

Análisis automatizado de la composición elemental de conchas de moluscos mediante Espectroscopía Láser de Ruptura (LIBS)

Automated analysis of the elemental composition of mollusk shells by Laser Breakdown Spectroscopy (LIBS)

Adolfo COBO¹, Asier GARCÍA-ESCÁRZAGA², Luis RODRÍGUEZ-COBO¹, Igor GUTIÉRREZ-ZUGASTI², Manuel R. GONZÁLEZ-MORALES², José Miguel LÓPEZ-HIGUERA¹

1. Grupo de Ingeniería Fotónica, Univ. de Cantabria, Avda. Los Castros s/n 39005 Santander.
2. Instituto Internacional de Investigaciones Prehistóricas de Cantabria, Edificio Interfacultativo, Univ. de Cantabria, Avda. Los Castros s/n 39005 Santander.

Persona de contacto: Adolfo Cobo (adolfo.cobo@unican.es).

RESUMEN:

La composición de las conchas de moluscos marinos ofrece una valiosa información sobre el entorno en el que se han desarrollado, por ejemplo, la temperatura del agua en cada momento de su crecimiento puede estimarse a partir de la relación magnesio/calcio o estroncio/calcio, o también a partir de la distribución de isótopos de oxígeno en diferentes puntos de la concha. Sin embargo, las técnicas actuales de análisis (como ICP-OES) necesitan de un proceso de muestreo y extracción de material a lo largo de la concha que es largo y tedioso. En este trabajo se propone la utilización de la técnica de espectroscopía atómica LIBS mediante láseres pulsados intensos para una estimación cuantitativa de los ratios Mg/Ca y Sr/Ca en cualquier punto de la concha y de forma automatizada, permitiendo reconstruir la secuencia de temperaturas del agua marina durante el crecimiento del molusco. Aplicada esta técnica a restos arqueológicos de conchas, es posible determinar la estación de captura e inferir por tanto información sobre el comportamiento de las poblaciones humanas en áreas costeras.

Palabras clave: LIBS, Espectroscopía, Láser, Arqueología, Composición Química.

ABSTRACT:

The chemical composition of marine mollusk shells offers useful information about their environment during their life span, for example, the seawater temperature at any moment can be estimated from the magnesium/calcium or strontium/calcium ratios, or from the oxygen isotopes distribution at specific points in the shell. However, current analytic techniques (like ICP-OES) need of long and cumbersome sampling procedures over the shell area. In this work, we propose to use the Laser Breakdown Spectroscopy (LIBS) technique with intense pulsed lasers to get a quantitative estimation of the Mg/Ca and Sr/Ca ratios at any point in the shell and in an automated way, allowing the reconstruction of the seawater temperature sequences during the mollusk lifespan. This technique can be applied to archaeological shells from the Mesolithic period to infer the season of capture and thus, to get information about the seasonality patterns of prehistoric groups in coastal areas.

Key words: LIBS, Spectroscopy, Laser, Archaeology, Chemical Composition.

1.- Introducción

La composición química de las conchas de moluscos marinos ofrece una valiosa información sobre las condiciones climáticas a lo largo de la vida del animal, debido a la dependencia del proceso de biomineralización con condiciones no solo internas sino también del entorno, como la temperatura y salinidad del agua. Así por ejemplo, los moluscos marinos crecen generalmente en equilibrio isotópico con el medio ambiente y durante el fraccionamiento isotópico las condiciones ambientales quedan registradas en el carbonato cálcico que se precipita durante la formación de la concha [1]. Así mismo, se ha comprobado que el calcio es parcialmente sustituido por magnesio o estroncio en proporciones variables, que algunos autores han conseguido correlacionar con la salinidad o la temperatura del agua en varias especies concretas [2]. Si bien es complicado estimar el valor absoluto de la temperatura o la salinidad a partir de estos ratios, sí es posible obtener la variación relativa en diferentes momentos del crecimiento del molusco, identificando así cada época del año a partir de los momentos de temperaturas máximas y mínimas correspondientes al verano y al invierno. Este tipo de análisis conlleva la medida de la composición en diferentes puntos espaciales de la concha que se correspondan con material biogenerado en diferentes momentos de la vida del molusco. Además, teniendo en cuenta las variaciones estacionales de la secuencia y el momento en el que acaba el crecimiento es posible determinar la época del año de captura o de su muerte.

El análisis de la composición de las conchas posibilita aplicaciones como el monitorizado de la contaminación ambiental, a partir de elementos (como metales pesados) incorporados del entorno en el proceso de biomineralización [3]. Otra aplicación interesante es el análisis de conchas arqueológicas. En numerosos yacimientos, en particular a lo largo de la costa atlántica europea, se han encontrado enormes acumulaciones de conchas que fueron consumidas y desechadas en épocas prehistóricas, principalmente durante el periodo mesolítico (entre hace unos 10.000 y 7.000 años) [4]. Estas conchas, principalmente de las especies *Patella vulgata* (gasterópodo)

do) y *Phorcus lineatus* (gasterópodos espirado) pueden ofrecer una valiosa información sobre los hábitos de estas poblaciones en áreas costeras. Por ejemplo, averiguando la época del año de captura es posible obtener información sobre la disponibilidad de recursos alimenticios o los patrones de asentamiento y/o desplazamiento de los grupos prehistóricos.

En ambos casos, para obtener resultados estadísticamente fiables, se hace necesario disponer de técnicas de análisis químico rápidas y precisas. Las técnicas más utilizadas actualmente, como la espectroscopía de emisión por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES) o la espectrometría de masas de relación isotópica (IRMS) ofrecen una buena precisión y sensibilidad, pero requieren de un muestreo y extracción de material en numerosos puntos, siendo éste un proceso largo y laborioso.

La técnica de espectroscopía de ruptura inducida por láser (LIBS), por otro lado, no requiere de ningún tipo de preparación de la muestra, y realiza la medida in-situ sobre su superficie, mediante la ablación de una muy pequeña cantidad de material en el punto donde se desee realizar el análisis. Para ello se emplean láseres pulsados de gran intensidad (usualmente del tipo Nd:YAG con Q-switching) focalizados sobre el punto de medida, junto con una sistema de captura de la luz emitida por la pluma de plasma generado que se trasmite a un espectrómetro. La señal espectral, compuesta por los picos de emisión de los elementos atómicos presentes en la muestra y radiación de fondo, es bastante ruidosa e incluso presenta gran variabilidad entre muestras consecutivas, lo que índice negativamente en la precisión global de la técnica y en su capacidad de cuantificación de la composición del material. Este problema se mitiga no obstante realizando un muestreo de múltiples pulsos laser en cada punto espacial, así como con la ayuda de espectrómetros con detector CCD intensificado, y con diversas técnicas de tratamiento de señal que se han propuesto [5]. Para algunas aplicaciones en las que simplemente se requiere estimar el ratio entre dos elementos químicos, como puede ser el ratio Mg/Ca, éste puede obtenerse simplemente a partir del

cociente de la intensidad de dos líneas de emisión cualquiera de los elementos en cuestión.

En este trabajo se propone la aplicación de la técnica LIBS para el análisis de la concentración de magnesio y estroncio en conchas de moluscos, proponiendo un montaje experimental totalmente automatizado que incluye el posicionamiento automático de las muestras, el seguimiento automático de una línea de muestreo arbitraria a lo largo de la concha, y el control automático de la focalización del láser para permitir la medida de muestras con geometrías complejas y superficies irregulares.

2.- Montaje experimental

El montaje experimental propuesto se muestra en la figura 1. Está compuesto por un láser pulsado Nd:YAG (Lotis LS-2147), con pulsos de 16ns de duración a 1064nm, un ritmo de repetición de 10Hz y hasta 0,9 Julios por pulso, aunque las energías utilizadas en los experimentos han sido en el rango de 15-20 mJ por pulso. La luz emitida por el plasma tras la ablación del material es capturada por una fibra óptica de 600 micrómetros de diámetro que conduce la luz hasta un espectrómetro Acton SP-300i (con red de difracción de 1200 líneas por milímetro y máxima eficiencia en 300 nm). Como detector se ha utilizado una cámara CCD intensificada Princeton Instruments PIMAX-3, con una ventana temporal de captura que se inicia 500 nanosegundos tras el pulso láser y tiene una duración de 20 microsegundos. De forma coaxial con la lente focalizadora del haz láser se ha situado una cámara CCD de visión industrial (AVT Guppy F-033) que permite visualizar un área alrededor del punto focal del láser de unos 7x5mm.

La muestra se sitúa en un posicionador motorizado con tres ejes ortogonales más un eje de rotación de 360°. El control automático del punto focal del láser se realiza mediante la imagen capturada por la cámara: antes de cada medida, se estima el grado de enfoque de la imagen de la superficie de la muestra en un área de 100x100 píxeles alrededor del punto de impacto del láser, utilizando una implementación [6] del algoritmo *Squared*

Gradient [7], para a continuación estimar el punto óptico de enfoque a través de un algoritmo de minimización. Todos los elementos del montaje (láser, espectrómetro, cámara y posicionador) son controlados a través de un software a medida realizado en Matlab®.

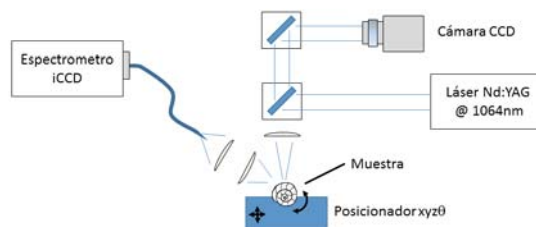


Fig. 1: Montaje experimental propuesto.

3.- Resultados

El sistema descrito en el apartado anterior ha sido utilizado para determinar los ratios Mg/Ca y Sr/Ca a lo largo del crecimiento de diferentes tipos de conchas, especialmente de *Patella vulgata* y *Phorcus lineatus*. Éste último presenta una concha en espiral que dificulta un muestreo en diferentes puntos cronológicos pero que puede ser fácilmente automatizado con el montaje propuesto.

En la figura 2 se muestra una imagen de un ejemplar moderno situado en el montaje, así como un detalle de parte de la superficie en la zona del borde, la más reciente antes de ser capturado. Nótese que parte del material más superficial ha sido eliminado mecánicamente, ya que la parte exterior de la concha (periostraco) está muy contaminada con agentes externos.

La superficie ha sido muestreada cada 500 micrómetros con un recorrido en espiral desde el borde. En cada punto espacial, se han integrado los espectros correspondientes a 50 pulsos del láser, cada uno con una energía de 16mJ.



Fig. 2: Concha moderna de un caracol marino *Porchus Lineatus* y detalle del camino muestreado.

Las líneas de emisión atómica utilizadas para el cálculo de los ratios han sido la de 285,21 nm de magnesio, 407,77 nm de estroncio y 300,69 nm ó 428,30 nm de calcio. La figura 3 muestra dos espectros obtenidos en dos rangos espectrales diferentes, donde pueden apreciarse las líneas de magnesio, estroncio y calcio utilizadas para el cálculo de los ratios.

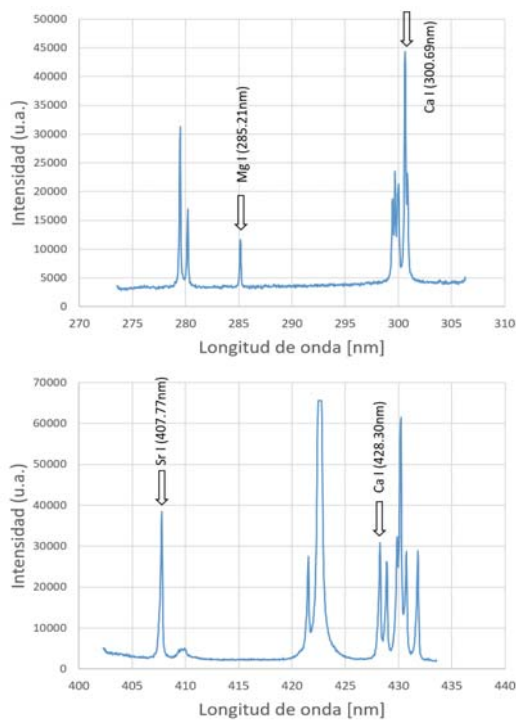


Fig. 3: Espectros de emisión atómica en dos rangos espectrales mostrando las líneas utili-

zadas para el cálculo del ratio Mg/Ca y Sr/Ca.

Finalmente, en la figura 4 se muestran las secuencias obtenidas a lo largo de una línea de muestreo que recorre en espiral la superficie de la concha, partiendo del borde en su apertura. Ambas secuencias se corresponden con dos ejemplares modernos diferentes de los que se conoce su fecha de captura, de forma que es posible valorar la capacidad de esta técnica para estimarla.

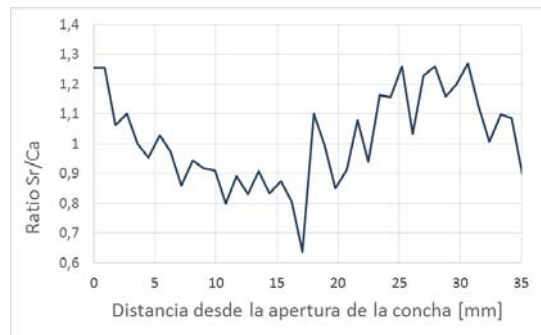
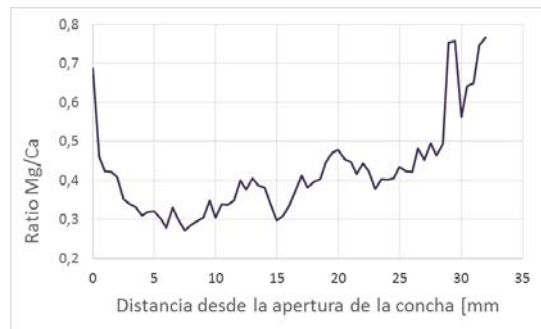


Fig. 4: Secuencias de los ratios Mg/Ca y Sr/Ca en dos ejemplares diferentes de *Phorcus lineatus*.

Para el caso del ratio Mg/Ca en el primer ejemplar, recogido a finales del mes de diciembre, se observa una ciclicidad de aproximadamente un año, con un incremento del valor al final de la vida del molusco. En el caso del ratio Mg/Ca en esta especie, hay una dependencia inversa de la cantidad de magnesio incorporado en la concha con la temperatura del agua, con lo que el descenso de temperatura sugerido por la curva al final del periodo de vida coincide con el inicio del invierno.

En el caso de la secuencia para el ratio Sr/Ca, que en este caso tiene una dependencia direc-

ta con la temperatura del agua marina, se observa una ciclicidad superior a un año, con un incremento de la temperatura llegando al valor máximo. Esto se corresponde con la época de máxima temperatura del agua (septiembre), y que coincide muy bien con la fecha de captura (1 de octubre).

4.- Conclusión

Se ha aplicado la técnica LIBS al análisis elemental de la composición de conchas de moluscos, con un montaje que permite la medida automatizada de muestras con geometrías complejas. El cálculo de las secuencias de ratios Mg/Ca y Sr/Ca a lo largo de un camino en la superficie de la concha permite obtener una estimación de las temperaturas del agua en diferentes momentos de la vida del molusco y de ahí estimar la fecha de captura. Este dato es de gran interés en conchas arqueológicas ya que permite inferir datos sobre los hábitos de los pobladores primitivos.

Los resultados obtenidos con muestras modernas del caracol marino *Phorcus lineatus*, de fecha de recogida conocida, muestran la idoneidad de la técnica propuesta, ya que la posibilidad de análisis sin necesidad de extraer material de la concha así como la automatización llevada a cabo, permiten un análisis mucho más rápido y sencillo que con técnicas alternativas.

Los trabajos actuales van enfocados a validar los resultados con las técnicas ICP- OES y de isótopos de oxígeno, así como a aprovechar la capacidad de ablación del láser para penetrar en el material de la concha y realizar el análisis de capas sub-superficiales, eliminando la necesidad de cualquier tratamiento previo de las muestras.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido realizado parcialmente con los medios aportados por los proyectos TEC2013-47264-C2-1-R y HAR2013-46802-P.

Referencias

[1] A.L. Prendergast, R.E. Stevens, “*Molluscs (Isotopes): Analyses in Environmental Archaeology*” en C. Smith, “*Encyclopedia of Global Archaeology*” (Springer, 2014).

[2] J. E. Ferguson, G.M. Henderson, D. A. Fa, J. C. Finlayson, N. R. Charnley, “*Increased seasonality in the Western Mediterranean during the last glacial from limpet shell geochemistry*”, *Earth and Planetary Science Letters* 308, 325–333, 2011.

[3] A.G. Howard, G. Nickless, “*Heavy-Metal Complexation in Polluted Mollusks .I. Limpets (Patella-Vulgata and Patella-Intermedia)*”, *Chemico-Biological Interactions*, Vol. 16, No. 1, 107-114, 1977.

[4] I. Gutiérrez-Zugasti, S.H. Andersen, A. C. Araújo, C. Dupont, N. Milner, A.M. Monge-Soares, “*Shell midden research in Atlantic Europe: State of the art, research problems and perspectives for the future*”, *Quaternary International*, 239(1–2): 70-85. DOI: 10.1016/j.quaint.2011.02.031 (2011).

[5] D. W. Hahn, N. Omenetto, “*Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS), Part II: Review of Instrumental and Methodological Approaches to Material Analysis and Applications to Different Fields*” *Applied Spectroscopy*, Vol. 66, Issue 14, 2012.

[6] S. Pertuz, “*Focus Measure*”, disponible en <http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/27314-focus-measure> (última comprobación 01/5/2015).

[7] A. Eskicioglu, P.S. Fisher, “*Image quality measures and their performance*”, *IEEE Transactions in Communications*, 43(12), 1995.