metales pesados utilizando diferentes tipos de algas, llegándose a determinar que las algas pardas tienen mayor capacidad de absorción de metales (Romera, Gonzáles, Ballester, Blázquez, & Muñoz, 2007). Así también en el 2013 se realizó la investigación de metales en algas comestibles, con el fin de determinar la cantidad de macroelementos, elementos trazas y metales tóxicos en algas de consumo humano, procedentes de la Costa Asiática y la Unión Europea; este análisis permitió determinar que dichas algas no representan riesgo toxicológico para los consumidores (Ruíz Navarro , y otros, 2013).

1.2. Planteamiento del problema

A pesar de existir investigaciones sobre el uso de algas marinas en la absorción y adsorción de metales pesados presentes en el agua, donde se emplean técnicas y métodos de análisis que utilizan muestras líquidas o sólidos digeridos, en los estudios realizados no existe ningún tipo de procedimiento que permita efectuar un análisis cuantitativo sobre la contaminación de metales pesados en costas ecuatorianas empleando un análisis directo sobre muestras sólidas, sobre todo considerando que el análisis de muestras marinas resulta complejo debido a las interferencias que normalmente pueden presentarse, pues en el agua de mar se pueden encontrar una gran variedad de metales en forma de iones hidratados o complejos metálicos con ligandos orgánicos.

Un método instrumental adecuado es la espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito el cual tiene una alta sensibilidad, puede ser aplicado directamente sobre la muestra sólida sin ningún tipo de pre-tratamiento, lo que evita la contaminación y/o pérdida de los analitos.

Adicionalmente, no se ha encontrado información acerca de los niveles de contaminación por metales pesados, directa o indirectamente, en las zonas costeras de la provincia de Manabí ni de las afecciones que estos provocan al medio ambiente y a la salud.

1.3. Justificación e importancia

Esta investigación proyecta desarrollar un método potencial para determinar la concentración de metales pesados en algas marinas, mediante el análisis directo de muestras sólidas obteniendo resultados con mejor precisión y exactitud en un tiempo menor. La técnica de espectrofotometría de absorción atómica por horno de grafito es idónea para el análisis directo de sólidos, obteniendo resultados exitosos en varios campos de investigación (Kurfürst, 1998).

Metodológicamente este estudio y las diferentes pruebas experimentales que se desarrollaran, permitirán obtener información sobre la contaminación con metales pesados en la zona costera de Manabí. Las metodologías basadas en el análisis directo de muestras sólidas, sin digestión previa de la muestra, son alternativas eficientes y confiables, donde la cantidad de muestra necesaria para el análisis químico se reduce al no existir una pre-digestión del analito (Gómez, Gismera, Sevilla, & Procopio, 2013).

La presente investigación proporcionará información útil en el desarrollo de estudios similares al planteado, enfocándose primordialmente en la técnica de análisis directo de muestras sólidas por medio de espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito, así como en proyectos enfocados a la posible contaminación y remediación de las playas de Manabí, puesto que hoy en día los temas sobre contaminación ambiental son de suma importancia, para poder regular y controlar la posibles causas que provoquen polución.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivos General

- Desarrollar un método analítico para cuantificar metales pesados en muestras de algas marinas utilizando espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito.

1.4.2. Objetivos Específicos

- Establecer la temperatura óptima de pirólisis de las algas marinas para minimizar la interferencia por efecto de matriz en la determinación de Cd, Pb y Cu.
- Establecer la temperatura óptima de atomización para los analitos Cd, Pb y Cu empleando un modificador de matriz.
- Determinar la concentración de Cd, Pb y Cu en diversas muestras de algas marinas.

1.5. Hipótesis

Las algas marinas de la costa ecuatoriana no presentan concentraciones elevadas de metales pesados lo que sugiere que no existen problemas críticos de contaminación.

1.6. Variables de la investigación

- **Variable Independiente:** Temperatura de pirólisis, temperatura de atomización, tipo de modificador de matriz.
- **Variable Dependiente:** Concentración de metales de cadmio, plomo y cobre.

CAPÍTULO II

Para el desarrollo del presente capítulo se consideró bases teóricas de varios autores que permitirán comprender y sustentar los conceptos relacionados con las variables de la investigación.

MARCO TEÓRICO

2.1. Metales pesados

Los metales pesados se encuentran presentes en la corteza terrestre en una concentración entre 0.01 y 0.1%, poseen una densidad mayor o igual que 5 g/cm^3 cuando está en forma elemental, su número atómico es superior a 20, sin considerar a los metales alcalinos y alcalinotérreos (Remache, 2016).

Asimismo Eróstegui (2009) define a los materiales pesados como sustancias propias de la naturaleza de peso molecular alto muy difundidos y en muchos casos útiles como el plomo, no obstante muchos de ellos poseen efectos negativos para la salud y medio ambiente ya que afectan a diferentes organismos.

La mayoría de los elementos sólo están presentes en concentraciones mínimas en el medio y pocos son los que se requieren para los procesos fisiológicos de las plantas y animales (Acosta & Alvarez, 2007). Sin embargo, representan las principales amenazas para la salud humana, ya que los seres humanos están expuestos al plomo, el cadmio, el mercurio y el arsénico (Järup, 2003).

Desde esta perspectiva el autor Acosta (2007) menciona que los metales pesados son parte fundamental de las actividades antropogénicas provenientes de desechos domésticos, agrícolas e industriales que contaminan el aire, agua, suelo y plantas afectando así a los eslabones de las cadenas tróficas.

2.1.1. Efectos de la contaminación por metales pesados

Los elementos químicos pesados han sido utilizados por el ser humano durante miles de años en diferentes actividades industriales, sin embargo, debido a investigaciones realizados sobre el peligro y toxicidad que estos provocan en la salud y medio ambiente, autoridades ambientales y de la salud en todo el mundo han tomado medidas para controlar la contaminación a causa de dichos metales.

Actualmente se posee conocimientos de los efectos adversos para la salud que provocan los metales pesados, no obstante siguen siendo utilizados en algunas industrias. Por ejemplo, el mercurio todavía se utiliza en la extracción de oro en muchas partes de América Latina, mientras que el arsénico sigue siendo común en los conservantes de la madera (Järup, 2003).

Los metales pesados son contaminantes catastróficos ya que contaminan el aire, agua y suelo; las plantas absorben en altas concentraciones metales o los depositan en el suelo, afectando la cadena trófica (Acosta & Alvarez, 2007). Además de acuerdo con estudios realizados en los organismos vivos, los metales pesados pueden producir una serie de desórdenes como: fisiológicos, neurológicos, de actividad enzimática, mutagénicos, desarrollo de reproducción (Peña, Palacios, & Ospina, 2005).

Algunos metales son fundamentales para la vida y otros son beneficiosos pero muchos son altamente tóxicos. Los elementos tóxicos pueden clasificarse en no críticos, tóxicos pero poco disponibles y altamente tóxicos y muy accesibles (Mai, 2013)(ver Tabla 1).

Tabla 1

Elementos tóxicos en el medio ambiente.

No críticos			Tóxicos pero poco disponibles o insolubles			Altamente tóxicos y muy accesibles		
Na	C	F	Ti	Ga	Hf	Be	As	Au
K	P	Li	La	Zr	Os	Co	Se	Hg
Mg	Fe	Rb	W	Rh	Nb	Ni	Te	Cu
Ca	S	Sr	Ir	Ta	Ru	Pd	Pb	Zn
H	Cl	Al	Re	Ba		Ag	Bi	Sn
O	Br	Si				Cd	Sb	Pt
N						Tl		

Fuente: (Mai, 2013)

“Algunos metales considerados contaminantes son necesarios en cantidades traza para los animales y plantas. Así pues, debe alcanzarse un equilibrio entre un exceso y un defecto en lo que se refiere a estos metales esenciales” (Orozco B., Pérez S., González D. Nieves, Rodríguez V., & Alfayate B., 2003).

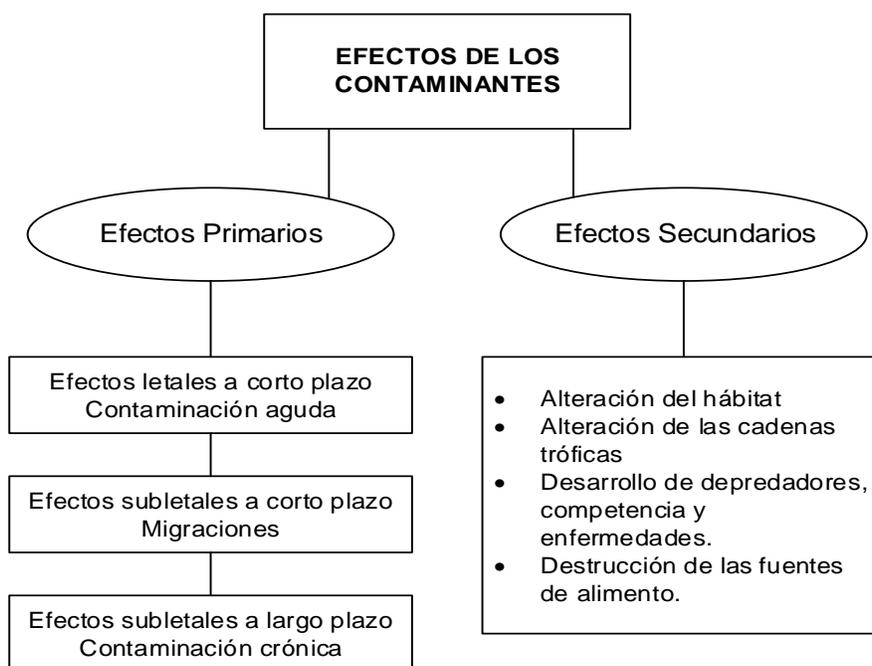


Figura 1. Efecto de los contaminantes sobre los organismos marinos

Fuente: (Peña, Palacios, & Ospina, 2005)

En la Figura 1 se puede observar los efectos contaminantes de los metales pesados en el medio marino. En la biota marina la contaminación a causa de metales pesados provoca efectos letales y subletales a corto y plago plazo, afectando el hábitat de varias especies marinas, así como la alteración de la cadena trófica.

2.1.2. Fuentes de contaminación por metales pesados en el medio marino

Las emisiones de metales pesados en el medio ambiente se producen a través de una amplia gama de procesos y vías. Por ejemplo la contaminación del aire se da durante la combustión, extracción y tratamiento. Así también, el agua superficial se contamina a través de la escorrentía y comunicados de almacenamiento y transporte y finalmente la contaminación del suelo provoco daños en aguas subterráneas y cultivos (Järup, 2003).

Los principales problemas ambientales se asocian con la descarga de efluentes urbanos e industriales y con la extracción y transporte de petróleo crudo (Gil, Torres, Harvey, & Esteves, 2006). Dentro de la contaminación marina de origen industrial los elementos pesados comportan un mayor riesgo para la biota marina a corto plazo y para la salud humana a mediano plazo, ya que estos tienen la capacidad de acumularse en la cadena trófica y especialmente en la marina (Ibañez, 1986).

Los metales procedentes de fuentes antropogénicas llegan al mar a través de ríos y emisarios, precipitaciones, vertidos, minería marina y perforación, y de buques (G.W., 1980).

2.2. Algas

Las algas son organismos marinos muy antiguos que prácticamente habitan en todos los ecosistemas acuáticos del planeta, presentando amplia gama de tamaños, formas y estrategias ecológicas y fisiológicas (Peña, Palacios, & Ospina, 2005).

En la actualidad existen varias razones que conllevan a analizar los diferentes tipos de macroalgas, una de ellas es la fijación de CO₂, mediante el proceso de fotosíntesis, en el cual elimina O₂ (Alveal, Werlinger, & Romo, 2004). También, las algas proveen cerca de la mitad de la producción primaria de materia orgánica total del mundo, de la cual depende gran parte de los productores secundarios acuáticos (Peña, Palacios, & Ospina, 2005).

A partir de las algas se elabora varios productos utilizados en industrias químicas, farmacéuticas y de alimentos (Peña, Palacios, & Ospina, 2005). Con el avance de la

tecnología e investigación científica, se ha implementado métodos que permiten utilizar algas en la biosorción de metales, lo que permite descontaminar su habitat o recuperar metales de interés que se encuentran presentes en el medio.

2.2.1. Características y propiedades

La vida de las algas marinas depende del lugar donde crecen, o hábitat, sobre el cual los factores abióticos ejercen un efecto importante. Por ejemplo: el fotoperíodo, es un factor esencial en la vida de las algas. Sin embargo, no todas las algas necesitan la misma intensidad luminosa para dicho proceso, ya que esto depende de los pigmentos que poseen. Así, las macroalgas verdes son capaces de absorber mucha energía lumínica, abundan en los primeros tramos de la costa. Mientras que a profundidades mayores, donde la penetración de la luz es menor, predominan las macroalgas rojas y pardas (Mendoza, 1999).

Las algas poseen características propias que las identifican en cada grupo. Estas son (Peña, Palacios, & Ospina, 2005):

- No poseen raíz, tallo y hojas.
- No desarrollan embrión.
- Tiene la capacidad e sintetizar su propio alimento.

2.2.2. Importancia

La importancia de las algas radica tradicionalmente en dos puntos: desde el punto de vista biológico, ya que, son organismos fotosintéticos presentes en ríos, lago y mares que producen oxígeno, materia orgánica y son la base de la cadena alimenticia de los ecosistemas acuáticos; y por el valor económico de sus derivados, puesto que son utilizadas en la industria alimenticia, farmacéutica, de cosméticos y otras aplicaciones industriales, debido a su alto contenido de carbohidratos y proteínas (Peña, Palacios, & Ospina, 2005).

Además, las macroalgas son utilizadas en la descontaminación y recuperación de metales pesados presentes en medios acuáticos, gracias a su alta capacidad de absorber elementos pesados y su disponibilidad en cantidades casi ilimitadas (Romera, Gonzáles, Ballester, Blázquez, & Muñoz, 2007).

2.2.3. Tipos de algas marinas

La diversidad de algas está dada por su morfología externa y por sus características bioquímicas y fisiológicas (Alveal, Werlinger, & Romo, 2004). “Es así que las macroalgas se clasifican en tres grupos: las rojas o Rhodophyta, las de color pardo o Phaeophyta y las verdes o Chlorophyta” (Mendoza, 1999).

La clasificación de las algas responde al tipo de pigmento, estructuras de las plantas y las sustancias de reservas que cada alga posee (Tabla 2) (Peña, Palacios, & Ospina, 2005).

Tabla 2

Diferenciación de grupos taxonómicos de algas según características particulares de clasificación

División celular	Tipo de pigmento	Sustancia de reserva	Pared celular
Clorofitas	Clorofila a, b Carotenos	Almidón	Celulosa, sílice
Euglenofitas	Clorofila a, b Carotenos	Almidón paramilo	Ausente
Crisofitas	Clorofila a, c Xantofilas	Aceite de crisolaminarina	Celulosa, sílice
Feofitas	Clorofila a, c Fucozantina	Manitol, laminarina	Celulosa, ácido algínico
Rodofitas	Clorofila a, d Carotenos, ficoeritina, fucoxantina	Almidón de florideas	Celulosa, pectinas

Fuente: (Peña, Palacios, & Ospina, 2005)

En la zona costera de la provincia de Manabí se pueden identificar un total de 15 géneros de algas, se encuentran: 7 géneros de Rhodophyta, 5 géneros de Chlorophyta y 3 géneros de Phaeophyta (International Bio Power Corporation, 2017).

2.2.4. Relación entre las algas y los metales pesados

En el medio ambiente se presentan interacciones entre metales y la biomasa, es así que cuando los compuestos químicos solubles presentes en medios acuosos pueden entrar en contacto e interaccionan con materiales biológicos (como las algas) de dos formas: uniéndose a la pared celular mediante biosorción o acumulándose en el interior de la célula mediante el proceso de bioacumulación. Tanto el proceso de biosorción como el de bioacumulación participan en el ciclo de la materia y ocurren todo el tiempo en la naturaleza (Plaza, 2012).

Las diferencias entre los dos procesos de interacción entre metales y algas se muestran a continuación en la Tabla 3:

Tabla 3

Comparación entre los procesos de biosorción y bioacumulación

Biosorción	Bioacumulación
Proceso pasivo	Proceso activo
Biomasa sin vida	Biomasa con vida
Los metales se unen a la superficie de la pared celular	Los metales se unen a la superficie de la pared celular y además se acumulan en el interior de la célula
Adsorción	Absorción
Proceso reversible	Proceso parcialmente reversible
No requiere nutrientes	Requiere nutrientes
Proceso de una etapa	Proceso de dos etapas
Rápido	Lento
No es controlado por el metabolismo	Controlada por el metabolismo
No se ve afectado por el efecto tóxico de los contaminantes	Se ve afectado por el efecto tóxico de los contaminantes
No hay crecimiento celular	Implica crecimiento celular
Alcanza concentraciones intermedias de equilibrio de los contaminantes	Alcanza muy bajas concentraciones de equilibrio de los contaminantes
Posibilidad de recuperación y reuso de los contaminantes mediante desorción	Los metales no pueden recuperarse
La biomasa puede regenerarse y emplearse en varios ciclos de absorción – desorción	La biomasa no puede recuperarse

Fuente: (Chojnacka, 2010)

2.2.5. Relación algas y la contaminación del agua de mar

El agua de los ríos y estuarios existe mayor concentración de metales pesados que el agua de mar, debido a que los ríos están expuestos a procesos de contaminación antropogénica más directa, como son la eliminación de desechos industrias y domésticos. Estas concentraciones disminuyen a medida que aumenta la distancia respecto a la costa. Además, las concentraciones de los metales pesados en el agua de mar son muy bajas debido a procesos naturales de precipitación, adsorción y sedimentación que favorecen su fijación en el sedimento.

En la Tabla 4 se puede identificar los intervalos de concentraciones metálicas encontradas en diferentes muestras acuosas naturales, pudiéndose apreciar diferencias significativas (Mai, 2013).

Tabla 4

Concentraciones metálicas medias encontradas en diferentes aguas naturales (ug/L)

Metal	Agua de río	Agua costera, bahía y estuario	Agua de mar oceánica superficial
Cd	0,03 – 5,0	0,01 – 5,0	0,01 – 0,60
Cu	0,11 – 200,0	0,07 – 20,02	0,01 – 2,80
Pb	0,13 – 60,0	0,04 – 7,44	0,00004 – 9,00

Fuente: (Mai, 2013)

Las algas mediante procesos naturales retienen metales pesados en su pared celular o en el interior de la célula, al analizarlas y cuantificar la cantidad de elementos pesados presentes en su estructura, se puede determinar el grado de contaminación ambiental de la zona de muestreo de las algas analizadas mediante un análisis estadístico.

2.3.Regulaciones Ambientales

2.3.1. Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente

Según la reforma del Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente (TULSMA), Libro VI, Decreto Ejecutivo 3516, Registro Oficial Suplemento 2, aprobada por la Comisión de Legislación y Codificación (2003), las normas de calidad Ambiental y de descarga de efluentes en el agua, así como las normas generales para descarga de efluentes a cuerpos de agua marina son:

A) Normas de calidad Ambiental y de descarga de efluentes al Recurso Agua

“El objetivo principal de la presente norma es proteger la calidad del recurso agua para salvaguardar y preservar los usos asignados, la integridad de las personas, de los ecosistemas y sus interrelaciones y del ambiente en general”.

La norma tendrá en cuenta los siguientes usos del agua:

- Consumo humano y uso doméstico.
- Preservación de la vida acuática y silvestre.
- Uso Agrícola o de riego.
- Uso Pecuario.
- Uso Recreativo.
- Uso Estético.

Los criterios de calidad de aguas para la preservación de la vida acuática y silvestre en aguas dulces frías o cálidas, y en aguas marinas y de estuarios, se observa en la Tabla 5.

Tabla 5
Criterios de calidad

Parámetros	Expresados	Unidad	Criterio de calidad para agua marina y de estuario
Cadmio	Cd	mg/l	0,005
Cobre	Cu	mg/l	0,05
Plomo	Pb	mg/l	0,01

Fuente: (Comisión de Legislación y codificación, 2003)

B) Normas generales para descarga de efluentes a cuerpos de agua marina

- “Se prohíbe la descarga de aguas residuales domésticas e industriales a cuerpos de agua salobre y marina, sujetos a la influencia de flujo y reflujos de mareas. Todas las descargas a cuerpos de agua estuarinos, sin excepción, deberán ser interceptadas para tratamiento y descarga de conformidad con las disposiciones de esta norma. Las Municipalidades deberán incluir en sus planes maestros o similares, las consideraciones para el control de la contaminación de este tipo de cuerpos receptores, por efecto de la escorrentía pluvial urbana”.
- “Las descargas de efluentes a cuerpos de agua marina, se efectuarán teniendo en cuenta la capacidad de asimilación del medio receptor y de acuerdo al uso del recurso que se haya fijado para cada zona en particular”.
- “Se prohíbe la descarga en zonas de playa, de aguas de desecho de eviscerado y de todo desecho sólido proveniente de actividades de transformación de peces

y mariscos, sean a nivel artesanal o industrial. Las vísceras, conchas y demás residuos sólidos deberán disponerse como tal y las aguas residuales deberán tratarse y disponerse según lo dispuesto en la presente Norma”

- “Se prohíbe la descarga de residuos líquidos no tratados, provenientes de embarcaciones, buques, naves u otros medios de transporte marítimo, fluvial o lacustre, hacia los sistemas de alcantarillado, o cuerpos receptores. Se observarán las disposiciones en las normas correspondientes”

Tabla 6

Límite de descarga a un cuerpo de agua marina

Parámetros	Expresados	Unidad	Límite máximo permisible	
			(A)Descarga de zonas de rompientes	(B)Descarga mediante emisarios submarinos
Cadmio	Cd	mg/l	-	-
Cobre	Cu	mg/l	1,0	1,0
Plomo	Pb	mg/l	-	-

Fuente: (Comisión de Legislación y codificación, 2003)

2.4. Espectrofotometría de absorción atómica

2.4.1. Definición

Espectro: Referente a radiaciones electromagnéticas (Luz monocromática), caracterizadas por un número de onda, longitud de onda o una frecuencia (Obiols Salvat, 1969).

Fotometría: mide la energía o luz radiante según su intensidad.

Absorción: muestra la medición de la luz absorbida por el analito.

Atómica: la medición de la absorción de luz se lleva a cabo por los átomos presentes en la muestra.

2.4.2. Descripción

La espectrofotometría de absorción atómica es un método instrumental que permite un análisis cuantitativo de precisión de un metal dado, pues aprovecha los niveles de energía cuantificados para los electrones que posee cada átomo.

La AAS mide la concentración de átomos en fase gaseosa mediante la absorción de luz, lo que con lleva a la disminución de la intensidad de la luz que llega al detector en comparación a un blanco. Dependiendo del estado del analito los átomos de la muestra se exponen a una fuente de excitación, como: llama, horno de grafito o generación de hidruros.

Las trazas de metales en el analito se determinan a través de una curva de calibración con estándares a una concentración conocida.

2.5. Equipo de absorción atómica ContrAA 700

El espectrofotómetro de absorción atómica ContrAA 700 es un equipo controlado por ordenador para la determinación de la concentración de metales y metaloides en muestras líquidas, diluidas y sólidas. El ContrAA 700 es un espectrómetro de absorción atómica con fuente continua de alta resolución compacto para las técnicas de llama, hidruros/HydrEA y horno de grafito (Analytik Jena AG, 2014).

2.5.1. Principio de Funcionamiento

El principio de medición de la espectrometría de absorción atómica de alta resolución con fuente de radiación continua al igual que el de la AAS clásica de radiación lineal, se basa en la absorción de una radiación primaria a través de átomos de analito en estado fundamental. En este proceso, la señal de absorbancia representa una medida de la concentración del elemento correspondiente en la muestra analizada (Analytik Jena AG, 2014).

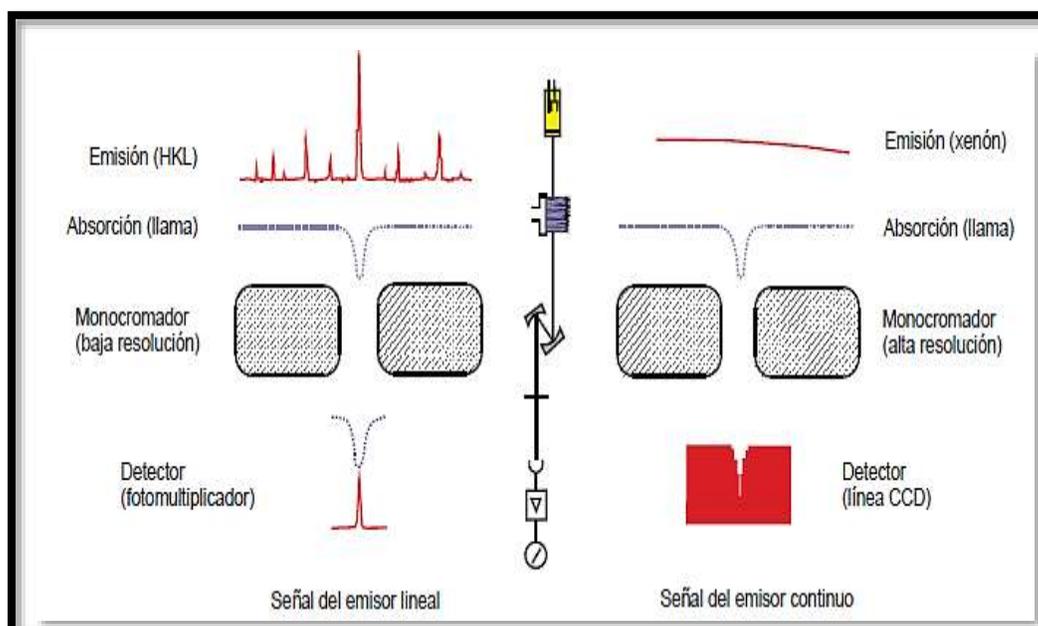


Figura 2. Comparación esquemática del principio de medición físico.

Fuente: (Analytik Jena AG, 2014)

En la Figura 2 se observa las unidades base del equipo de AAS, detalladas a continuación:

Fuente de radiación: La espectrometría HR-CS AAS utiliza una lámpara de xenón de arco corto, que garantiza una densidad de radiación muy elevada y una emisión continua en todo el rango espectral de 190 a 900 nm. De este modo, puede disponer en cualquier momento y sin salvedad de todas las líneas de análisis de interés, tanto las longitudes de onda de resonancia de los elementos del análisis como también todas las longitudes de onda secundarias sin limitaciones.

Atomizador: Son quemadores que separan las moléculas para formar átomos libres por medio de un gas combustible. El atomizador del espectrofotómetro ContrAA 700 se encuentra instalado de forma fija, es apropiado para el análisis directo de trazas de metales en muestras sólidas, ya que se elimina el contaminante, se reduce las interferencias y disminuye el costo del análisis, los cuales son las principales fuentes de error.

Monocromador: El ContrAA 700 posee un monocromador doble de alta resolución basado en un monocromador de prisma y uno de rendija Echelle, de esta manera se obtiene una alta resolución de $\lambda/\Delta\lambda = 145.000$, que corresponde a un ancho de banda espectral de < 2 pm por píxel con 200 nm. La exactitud de la longitud de onda se obtiene a través de la calibración del monocromador al iniciar una longitud de onda (Analytik Jena AG, 2014).

Detector: Utiliza un detector semiconductor silencioso y sensible a las radiaciones UV (detector CCD), éste registra la intensidad en la línea de análisis y su proximidad espectral. De esta manera se detecta un rango espectral, de modo simultáneo y de alta

resolución, de hasta 1 nm en la proximidad de la línea de análisis (Analytik Jena AG, 2014).

2.5.2. Características del Analytik Jena ContrAA 700

Sistema óptico: Óptica de reflexión con revestimiento protector y sistema óptico con aislamiento a prueba de luz, sus características se pueden observar en la Tabla 7.

Tabla 7

Analytik Jena ContrAA 700 - Sistema óptico.

Monocromador	Monocromador doble con rejilla escalonada, con una distancia focal de $F=380$ mm y una rejilla central variable; pre-monocromador con prisma de cuarzo. Selección de longitudes de onda a través de irradiador adicional de neón reflectante.
Rango de longitud de onda	185-900 nm
Ancho de banda espectral	2 pm con 200 nm
Rejilla	Rejilla Echele
Banco óptico	Equipamiento óptico modular sobre placa de soporte de fundición para asegurar estabilidad y robustez.
Fotómetro con aislamiento	Protección contra la humedad, los gases residuales de escape y las influencias químicas en el medio ambiente.
Detector	CCD con iluminación trasera, FFT bidimensional con una alta eficiencia cuántica y sensibilidad UV elevada.

Fuente: (Analytik Jena AG, 2014)

Lámpara: Lámpara de xenón de arco corto con mancha catódica UV en modo hot-spot; seguimiento hot-spot automático; corrección simultánea de la deriva. En la Tabla 8,

se pueden observar las características de la lámpara que utiliza el ContrAA 700 (Analytik Jena AG, 2014).

Tabla 8
Analytik Jena ContrAA 700 – Lámpara

Corriente de la lámpara	9-16 A/8 A (en modo stand-by)
Tipo de funcionamiento	CC, supervisión de la duración de la combustión y de los impulsos de encendido.
Alimentación eléctrica	Fuente de alimentación integrada en el espectrómetro.

Fuente: (Analytik Jena AG, 2014)

2.6. Técnica de horno de grafito de espectrofotometría de absorción atómica

La técnica de espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito (GFAAS) permite medir la concentración de trazas de metales en ppb, mediante la absorción de luz por parte de un analito en estado atómico. La cantidad de radiación absorbida es proporcional a la cantidad de átomos presentes en la muestra (Mañay, Clavijo, & Díaz, 2009).

El método se basa en la atomización de la muestra y la absorción de radiación, por lo cual la muestra es sometida a una serie de etapas, detalladas a continuación:

Secado: Una vez colocada la muestra en la plataforma, esta es inyectada en el tubo de grafito, se calienta usualmente a temperaturas entre 80 a 110°C en tres etapas. Se realiza con el fin de evaporar el solvente y los componentes volátiles de la matriz.

Pirólisis: En esta etapa se realiza el calcinado de la muestra por incremento de la temperatura, y así eliminar la mayor cantidad de materia orgánica presente, evitando

pérdida del analito. La temperatura de pirólisis varía según el metal a ser analizado, típicamente se encuentra en el rango de 350 a 1600 °C. Durante el calcinado, el material sólido es descompuesto mientras que los materiales refractarios permanecen inalterados (Mañay, Clavijo, & Díaz, 2009).

Atomización: En la etapa de atomización el horno se calienta de manera rápida a altas temperaturas, dependiendo de la volatilidad del metal varía entre 1800 a 2800 °C, para vaporizar los residuos sobrantes de la pirólisis, obteniendo átomos libres y permitiendo medir la absorbancia. Mientras mejor sea la atomización, la determinación de trazas de metales estará libre de interferencias, dando mejores resultados en el análisis.

Limpieza del horno: Se realiza a una temperatura superior a la de atomización, con el fin de evitar errores en el análisis.

2.6.1. Características de la técnica de horno de grafito de tubo de grafito

El módulo de horno de grafito del espectrómetro de absorción atómica ContrAA 700, posee varias características detalladas a continuación en la Tabla 9.

Tabla 9
Características horno de tubo de grafito

Tipo de Muestra	Disuelta o Sólida
Tipo de tubo	Tubo: IC (atomización de tubo estándar), IC con plataforma 1 PIN o IC sólido Todos los tipos de tubo están revestidos mediante pirólisis
Volumen	Máx. 50 µl
Ajuste de la temperatura	La temperatura se puede ajustar entre la temperatura ambiente y 3000 °C, en pasos de 1 °C.
Programa de temperatura tiempo (programa del horno)	Programación de un máx. de 20 pasos dentro de los límites fijados, de 0 a 999 s/paso en intervalos de 1s. Aumento de la temperatura (rampa): Rampas lineales de 1 °C i/s a 3000 °C/s y rampas no lineales máximas (Full Power FP/No Power NP) Control de gas inerte y gas adicional Introducción de pasos de enriquecimiento e inyección. Ajuste del punto de partida para auto-cero e integración.
Agua de refrigeración	Refrigeración integrada, sin sedimentos de 20 a 40 °C.
Gas Inerte	Argón 4.8 y superior Componentes permitidos: Oxígeno ≤ 3 ppm Nitrógeno ≤ 10 ppm Hidrocarburos ≤ 0,5 ppm Humedad ≤ 5 ppm Consumo: máx. 2 L/min (Depende del programa de temperatura-tiempo) Presión de entrada: de 0,6 a 0,7 MPa
Circuitos de seguridad para la protección en caso de	Sobrecalentamiento del transformador de la calefacción del horno. Rotura del tubo de grafito. Defecto en el agua de refrigeración. Funcionamiento con el horno de tubo de grafito abierto. Funcionamiento con un flujo de agua de refrigeración extremadamente escaso. Funcionamiento con una presión de entrada del gas inerte extremadamente baja.

Fuente: (Analytik Jena AG, 2014)

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1. Reactivos, estándares y equipos

3.1.1. Reactivos y estándares

A continuación se detallan los materiales que se utilizaron en el desarrollo del método analítico para analizar metales pesados en algas:

- Material de Referencia estándar de:
 - Pb a 1000 ppm
 - Cd a 1000 ppm
 - Cu a 1000 ppm
- Material de referencia certificado (CRM) por ERM para Seaweed ERM-CD200
- Otros
 - Agua Milli-Q
 - Ácido Nítrico de grado analítico al 65%
 - Gas Argón

3.1.2. Equipos

Para realizar el desarrollo del método analítico que permite cuantificar Pb, Cd y Cu en muestras sólidas a condiciones de operaciones óptimas se empleó en Espectrofotómetro de Absorción Atómica ContrAA 700 de Analytik Jena mostrado en la Figura 3.



Figura 3. Espectrofotómetro de Absorción Atómica ContrAA 700

3.2. Métodos

3.2.1. Obtención de la muestra

Las algas son organismos acuáticos que pueden encontrarse en el mar, aguas dulces o salobres; dependiendo de su grupo pueden ser: rojas, verdes o pardas. Estas especies marinas se las puede encontrar flotando, en la profundidad del mar o adheridas en rocas.

En el esquema de la Figura 4 se observa el proceso de recolección de las muestras de algas.

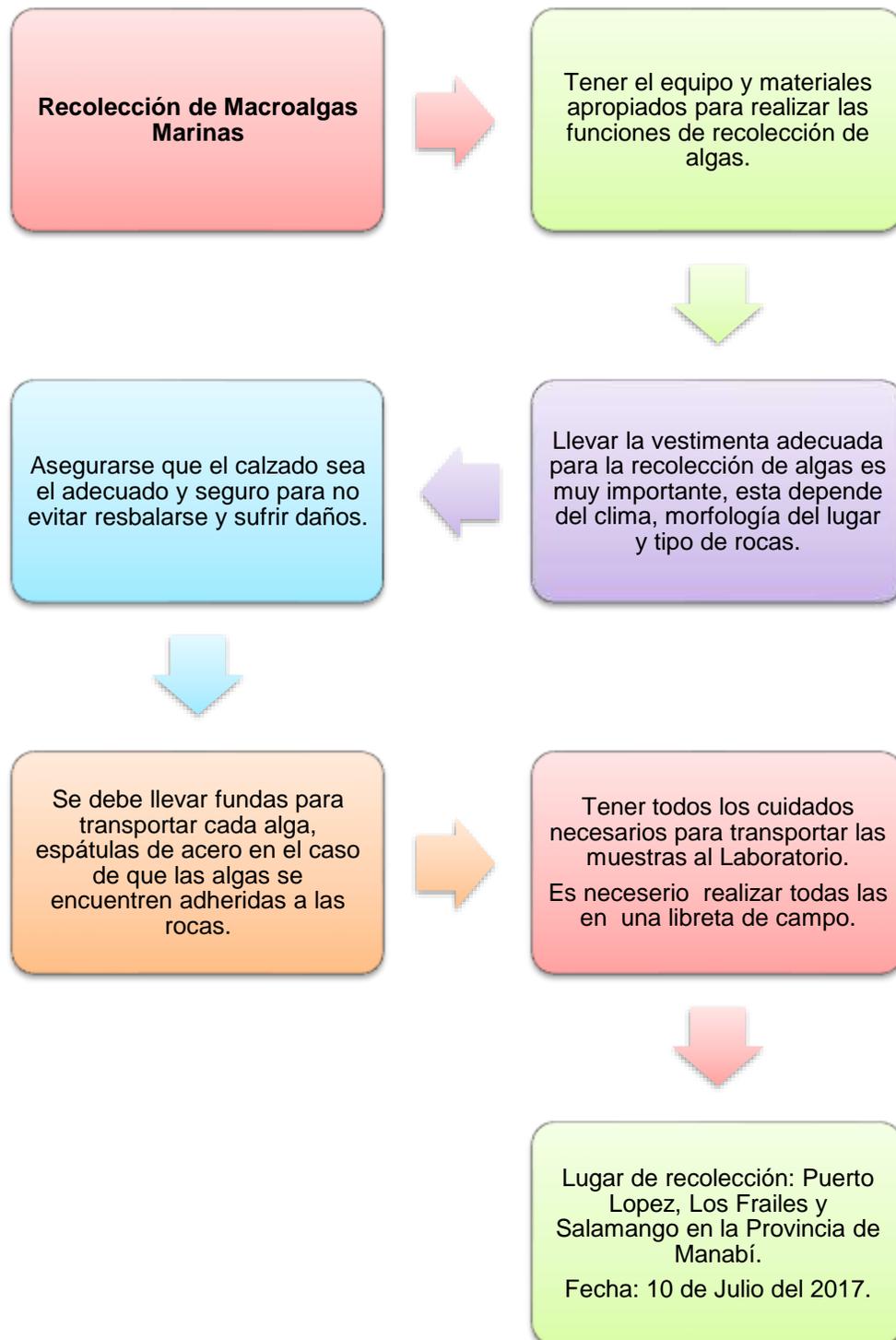


Figura 4. Recolección de macroalgas marinas

Fuente: (Vergara, 2010)

3.2.2. Preparación de la muestra

Después de la recolección de las algas se dejó secar al aire en una atmósfera limpia entre papel filtro, seguidamente se eliminó las impurezas visibles como mallas, residuos de ramas etc., una vez limpias fueron secadas en una estufa al vacío a 60°C por 48 horas.

Las algas secas se molieron en un molino eléctrico de café hasta obtener un polvo muy fino, por último se almacenaron en bolsas plásticas sellopack y se guardaron en un lugar fresco, seco y oscuro (Figura 5).



Figura 5. Almacenamiento de algas.

El esquema resumen del proceso de preparación de la muestra se puede observar en la Figura 6.



Figura 6. Diagrama de proceso para la preparación de la muestra.

3.2.3. Elaboración de curvas de calibración

Se elaboró 2 tipos de curvas de calibración, la primera por adición de estándares externos y la segunda por adición de patrón a diferentes concentraciones según el metal a ser analizados, tomando como referencia la concentración característica (ug/L) para obtener un valor de 1 en Abs, siendo 145 ug/L, 12 ug/L y 40 ug/L para el Pb, Cd y Cu respectivamente. En la Tabla 10 se observa la concentración de los puntos de la calibración para cada metal.

Tabla 10.
Estándares Curvas de Calibración.

Metales	Punto 1(ppb)	Punto 2 (ppb)	Punto 3 (ppb)	Punto 4 (ppb)	Punto 5(ppb)
Pb	0	40	80	120	-
Cd	0	2.56	5.12	7.68	-
Cu	0	8	16	24	32

Las soluciones de calibración se prepararon con ácido nítrico al 0.05%, preparado desde el reactivo con grado analítico AAS (65%) el mismo que se diluyó con agua Mili-Q para obtener la concentración deseada.

Método de calibración por estándares externos: Esta técnica usualmente se utiliza en un análisis cuantitativo, se basa en la construcción de una curva a partir de estándares externos de concentración conocida del elemento deseado, con concentración semejante a la muestra problema (Harris, 1992).

Método de calibración por adición de patrón: Este método consiste en añadir un peso fijo de la muestra a las soluciones estándares. Para el desarrollo de este estudio, se utilizó muestras de algas en estado sólido, donde se pesó entre 0.15 a 0.21 mg de muestra de alga o 0.07 a 0.21 del material de referencia y se añadió 10 ul de las soluciones estándares, esto se realizó para cada metal y con 4 réplicas, con el fin de obtener mejores resultados.

3.2.4. Condiciones óptimas de análisis

Los modificadores de matriz y la programación de temperatura adecuada en el horno de grafito, reduce la señal de fondo y permite la generación de la señal atómica más alta. En la técnica de horno de grafito se debe determinar las temperaturas de pirólisis, atomización, para realizar un correcto análisis, sin embargo también existen otras temperaturas a considerar como: secado y limpieza del horno.

El secado se realizó en 3 etapas comprendidas entre 80 a 110 °C y la limpieza del horno se llevó acabo a 2450°C. El tiempo de limpieza del horno óptimo del equipo es de 4 segundos, sin embargo en el análisis realizado en este proyecto se utilizó un tiempo de 9 segundos para eliminar cualquier sobrante de muestra calcinada. En la Figura 7, se

observa las condiciones de secado y limpieza, siendo las mismas para el plomo, cadmio y cobre.

Step	Name	Temp. [°C]	Ramp [°C/s]	Hold [s]	Time [s]	Gas Purge	Gas Add	only liquid	E/P
1	Drying	80	6	20	26.7	Max	Stop		
2	Drying	90	3	20	23.3	Max	Stop		
3	Drying	110	5	10	14.0	Max	Stop		
4	Pyrolysis	350	50	20	24.8	Max	Stop		
5	Pyrolysis	800	300	15	16.5	Max	Stop		
6	Gas adaption	800	0	5	5.0	Stop	Stop		
7	Atomize	2300	800	9	10.9	Stop	Stop		
8	Clean	2450	500	9	9.3	Max	Stop		

Row Total time: 163 s

Figura 7. Programa del horno de grafito.

En la etapa de secado se debe tener algunas consideraciones para eliminar todo tipo de humedad en la muestra, mostradas en la Tabla 11:

Tabla 11.
Secado de muestras.

Fase	Observación	Acción
1ra fase	La muestra se reparte al inicio del programa del tubo de grafito en la plataforma.	No Aumentar la temperatura en 5°C.
	La gota se vuelve a unir hundiéndose lentamente sin hervir.	Sí Ninguna acción necesaria.
	La gota empieza a evaporarse.	Sí Reducir la temperatura en 5°C.
2da fase	La gota se evapora lentamente.	Sí Ninguna acción necesaria.
3ra fase	Durante los últimos 5-10 segundos se observa aún líquido de la muestra.	Sí Prolongar tiempo.

Fuente: (Analytik Jena AG, 2014)

a) Pirólisis

La pirólisis se lleva a cabo en 2 etapas: la primera a una temperatura de 350°C en la cual se elimina la humedad restante del horno de tubo de grafito, prolongando la vida útil de los tubos de grafito. En la segunda etapa se descompone la muestra a una temperatura adecuada para cada metal, además en esta etapa se evapora parcialmente la matriz perturbadora de la muestra. Al terminar las etapas de pirólisis se debe efectuar una fase adicional a la misma temperatura de pirólisis, en la cual se detiene el flujo de gas para obtener buenas condiciones de atomización (Analytik Jena AG, 2014).

Para análisis de Pb, Cd y Cu se realizó pruebas en la segunda etapa de pirólisis entre 600-800°C, 600-900°C y 950-1100°C, respectivamente con un tiempo de 10-15 segundos y un entre 0.15-0.21 mg de muestra de alga.

b) Atomización

En esta etapa el analito se evapora a temperaturas elevadas, dependiendo del metal a ser analizado para absorber la luz irradiada y reportar los valores de absorbancia medidos. Para optimizar la temperatura de atomización se consideró que si la señal no vuelve a la línea base dentro del tiempo de medición, se aumenta la temperatura o a su vez se prolonga el tiempo de atomización. Otro factor importante a considerar es que si la señal es muy estrecha se debe reducir la temperatura (Analytik Jena AG, 2014).

El análisis de plomo, cadmio y cobre se realizó a diferentes de temperaturas de atomización entre 1500-2300°C, 1800-2000°C y 2000-2300°C, respectivamente con un tiempo de 3-9 segundos y un peso entre 0.15-0.21 mg de muestra de alga.

La rampa de atomización es el cambio de temperatura en la fase de atomización, se encuentra en °C/s, al analizar Pb, Cd y Cu se consideró temperaturas entre 800-2300°C, 900-2300°C y 1500 °C -FP (full power), respectivamente.

c) Modificadores de matriz

Los modificadores de matriz en la técnica de horno de grafito se adicionan en las muestras a ser analizadas para facilitar el análisis, ya que permiten aumentar la volatilidad de la matriz de la muestra, así como también evita que el metal a analizar se volatilice prematuramente por estar expuesto a altas temperaturas, es decir realizan un cambio en el comportamiento térmico del analito o la matriz, se realiza con el objetivo de eliminar interferencias y mejorar los resultados de la determinación de la concentración de metales en algas marinas. En la Tabla 12 se muestran los efectos buscados de los modificadores químicos en el analito y en la matriz.

Tabla 12.

Efectos de los modificadores de matriz.

Fuente: (Rondón, 1999)

Sobre el analito	<ul style="list-style-type: none"> • Estabilización térmica de analitos volátiles. • Incremento de la volatilidad del analito. • Asistencia en la etapa de limpieza.
Sobre la matriz	<ul style="list-style-type: none"> • Incremento de la volatilidad del interferente. • Facilitar la calcinación de las matrices. • Facilitar el contacto entre muestra y atomizador.

El análisis realizado para cuantificar Pb, Cd y Cu en las muestras de algas se realizó con la presencia y ausencia de modificadores de matriz como se detalla en la Tabla 13. En la curva de calibración por estándares externos se colocó 10 ul se solución estándar con 5ul de modificador y en la curva de calibración por adición de patrón se pesó entre 0.15-0.21 mg de muestra en cada plataforma, se prosiguió a pipetear 10 ul de estándar con 5 ul de modificador. Cada uno de los elementos analizados tuvo un comportamiento diferente con la ausencia de modificador o la presencia de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ y $\text{Pd/Mg}(\text{NO}_3)_2$ como modificadores, mostrando una señal más estable con uno de estos.

Tabla 13
Uso de modificadores

Metales	Modificador		
	Sin modificador	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	$\text{Pd/Mg}(\text{NO}_3)_2$
Plomo	X	x	x
Cadmio	X	x	x
Cobre	X		x

Fuente: (Analytik Jena AG, 2014)

3.3. Sensibilidad, Límite de detección y Límite de determinación

La sensibilidad de un espectrofotómetro de absorción atómica para un elemento dado se define como la concentración necesaria del metal para producir una transmitancia del 99%.

Las absorbancias del plomo y cadmio se midieron a una longitud de onda primaria de 217 nm y 228.8 nm, respectivamente con una sensibilidad del 100% y el cobre a una longitud de 324 nm y 327.4 nm con sensibilidad del 100 y 67% respectivamente.

El límite de detección es la concentración de un elemento que produce una señal igual a dos veces el nivel de ruido pico a pico de la línea de referencia (Harris, 1992). Se calcula mediante la ecuación 1.

$$\text{Lím. detección (LD)} = \text{señal del blanco} + 3,3 * SD (\text{del blanco}) \text{ Ec. 1}$$

El factor 3,3 es el valor del parámetro estadístico z para un nivel de confianza del 95% multiplicado por 2. Se utiliza el valor de desviación estándar dentro del grupo, ya que se ha probado mediante el test F que no hay diferencias significativas entre lotes y dentro de lotes (Crubellati & Di Risio, 2009).

El límite de cuantificación también denominado límite de determinación es la menor cantidad de analito presente en una muestra para ser determinada con exactitud y un nivel aceptable de repetibilidad. Se determina al multiplicar el límite de detección por 3, como se muestra en la ecuación (Ec. 2) (Crubellati & Di Risio, 2009).

$$\text{Lím. cuantificación.} = 3 * LD. \text{ Ec. 2}$$

3.4. Comprobación del método

3.4.1. Material de referencia

La idea de utilizar materiales de referencia sólidos es corroborar el método desarrollado, ya que estos materiales poseen en su estructura una cantidad conocida de metales pesados. Al analizar muestras donde se conoce la concentración de metales presentes en su estructura, nos permite calcular el error de análisis del método desarrollado, mediante la diferencia entre el valor medido y el real sobre el valor real.

En el desarrollo de este proyecto se utilizó como material de referencia ERM-CD200. "Seaweed", para esto se elaboró una curva de calibración por adición de patrón con el fin de determinar la concentración de plomo, cadmio y cobre; y poder comparar con el valor real de la concentración de metales en el material de referencia.

En el ERM-CD200 certificado se tiene una concentración de 0.95, 1.71 y 0.51 para el Cd, Cu y Pb, respectivamente en mg/Kg.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Optimización del programa de temperaturas

En el horno de grafito, se sometió la muestra de alga a una serie de temperaturas crecientes para liberar el plomo, cadmio y cobre de elementos que produzcan interferencias en el análisis hasta llegar a la atomización.

La señal del espectro correspondiente a cada metal indica que se realizó una correcta separación de elementos afines al analito analizado que interfieren en la señal, mediante la visualización del espectro referente al tiempo. En el **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se puede observar algunos de los espectros analizados a diferentes condiciones de operación y como varían según la temperatura, determinando que a una condición óptima de pirólisis los picos de cada metal se estabilizan.

El tiempo predeterminado para la segunda fase de pirólisis es de 10 segundos, sin embargo no logra calcinar toda la muestra, por lo cual se determinó como tiempo óptimo 15 segundos para todas las muestras y el material de referencia. Las temperaturas de pirólisis óptimas en la segunda fase varían para los diferentes metales, siendo 800, 900 y 1100°C para el Pb, Cd y Cu, respectivamente.

Una vez alcanzada la calcinación de la muestra, se optimizó las condiciones de atomización, temperatura, rampa y tiempo, para asegurar la absorbancia de cada uno de los analitos. Las condiciones óptimas se detallan en la Tabla 14:

Tabla 14
Condiciones de atomización óptimas

Metal	Temperatura de atomización (°C)	Rampa de atomización (°C/s)	Tiempo de atomización (seg)
Pb	2300	800	9
Cd	2000	2300	3
Cu	2300	1500	4

4.2. Uso de modificador

El uso de modificadores permitió obtener una señal clara y eliminar las posibles interferencias en el análisis de cada analito, se realizó diferentes pruebas experimentales con y sin modificador para observar el cambio en la señal espectral, mostrando un espectro estable para cada metal a sus condiciones de análisis óptimas.

El plomo y cadmio mostraron una mejor señal con el uso de Fosfato monoamónico ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) como modificador, mientras que para el Cu se utilizó Nitrato de Paladio y Magnesio ($\text{Pd}(\text{NO}_3)_2/\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$) (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

4.3. Curvas de calibración

Cada una de las curvas de calibración para los elementos analizados, fueron sometidas a la variación de temperaturas de pirólisis y atomización, así como al uso de modificadores de matriz, hasta obtener los mejores resultados.

Dando como resultados las curvas de calibración mostradas en los enunciados a, b y c.

a) Por adición de estándares externos

Las curvas de calibración utilizando estándares externos para el plomo, cadmio y cobre se muestran a continuación:

- Para el plomo la ecuación es:

$$y = (0.0624 + 1.1752x)/(1 + 1.6176x)$$

Con un $R^2=0.9998$

- Para el cadmio la ecuación es:

$$y = 4.9375x + 0.0129$$

Con un $R^2=0.9983$

- Para el cobre la ecuación es:

$$y = -5.8744x^2 + 3.8438x + 0.1569$$

Con un $R^2=0.9992$

Una vez obtenidas las diferentes curvas se efectuó una comparación entre la curva de calibración por estándares externos y las curvas por adición de patrón, ya sea utilizando muestras de algas o material de referencia, se observan las curvas en las figuras de los incisos b y c. Por lo que se determinó que no existen interferencias a corregir.

b) Por adición de patrón con muestra de algas

- Para el plomo la ecuación es:

$$y = (0.2059 + 1.0578x)/(1 + 1.1241x)$$

Con un $R^2=0.99995$

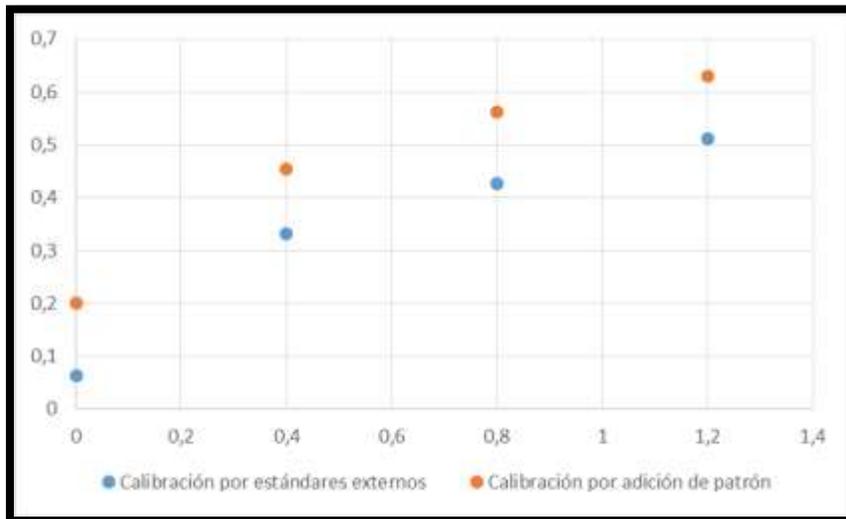


Figura 8. Curva de calibración adición de patrón Pb

La curva de calibración por estándar externo no tiene intersección en el punto 0, por ende ya existe una masa inicial de Pb en el estándar 0 de 0.1946 ng. En la muestra de alga utilizada para la elaboración de la curva de calibración por adición de patrón se observa que existen trazas de plomo en la alga (Figura 8).

- Para el cadmio la ecuación es:

$$y = 4.8707x + 0.349$$

Con un $R^2=0.9983$

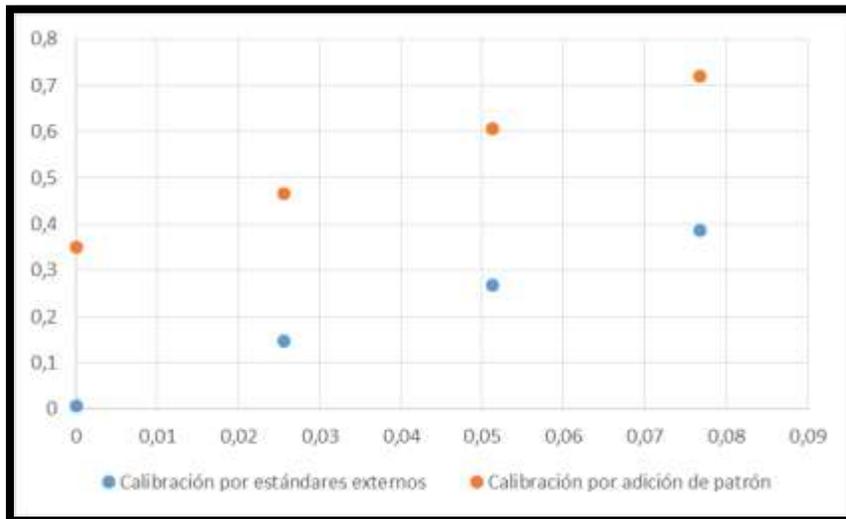


Figura 9. Curva de calibración por adición de patrón Cd

En la **Figura 9. Curva de calibración por adición de patrón Cd** se observa que la curva de calibración por estándar externo para el Cd tiene intersección en un punto 0,071, por ende ya existe una masa inicial de Cd en el estándar 0. En la muestra de alga utilizada para la elaboración de la curva de calibración por adición de patrón se observa que si existen trazas de cadmio presentes en la alga.

- Para el cobre la ecuación es:

$$y = -6.1089x^2 + 3.9384x + 0.2987$$

Con un $R^2=0.9985$

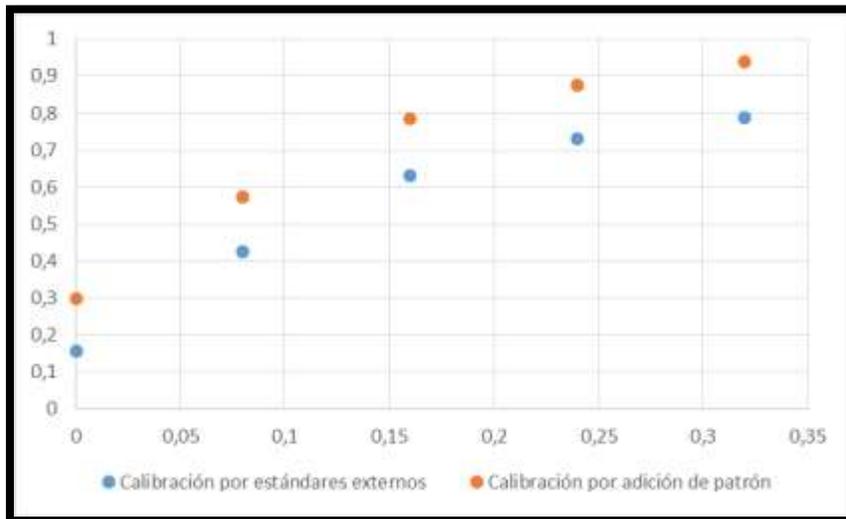


Figura 10. Curva de calibración por adición de patrón Cu

La curva de calibración por estándar externo para el Cu no tiene intersección en el punto 0, por ende ya existe una masa inicial de Cu en el estándar 0, como se observa en la Figura 10. En la alga utilizada para la elaboración de la curva de calibración por adición de patrón se observa que si existen trazas de cobre en la muestra alga.

c) Por adición de patrón con material de referencia certificado

- Para el plomo la ecuación es:

$$y = (0.23994 + 1.49x)/(1 + 1.6176x)$$

Con un $R^2=0.9945$

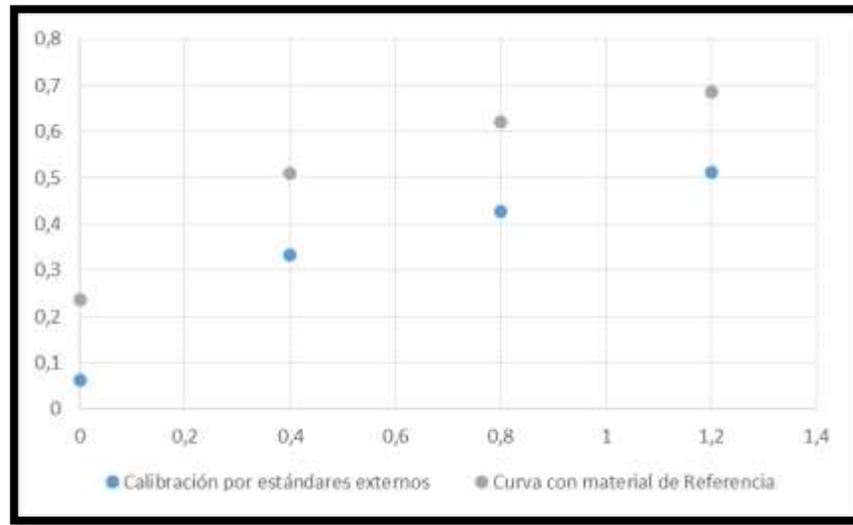


Figura 11. Curva de calibración adición de patrón-ERM-CD200 Pb

Se calculó el valor de la masa de plomo presente en un peso promedio de 0.20 mg de material de referencia, ya que este tiene una concentración de 0.51 mg/kg Pb, dando un valor de 0.1079 ng de Pb. Mediante la curva de calibración se determinó que el valor experimental de la masa es de 0.1079 ng de Pb, por ende la concentración de plomo en el ERM CD200 es de 0.54 mg/kg dando un error del 5.83%.

- Para el cadmio la ecuación es:

$$y = 4.7523x + 0.5502$$

Con un $R^2=0.9915$

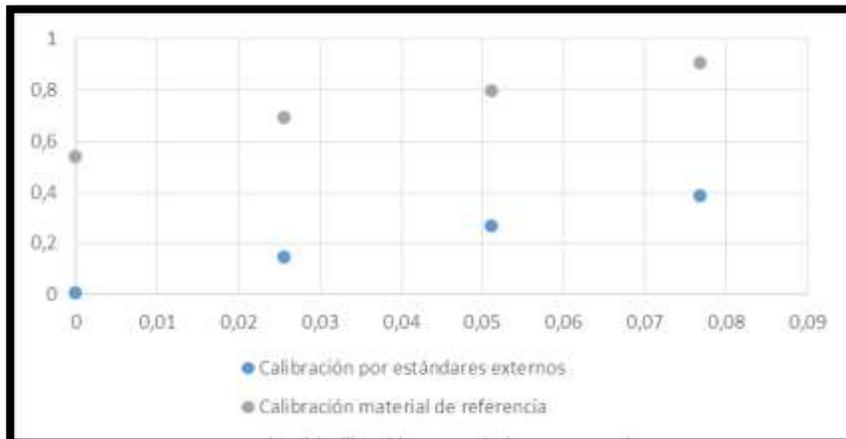


Figura 12. Curva de calibración por adición de patrón-ERM-CD200 Cd

Se cuantificó el valor de la masa de plomo presente en un peso promedio de 0.125 mg de material de referencia, pues tiene una concentración de 0.95 mg/kg de Cd, dando un valor de 0.1188 ng de Pb. Mediante la curva de calibración se obtuvo un valor experimental de 0.1132 ng de masa de Cd, por lo tanto concentración de cadmio en el ERM CD200 igual a 0.905 mg/kg dando un error del 4.70%.

- Para el cobre la ecuación es:

$$y = -4.5731x^2 + 3.3783x + 0.6021$$

Con un $R^2=0.9981$

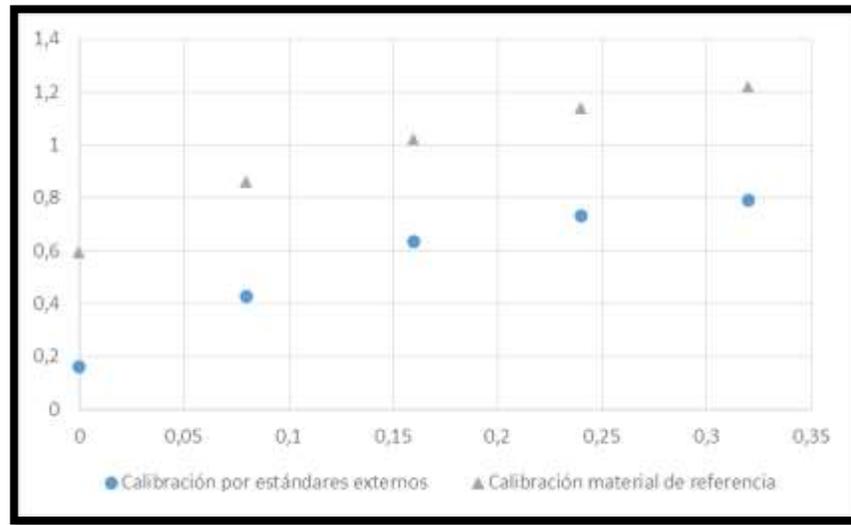


Figura 13. Curva de calibración por adición de patrón-ERM-CD200 Cu

Para el análisis de cobre se pesó de 0.07 mg de material de referencia de una concentración de 1.71 mg/kg de Cu, dando un valor de 0.1197 ng de cobre en su composición. Con la curva de calibración obtenida para el cobre se cuantificó un valor experimental de 0.1101 ng de masa de Cu, por lo tanto concentración de cobre en el ERM CD200 igual a 1.57 mg/kg teniendo error del 8.19%.

4.4. Desviación estándar y desviación relativa

El análisis se realizó con 4 réplicas de las medidas de absorbancia para cada punto de las curvas de calibración, a continuación se muestra las tablas con los valores de desviación estándar y desviación relativa, se observan en las tablas 15-17:

Tabla 15
Valores de absorbanza para el plomo

Calibración por estándar externo							
Mass	Absorbancia						
	Abs1	Abs2	Abs3	Abs4	Prom. Abs	SD	RSD
0	0,06861	0,06165	0,06046	0,06063	0,0628375	0,003363	5,352987
0,4	0,33881	0,34368	0,32613	0,31968	0,332075	0,009604	2,892384
0,8	0,43035	0,42348	0,43065	0,4231	0,426895	0,003609	0,845421
1,2	0,48968	0,54911	0,47335	0,53587	0,5120025	0,031380	6,128966
Calibración por adición de patrón							
Mass	Absorbancia						
	Abs1	Abs2	Abs3	Abs4	Prom. Abs	SD	RSD
0	0,20752	0,20802	0,19109	0,19446	0,2002725	0,007593	3,79165
0,4	0,44926	0,46916	0,44194	0,45328	0,45341	0,009960	2,19684
0,8	0,55629	0,59805	0,54898	0,54386	0,561795	0,021392	3,80794
1,2	0,61944	0,63513	0,6252	0,63564	0,6288525	0,006844	1,08848
Calibración con el material de referencia							
Mass	Absorbancia						
	Abs1	Abs2	Abs3	Abs4	Prom. Abs	SD	RSD
0	0,22889	0,23765	0,23892	0,24012	0,236395	0,004420	1,86982
0,4	0,51892	0,50514	0,51003	0,50126	0,5088375	0,006598	1,29680
0,8	0,6242	0,61754	0,62156	0,61964	0,620735	0,002454	0,39538
1,2	0,68441	0,68563	0,69248	0,68364	0,68654	0,003502	0,51010

Tabla 16
Valores de absorbanza para el Cadmio

Calibración por estándar externo							
Mass	Absorbancia						
	Abs1	Abs2	Abs3	Abs4	Prom. Abs	SD	RSD
0	0,00629	0,00647	0,00669	0,00639	0,00646	0,00015	2,28033
0,0256	0,15462	0,14453	0,14395	0,1455	0,14715	0,00435	2,95495
0,0512	0,27445	0,26601	0,26264	0,27358	0,26917	0,00500	1,85713
0,0768	0,37599	0,39243	0,39844	0,38163	0,3871225	0,00881	2,27537
Calibración por adición de patrón							
Mass	Absorbancia						
	Abs1	Abs2	Abs3	Abs4	Prom. Abs	SD	RSD
0	0,33146	0,36566	0,35301	0,35242	0,3506375	0,01227	3,49948
0,0256	0,44992	0,45548	0,44508	0,51761	0,4670225	0,02944	6,30325
0,0512	0,65226	0,59323	0,57499	0,60685	0,6068325	0,02856	4,70636
0,0768	0,71105	0,71536	0,70943	0,74284	0,71967	0,01355	1,88303
Calibración con el material de referencia							
Mass	Absorbancia						
	Abs1	Abs2	Abs3	Abs4	Prom. Abs	SD	RSD
0	0,50713	0,55945	0,54010	0,53920	0,536475	0,01877	3,49948
0,0256	0,59389	0,69688	0,68097	0,79194	0,690923	0,07027	10,17114
0,0512	0,86098	0,77713	0,75323	0,79497	0,796581	0,04002	5,02429
0,0768	0,89592	0,90135	0,89388	0,93597	0,906784	0,01708	1,88303

Tabla 17
Valores de absorbanza para el Cobre

Calibración por estándar externo							
Mass	Absorbancia						
	Abs1	Abs2	Abs3	Abs4	Prom. Abs	SD	RSD
0	0,152	0,16158	0,15364	0,15896	0,156545	0,00388	2,47979
0,08	0,41395	0,41786	0,46983	0,39597	0,424403	0,02750	6,47876
0,16	0,62854	0,63229	0,62495	0,63792	0,630925	0,00480	0,76088
0,24	0,71267	0,76855	0,69878	0,7438	0,73095	0,02715	3,71400
0,32	0,78395	0,78754	0,79887	0,78518	0,788885	0,00591	0,74883
Calibración por adición de patrón							
Mass	Absorbancia						
	Abs1	Abs2	Abs3	Abs4	Prom. Abs	SD	RSD
0	0,28880	0,30700	0,29192	0,30202	0,29744	0,00738	2,47979
0,08	0,55883	0,56411	0,63427	0,53456	0,57294	0,03712	6,47876
0,16	0,77939	0,79404	0,77494	0,79102	0,78485	0,00792	1,00850
0,24	0,85520	0,92226	0,83854	0,89256	0,87714	0,03258	3,71400
0,32	0,93290	0,93717	0,95066	0,93436	0,93877	0,00703	0,74883
Calibración con el material de referencia							
Mass	Absorbancia						
	Abs1	Abs2	Abs3	Abs4	Prom. Abs	SD	RSD
0	0,57760	0,61400	0,58383	0,60405	0,59487	0,01475	2,47979
0,08	0,83825	0,84617	0,95141	0,80184	0,85942	0,05568	6,47876
0,16	1,01321	1,03225	1,00742	1,02833	1,02030	0,01029	1,00850
0,24	1,11177	1,19894	1,09010	1,16033	1,14028	0,04235	3,71400
0,32	1,21277	1,21832	1,23585	1,21467	1,22041	0,00914	0,74883

4.5. Sensibilidad, Límite de detección y Límite de determinación

Para el plomo el límite de detección es de 0.0739, y su límite de cuantificación igual a 0.2218. Mientras que para el elemento cadmio el límite de detección es de 0.0069 y el límite de cuantificación de 0.020838.

Finalmente para el cobre su límite de detección y cuantificación son 0.1694 y 0.5080, respectivamente.

4.6. Concentración de metales en algas

La concentración de los metales pesados analizados en las algas verdes, algas rojas y algas pardas extraídas de las playas Los Frailes, Puerto López y Salango de la provincia de Manabí, se visualiza en la Tabla 18. Los valores obtenidos se encuentran dentro de los límites de efluentes contaminantes de aguas que permite las normas de control de contaminantes generadas en el TULSMA por medio de la Comisión de Legislación y Codificación. La norma indica que los límites permisibles de plomo, cadmio y cobre en aguas marinas es de 50, 5 y 10 ug/Kg de plomo, cadmio y cobre, respectivamente, esto con el fin de preservar la vida acuática.

Tabla 18
Concentración de metales en algas

Algas	Concentración (ug/kg)		
	Plomo	Cadmio	Cobre
Verdes	1.42 \pm 0.03	24.38 \pm 0.21	1.03 \pm 0.05
Rojas	1.56 \pm 0.05	13.22 \pm 0.06	3.67 \pm 0.02
Pardas	1.76 \pm 0.25	14.18 \pm 0.08	1.08 \pm 0.04

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

En las muestras de algas analizadas se encontró trazas de plomo, cadmio y cobre en concentraciones bajas que no exceden los límites permitidos en las normas de conservación del ambiente del TULSMA, para conservar la vida de especies marinas.

Se determinó la que el método desarrollado en este proyecto es adecuado, por medio del porcentaje de error porcentual entre la concentración de plomo, cadmio y cobre real y el experimental, presentes en el material de referencia, dando un valor menor al 10%.

La precisión del método analítico para cuantificar metales pesados en muestras solidas de algas marinas por medio de espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito es aceptable, ya que sus valores son menores a ± 1 .

Los límites de cuantificación para el plomo, cadmio y cobre son: 0.0739, 0.0069 y 0.1694, mientras que los límites de detección son: 0.2218, 0.02083 y 0.5081, respectivamente.

La muestra de referencia utilizada debe ser certificada y similar a las muestras a ser analizadas, para que se pueda comprobar las condiciones de operación óptimas en el análisis de algas marinas por espectrometría de absorción atómica con horno de grafito.

Es necesario el empleo de un modificador de matriz para determinar plomo, cadmio y cobre en algas marinas mediante espectrometría de absorción atómica con horno de grafito, para estabilizar la señal y lograr resultados favorables.

5.2. Recomendaciones

Se recomienda la utilización de ácido nítrico al 0.05% (V/V) para aforar los patrones preparados, así como las alícuotas de los estándares de plomo, cadmio y cobre y las muestras en blanco que se utilizó en el análisis, para asegurar la solubilidad de los metales.

Al momento de realizar el análisis de las curvas de calibración y de las muestras de algas, se debe asegurar que la posición del autosampler del ContrAA 700 sea la correcta, para evitar que las plataformas choquen con el horno y se destruyan.

Es de suma importancia ajustar el espectrómetro a la longitud de onda del elemento a ser analizado para realizar un correcto análisis y obtener resultados confiables.

Se debe verificar el flujo de argón y el estado del tubo de grafito antes de realizar el análisis, ya que el tubo tiende a desgastarse disminuyendo la sensibilidad provocando errores en los resultados.

Se debe trabajar con material de vidrio volumétrico para preparar las soluciones patrón y estándares, ya que la técnica GFAAS detecta concentraciones en ppb, por lo cual se requiere de exactitud y precisión en la preparación de las alícuotas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, M. (Septiembre de 2007). Determinación de metales pesados en suelos agrícolas del valle del Mezquital, HGO. México D.F, Estado de Hidalgo.
- Acosta, M., & Alvarez, M. (2007). Determinación de metales pesados en suelos agrícolas del valle del Mezquital, HGO. México D.F., Estado de Hidalgo.
- Alveal, K., Werlinger, C., & Romo, H. (2004). *Biología Marina y Oceanografía: Conceptos y Procesos* (Vol. I). Chile: Concepción: Gobierno de Chile, Consejo Nacional del Libro y la lectura.
- Analytik Jena AG. (2014). *Manual de ContrAA 700, Espectrómetro de alta resolución con fuente de radiación continua*. Alemania.
- Butcher, D. J., & Sneddon, J. (1998). *A practical guide to Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*. Canadá: Wiley.
- Chojnacka, K. (2010). Biosorption and bioaccumulation – the prospects for practical applications. *ELSEVIER*, 299-307.
- Comisión de Legislación y codificación. (2003). Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente. *NORMA DE CALIDAD AMBIENTAL Y DE DESCARGA DE EFLUENTES : RECURSO AGUA*. Ecuador.
- Eróstegui, C. (2009). Contaminación por metales pesados. (K. Romero, Entrevistador)
- G.W., B. (1980). Recent trends in research on heavy-metal contamination in the sea. *HELGOLANDER MEERESUNTERSUCHUNGEN*, 6-25.
- Gil, M., Torres, A., Harvey, M., & Esteves, J. L. (2006). Metales pesados en organismos marinos de la zona costera de la Patagonia argentina continental. *Scielo*, 167-176.
- Gómez, B., Gismera, M. J., Sevilla, M. T., & Procopio, J. R. (2013). Simultaneous and direct determination of iron and nickel in biological solid samples by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. *ELSEVIER*, 860-865.
- Hadeishi, & McLaughlin. (1985). Direct ZAAS Analysis of Solid Samples: Early Development. *Lawrence Berkeley Laboratory*, 657-659.
- Harris, D. (1992). *Análisis Químico Cuantitativo*. España: Reverté S.A.

- Ibañez, M. (1986). La contaminación marina por metales pesados en la Costa de Guipuzcoa. *LURRALDE*, 105-111.
- International Bio Power Corporation. (2017). *International Bio Power Corporation*. Recuperado el 10 de Marzo de 2018, de http://www.ibpcorp.biz/documentos/IBPCORP_Libro%20Algas_definitivo.pdf
- Järup, L. (2003). *Hazards of heavy metal contamination* (Vol. 68). London: OXFORD Academic.
- Kurfürst, U. (1998). *Solid Sample Analysis*. Germany: Springer.
- L'vov. (2005). Fifty Years of Atomic Absorption Spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry*, 382-392.
- Mai, H. e. (2013). Técnicas de preconcentración en el análisis de metales traza. Fraccionamiento químico en el control de la contaminación metálica de la Bahía de Tánger. 7-44. Cádiz, España.
- Mañay, N., Clavijo, G., & Díaz, L. (2009). Absorción atómica con horno de grafito. En *Metodologías analíticas para la determinación y especiación de As en aguas y suelos* (págs. 79-86). Argentina: CYTED.
- Mendoza, M. L. (1999). Las macroalgas marinas bentónicas de la Argentina. *Ciencia Hoy*, 90-98.
- Obiols Salvat, J. (1969). Espectrofotometría de absorción atómica, su aplicación en la industria del vidrio. *Bol. Soc. Esp. Cerám.*, Vol. 8(Nº 6), 659-668.
- Orozco B., C., Pérez S., A., González D. Nieves, M. N., Rodríguez V., F. J., & Alfayate B., J. M. (2003). *Contaminación ambiental*. España: Paraninfo.
- Peña, E. J., Palacios, M. L., & Ospina, N. (2005). *Algas como indicadores de contaminación*. Colombia: Universidad del Valle.
- Plaza, J. (2012). Remoción de metales pesados empleando algas. Argentina: Universidad Nacional de la Plata.
- Remache, A. M. (2016). Validación de métodos para el análisis de metales en diferentes matrices por espectrofotometría de absorción atómica. Quito.
- Rocha Castro, E. (2000). *Principios Básicos de Espectroscopía*. México: UACH.

- Romera, E., Gonzáles, F., Ballester, A., Blázquez, M., & Muñoz, J. (2007). Comparative study of biosorption of heavy metals using different types of algae. *ELSEVIER*, 3344–3353.
- Rondón, C. E. (1999). *Estudio de nuevos modificadores en la determinación de elementos trazasen matrices biológicas por Espectrometría de Absorción Atómica con Atomización Electrotérmica en Horno de Grafito*. Mérida, Venezuela.
- Ruíz Navarro, M., Rubio Armendáriz, C., González, L., Ojeda Feo, I., González-Weller, D., Gutiérrez Fernández, A., & Hardisson de la Torre, A. (2013). Metales en algas comestibles: Evaluación y estudios comparativo. *Rev. Toxicol*, 182-192.
- Skoog, J. (1998). *Principio de análisis instrumental*. Aravaca: McGraw-Hill.
- Tejada, C., Villabona, Á., & Garcés, L. (2014). Adsorción de metales pesados en aguas residuales usando materiales de origen biológico. *Tecno Lógicas*.
- Validación e incertidumbre en medidas químicas. (2009). En R. O. Crubellati, & C. D. Di Risio, *Aspectos práctcos de la validación e incertidumbre en medidas químicas* (págs. 15-63). CYTED. Obtenido de https://www.chaide.com/web/almohadas/memoryfoam?utm_source=Busqueda&utm_medium=Texto&utm_campaign=Almohadas&utm_term=Palabras%20Claves&utm_content=Memory%20Foam&gclid=EAlaIqobChMIyKeRhf_i3gIVVluGCh3avAu5EAAYASAAEgKugfD_BwE
- Vergara, C. (2010). Descripción de métodos de recolección y conservación de algas. *Herbario de la Universidad de Panamá*.

ANEXOS



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA ENERGÍA Y MECÁNICA

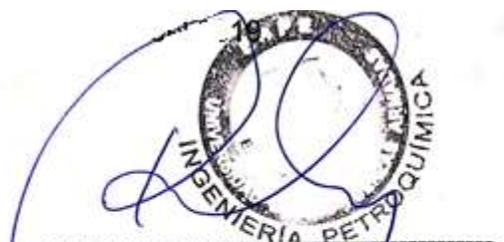
CARRERA DE INGENIERÍA EN PETROQUÍMICA

CERTIFICACIÓN

Se certifica que el presente trabajo fue desarrollado por la señorita: **JESSICA LORENA PEÑAHERRERA VEINTIMILLA.**

En la ciudad de Latacunga, a al 01 día del mes de febrero del 2019.

Aprobado por:



Dr. Rer. Nat., PhD Roman Rodríguez
DIRECTOR DE PROYECTO


Dr. Rer. Nat., PhD Roman Rodríguez
DIRECTOR DE CARRERA


Abg. Darwin Albán
SECRETARIO ACADEMICO
