



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS**

**“Desarrollo y optimización de técnicas de preparación de  
muestras y de análisis cuantitativo de elementos traza en frutas  
y verduras mediante PIXE.”**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

Alibech Mireles Diaz



TUTOR: Dra. Corina Solís Rosales

2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*A mis padres Hilda T. Diaz y Ramon G. Mireles*

**Instituto de Física, UNAM**

## *Agradecimientos:*

*Primero quisiera agradecer a la Dra. Corina Solís Rosales por darme la oportunidad de continuar mi superación. Agradezco mucho todo su apoyo, contribución y diligencia que fueron vitales durante el desarrollo del proyecto. Gracias por la confianza y por toda la ayuda brindada tanto en el plano profesional como personal.*

*Me es grato reconocer la valiosa contribución de la Dra. Ángela Sotelo, el Dr. Manuel Navarrete, el Dr. Javier Miranda, la Dra. Isabel Gamboa y el Dr. Efraín Chávez, por estar siempre presentes y por contribuir a enriquecer este trabajo con su excelencia académica y profesional.*

*A Jannier Roiz por todo lo que hemos vivido juntos, por su amor y su apoyo incondicional.*

*Quisiera agradecer a mis padres, hermano, abuelas, tíos y primos por el amor, el cariño y todo lo bueno que han hecho siempre por mí.*

*A los doctores Alicia Negrón, Juan Aspiazu, Guillermina Burillo y Maria del Carmen Wachter por sus valiosas sugerencias, comentarios y críticas durante la revisión de la tesis.*

*A mis profesores Sergio Ramos, José Jiménez y Trinidad Martínez por su apoyo y su disposición a enseñarme y guiarme cada vez que lo necesité.*

*A DGEP por apoyarme con una beca completa durante mis estudios de doctorado.*

*Al Instituto de Física de la UNAM y al Crocker Nuclear Laboratory de la UC Davis por todos los recursos y facilidades brindadas para la realización de este trabajo. En especial quisiera agradecer al Dr. Manuel Lagunas Solar y a la Dra. Cecilia Piña.*

*A todos mis amigos por los buenos momentos que hemos pasado juntos.*

*A Karim López y Francisco Jaimes por su dedicación, eficiencia y por toda la ayuda brindada durante el análisis de las muestras en el Peletrón.*

*Al Dr. Héctor Manjarrez por su incondicional ayuda y disposición siempre que lo necesitamos.*

*A Eustacio Pérez-Zavala, **Rebeca** y Jorge Barreto por su apoyo técnico durante el desarrollo del proyecto.*

*Al Dr. Carlos Longoria, a la M. en C. Carmen López y a la M. en C. Rosalía Ramos por los análisis de las muestras con Activación Neutrónica y Absorción Atómica.  
A Guillermina por su eficiencia, pero sobre todo por su amabilidad y cariño.*

*A Josefina Tenopala, Guadalupe Zarza, Rosa María Viñas, María Leticia Rosas y María Teresa Cázares por todo el apoyo brindado durante mi estancia en el UNAM.*

*A UC-MEXUS-CONCyT y DGAPA (IN228603-3) por todos los recursos y facilidades brindadas para la realización de este trabajo.*

*"Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos es el océano."  
Isaac Newton*

## Índice general

<b>Introducción</b>	1
<b>Capítulo 1. Técnicas analíticas</b>	
1.1 Aspectos teóricos.	4
1.1.1 Mecanismos de interacción de las partículas cargadas con la materia.	4
1.1.2 Interacción de los rayos X y $\gamma$ con la materia.	5
1.1.3 Interacción de los neutrones con la materia.	5
1.2 Emisión de rayos X inducida por partículas (PIXE).	6
1.2.1 Principios.	6
1.2.2 Origen del fondo en los espectros de rayos X.	9
1.2.3 Sección eficaz de ionización.	10
1.2.4 Instrumentación para PIXE.	11
1.2.5 Influencia de la matriz.	18
1.2.6 Exactitud, precisión y límites de detección.	18
1.3 Análisis por activación neutrónica (AAN).	19
1.3.1 Principios.	19
1.3.2 Instrumentación.	20
1.3.3 Métodos analíticos.	20
1.3.4 Influencia de la matriz.	21
1.3.5 Exactitud, precisión y límites de detección.	21
1.4 Absorción atómica (AA).	22
1.4.1 Principios.	22
1.4.2 Influencia de la matriz.	22
1.4.3 Exactitud, precisión y límites de detección.	23
1. Bibliografía.	23
<b>Capítulo 2. Metodología</b>	
2. Introducción.	24
2.1 Preparación de muestras.	24
2.1.1 Modelo completo de reacción.	25
2.1.2 Esquema de preparación de muestras.	27
2.2. Materiales y Métodos.	28
2.2.1 Estudio de campo	28
2.2.2 Preparación de muestras con fotólisis UV.	30
2.2.3 Preparación de las muestras para su análisis con PIXE después de la fotólisis UV.	31
2.2.4 Pastillas de suelos.	33
2.2.5 Calcinación.	33
2.3 Análisis con PIXE.	33
2.3.1 Tipos de blancos.	33
2. Bibliografía.	34

### **Capítulo 3. Obtención de las concentraciones (Programa GUPIX)**

3.1.	Cuantificación con PIXE.	35
3.2	Programa para el cálculo de las concentraciones (GUPIX).	36
3.2.1	Modelo de los picos.	38
3.2.2	Filtrado del fondo.	39
3.2.3	Subrutinas del programa.	39
3.2.4	Control de errores.	39
3.	Bibliografía.	40

### **Capítulo 4. Optimización y validación del método**

4.1	Diseño de experimento factorial para la optimización del proceso de digestión con fotólisis UV.	41
4.1.1	Diseño factorial.	41
	• Materiales y métodos.	43
4.2	Validación de un método analítico.	44
	• Precisión.	44
	• Linealidad.	44
	• Exactitud y repetibilidad del método.	45
	• Estabilidad analítica de la muestra.	46
	• Sensibilidad.	46
	• Robustez.	46
	• Materiales y métodos.	46
4.	Bibliografía.	47

### **Capítulo 5. Importancia toxicológica de los metales traza.**

5.1	Introducción	48
5.2	Efectos del hierro en la salud humana.	48
5.3	Efectos del cobre en la salud humana.	49
5.4	Efectos del zinc en la salud humana.	49
5.5	Efectos del plomo en la salud humana.	50
5.	Bibliografía.	51

### **Capítulo 6. Resultados y discusión**

6.1	Optimización de la fotólisis UV.	52
6.1.1	Comparación entre la reducción de masa con UV y cenizas.	55
6.1.2	Porcentajes de recuperación después de la UV.	56
6.1.3	Porcentajes de recuperación después de la preconcentración.	58
6.1.4	Resultados del método optimizado para estándares internacionales.	61
6.1.5	Descripción de la metodología final.	62



6.1.6	Porcentaje de recuperación de los elementos con cenizas.	62
6.2	Validación.	63
	• Precisión del sistema.	63
	• Linealidad del sistema.	65
	• Exactitud y repetibilidad del método.	65
	• Linealidad del método.	67
	• Estabilidad analítica de la muestra.	67
	• Sensibilidad.	69
	• Robustez.	70
6.3	Análisis de metales traza en suelos y plantas de dos zonas cercanas a la Ciudad de México irrigadas con aguas residuales.	71
6.3.1	Estudio de suelos.	71
6.3.2	Estudio de plantas.	73
6.	Bibliografía.	82
 <b>Conclusiones</b>		 84
Anexo I.	Fórmulas de cálculo empleadas en la validación.	86
Anexo II.	Reducción de masa de diferentes matrices usando la descomposición de la materia orgánica por calcinación o cenizas.	88
Anexo III.	Curvas de linealidad del sistema y del método.	90
Anexo IV.	Nombres científicos de algunas de las plantas estudiadas.	94

## Introducción

El desarrollo económico e industrial ha traído como consecuencia el aumento en la cantidad de elementos traza en el medio ambiente. Por décadas, actividades del ser humano como la minería y la fundición, actividades industriales y la generación y consumo de energía, han resultado en la liberación de metales y otros elementos en el suelo, el agua y la atmósfera. Diversas prácticas agrícolas, como el uso de fertilizantes, pesticidas y el riego con aguas residuales contaminadas, entre otras, han contribuido de manera importante al aumento de la concentración de elementos traza en el entorno. Las estrategias actuales de control de la contaminación no son suficientes para revertir la generación y difusión de sustancias tóxicas en el ambiente. Además, niveles elevados de metales traza se están reportando todavía en zonas urbanas y de cultivo de algunos países [1,2,3].

El impacto de estos metales traza y elementos contaminantes en la salud pública y del medio ambiente se ha convertido en un tema prioritario para científicos, políticos y ciudadanos. En especial, la presencia potencial de elementos tóxicos en los alimentos ha sido de preocupación general entre los consumidores. Los metales y otros elementos están presentes de manera natural en las plantas y animales; algunos de estos elementos son incluso componentes esenciales para la vida. Sin embargo, estas concentraciones han sido alteradas en mayor o menor grado por la actividad humana, alcanzando en ocasiones niveles tóxicos.

A nivel internacional se han establecido nuevos estándares de calidad en alimentos que salvaguarden la salud pública y las prácticas justas de comercio. A fin de garantizar el cumplimiento de estos objetivos se han adaptado técnicas analíticas existentes y se han desarrollado otras, para la determinación de elementos traza en alimentos. Estas técnicas deben permitir un monitoreo altamente sensible, preciso y rápido, dadas las limitaciones en tiempo que supone el manejo de productos alimenticios.

Las técnicas analíticas de origen nuclear, en particular la de emisión de rayos X inducida por partículas (PIXE), muy empleada en diversas disciplinas, se utilizan cada vez con más frecuencia en el campo de las ciencias naturales, donde se ha ido convirtiendo en una poderosa herramienta de análisis multielemental [4]. Con PIXE es posible detectar en un sólo evento una gran cantidad de elementos, generalmente con  $Z > 11$ . Es además una técnica no destructiva y permite cuantificar concentraciones del orden de 1 mg/kg en matrices biológicas [4].

El objetivo de este proyecto es desarrollar y optimizar las técnicas de preparación de muestras y de análisis cuantitativo de elementos traza en frutas y verduras mediante PIXE. La rapidez del análisis puede ser crítica en el caso de las frutas y las verduras debido a que sólo permanecen frescos por pocos días, además en alimentos es frecuente encontrar ciertos elementos en concentraciones tóxicas inferiores a 1 mg/kg, para los que se requiere de una preparación de muestras capaz de concentrar estos elementos a niveles cuantificables con PIXE.

Por esto, para lograr nuestro objetivo, proponemos un nuevo método de preparación de muestras lo suficientemente rápido, como para realizar el análisis de estas frutas y verduras

frescas. Este método consiste en la digestión de la materia orgánica mediante la fotólisis UV, usando un láser excímero, la preconcentración de los metales presentes en la muestra como carbamatos y su posterior cuantificación con PIXE. Se optimizaron los parámetros principales de la digestión y se comparó con un método convencional como la ceniza (descomposición de la materia orgánica por calcinación). Además se validaron los resultados de las concentraciones obtenidas con PIXE y se comparó ésta con otras técnicas analíticas, como Análisis por Activación Neutrónica (AAN) y Absorción Atómica (AA).

En el caso específico de la Ciudad de México, existen dos importantes sitios de cultivo cercanos a ella (Valle del Mezquital y Tláhuac), que por décadas han sido irrigados con aguas residuales de la ciudad y de varias industrias. En la actualidad, esas fuentes de agua se siguen empleando. En el caso de Tláhuac, las aguas son parcialmente tratadas, pero no así en el caso del Valle del Mezquital. Es por esto que resulta de gran importancia estudiar los niveles de concentración de metales pesados en las plantas y suelos de estos sitios, lo cual realizamos aplicando el método validado para el caso de las plantas y el método convencional de preparación de muestras para los suelos.

En el Instituto de Física de la UNAM contamos con tres aceleradores de partículas (2 aceleradores Van de Graaff y un acelerador Peletrón) los cuales pueden emplearse para realizar análisis con PIXE. Esto sin olvidar la vasta experiencia de numerosos investigadores en el empleo de PIXE en sus diversas ramas de aplicación [2,5,6].

#### *Estructura de la tesis*

La tesis consta de 5 capítulos. En el primero se describen brevemente los principios físicos de las técnicas analíticas utilizadas durante el desarrollo del proyecto, haciendo énfasis en PIXE. El segundo describe cómo se realizó la preparación de muestras en cada uno de los casos. En el tercero se da a conocer el programa que se usa para el análisis de los espectros obtenidos con PIXE, conocido con el nombre de GUPIX, que determina las concentraciones de los elementos de interés. El cuarto capítulo describe el diseño de experimentos para la optimización de los parámetros fundamentales de la digestión por fotólisis UV y en que consiste cada uno de los parámetros de desempeño estudiados durante la validación del método, con sus criterios de aceptación. En el quinto se muestran los resultados y la discusión de la optimización del método, la validación y las concentraciones en plantas y suelos colectados en Tláhuac y el Mezquital.

#### *Referencias*

- [1] R.G. Flocchini, M. Lagunas-Solar and B.P. Perley. *Applications of X-ray emission to elemental analysis of foods*. Second International Symposium on BIO\_PIXE, August 19-22, 1996. Beijing, China.
- [2] J. Miranda, A. López-Suárez, R. Paredes-Gutiérrez and S. González. *A study of Atmospheric Aerosols from Five Sites in Mexico City using PIXE*. Nucl. Instr. and Meth. in Phys Res. B 136-138 (1998) 970-974.

[3] H. Pinochet, I. de Gregori, M.G. Lobos and E. Fuentes. *Selenium and Copper in Vegetables and Fruits Grown on Long-term Impacted Soils from Valparaiso Region Chile*. Bulletin Environmental Toxicology 63 (1999) 327-334.

[4] S.A.E. Johansson, and J.L. Campbell. *PIXE: A novel technique for elemental analysis*. Jonh Wiley & Sons LTD (1988) 347 pp.

[5] C. Solís, A. Oliver and E. Andrade. *PIXE analysis of proteins from a photochemical center*. Nucl. Instr. and Meth. in Phys Res. B 136-138 (1998) 928-931.

[6] C. Solís, A. Oliver, E. Andrade, J.L. Ruvalcaba, I. Romero and H. Celis. *PIXE Analisis of Zn enzymes*. Nucl. Instr. and Meth. in Phys Res. B 150 (1999) 222-225.

## Capítulo 1: Técnicas analíticas

Durante el desarrollo del proyecto se emplearon varias técnicas analíticas: PIXE como la técnica propuesta para desarrollar el método de análisis y cuantificación de elementos en frutas y verduras, AAN y AA para comparar y validar los resultados obtenidos con PIXE. En este capítulo se describen los principios físicos generales de cada una de las técnicas, así como algunos aspectos de instrumentación.

### 1.1 Aspectos teóricos. [1]

#### 1.1.1 Mecanismos de interacción de las partículas cargadas con la materia.

Cuando una partícula cargada penetra en un medio, experimenta una serie de colisiones con los átomos que lo constituyen. Sin embargo, dado el “vacío” relativo existente en el interior del átomo, las colisiones mecánicas por choque directo entre la partícula y los electrones o núcleos, son improbables. En realidad, el proceso predominante es la colisión coulombiana, proceso de interacción debido a las fuerzas eléctricas producidas entre la partícula incidente y los electrones y núcleos del medio absorbente. Esta interacción produce una pérdida casi continua de la energía de la partícula, hasta que se frena.

Estas colisiones pueden ser caracterizadas de acuerdo al parámetro de impacto  $b$ , en función del radio atómico  $a$ .

Colisiones suaves ( $b \gg a$ ): la partícula cargada pasa a una distancia considerable del átomo, afectándolo como un todo y causando los siguientes efectos:

- Excitación del átomo a un nivel superior de energía.
- Ionización (sacando un electrón de valencia).

Colisiones fuertes ( $b \sim a$ ): La partícula cargada interacciona con un electrón atómico, arrancándolo del átomo con una energía cinética considerable. Estas colisiones son pocas en comparación con las suaves, pero las fracciones de energía perdidas son comparables. La energía máxima transferida al electrón es de  $4mE/M$ , donde  $E$  y  $M$  son la energía y la masa de la partícula incidente y  $m$  es la masa del electrón. En el caso que nos ocupa, esta energía máxima es de aproximadamente 6.67 keV para protones de 3 MeV.

Interacciones coulombianas con el campo externo del núcleo ( $b \ll a$ ): Son más importantes para los electrones, que son dispersados elásticamente. No es un mecanismo importante de transferencia de energía, pero sí de desviación de los electrones. Este mecanismo ocurre un 97-98% de las veces.

En el restante 2-3% las partículas sufren interacciones inelásticas radiativas, en las cuales se emite radiación electromagnética. Las partículas pueden transferir hasta el 100% de su energía al fotón de rayos X, frenándose en el proceso. Este mecanismo de interacción se conoce como radiación de frenado o *bremsstrahlung*. Este efecto es el mayor contribuyente del fondo observado en los espectros de PIXE.

La probabilidad de que ocurra emisión de radiación de frenado es proporcional a la  $Z^2$  del medio e inversamente proporcional a la masa de la partícula cargada al cuadrado. La generación de radiación de frenado por partículas cargadas que no sean electrones, es insignificante. Además depende de la  $Z$  del medio, por lo que para medios ligeros es relativamente pequeña.

**Interacciones nucleares:** Una partícula cargada pesada con suficiente energía y  $b <$  radio nuclear, puede interactuar inelásticamente con el núcleo y cuando uno o más nucleones son golpeados pueden ser expulsados del núcleo. Éste, altamente excitado, decae emitiendo nucleones y rayos  $\gamma$ .

### 1.1.2 Interacción de los rayos X y $\gamma$ con la materia.

**Efecto fotoeléctrico:** En este caso, los fotones incidentes son totalmente absorbidos por los electrones que están ligados a los núcleos atómicos del material, siendo estos electrones expulsados a grandes velocidades a través de él. Los electrones portan la energía del fotón absorbido menos la energía de enlace.

**Efecto Compton:** Este efecto es consecuencia de una colisión entre el fotón incidente y un electrón que se encuentre libre o poco ligado en el material. Como resultado de la interacción se tiene un electrón libre y otro fotón; entre ambos se reparten la energía del fotón incidente. Una representación esquemática de este efecto se muestra en la figura 1.1.

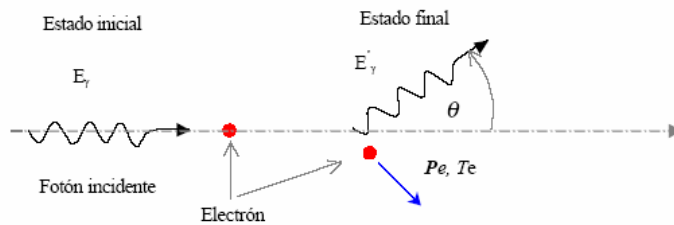


Fig.1.1: Representación esquemática del efecto Compton.

**Creación de pares electrón-positrón:** El proceso ocurre en el campo de un núcleo del material absorbente y corresponde a la creación de un par electrón-positrón a expensas de un fotón incidente que desaparece en el mismo punto. Esto sucede cuando la energía del fotón es mayor que, por lo menos, dos veces la masa en reposo del electrón ( $E = 1.022$  MeV) y tiene como consecuencia nuevamente que un electrón se mueva a través del material. El positrón se aniquila muy rápidamente con otro electrón, por lo que tenemos nuevamente fotones y electrones moviéndose en el medio.

### 1.1.3 Interacción de los neutrones con la materia.

Los neutrones tienen masa casi igual a la del protón, pero no tienen carga eléctrica. Sin embargo, se ven afectados por la fuerza nuclear. En consecuencia, no ionizan directamente a los materiales por no interactuar con los electrones; el único efecto que pueden

producir es chocar directamente con los núcleos. Como este efecto es poco probable, los neutrones pueden recorrer distancias de algunos centímetros sin sufrir ninguna colisión.

Cuando llegan a incidir directamente sobre un núcleo, puede suceder cualquiera de los siguientes procesos: dispersión elástica y reacciones nucleares (que incluyen la dispersión inelástica, la captura radiativa y la fisión nuclear). En algunas reacciones hay absorción de neutrones, en otras hay producción adicional.

La dispersión elástica se puede visualizar como el choque de dos bolas de billar, aunque en nuestro caso el blanco es siempre más pesado que el proyectil. Al chocar el neutrón con un núcleo, rebota en cualquier dirección, transfiriéndole al núcleo una cantidad de energía cinética. Esta energía transferida es mayor entre más ligero sea el núcleo. La energía se transfiere a costa de la energía del neutrón incidente, por lo que éste se desvía en cada colisión y pierde una fracción de su energía.

En las reacciones nucleares el neutrón es absorbido por el núcleo, emitiendo después otras radiaciones. Si sucede la llamada dispersión inelástica, el núcleo residual queda en estado excitado, y el neutrón emitido pierde una parte considerable de su energía. Cuando se trata de captura radiativa, ocurre la emisión de un fotón gamma, desapareciendo el neutrón. En los elementos pesados como el uranio, los neutrones pueden inducir la fisión nuclear, en la cual se emiten dos fragmentos pesados de fisión y varios nuevos neutrones. Los neutrones pueden inducir muchos otros tipos de reacciones nucleares, emitiéndose, por ejemplo, protones, partículas alfa, deuterones y combinaciones de ellos.

En la mayoría de las reacciones productoras de neutrones, éstos son emitidos con energías del orden de varios MeV, y son denominados neutrones rápidos. Al incidir en cualquier material, los neutrones rápidos sufren preferentemente dispersiones elásticas con los núcleos. Van rebotando de núcleo en núcleo, perdiendo cada vez una fracción de su energía inicial, hasta que después de muchos choques (pueden ser varios cientos) su velocidad promedio es comparable con las velocidades térmicas de las moléculas. Se llaman entonces neutrones térmicos, y sus energías son del orden de 0.025 eV.

## **1.2 Emisión de rayos X inducida por partículas (PIXE) [2,3,4,5,6,7]**

### ***1.2.1 Principios.***

PIXE es un método analítico basado en la emisión de rayos X. Cuando protones con energías usualmente entre (1-4) MeV arrancan electrones de las capas internas de los átomos, ocurre un rápido proceso de reordenamiento, donde las vacantes producidas se rellenan con electrones de niveles exteriores, como se muestra en la figura 1.2. El exceso de energía se libera mediante la emisión de rayos X y/o electrones Auger. Este último es un proceso no radiativo y compite con la emisión de rayos X.

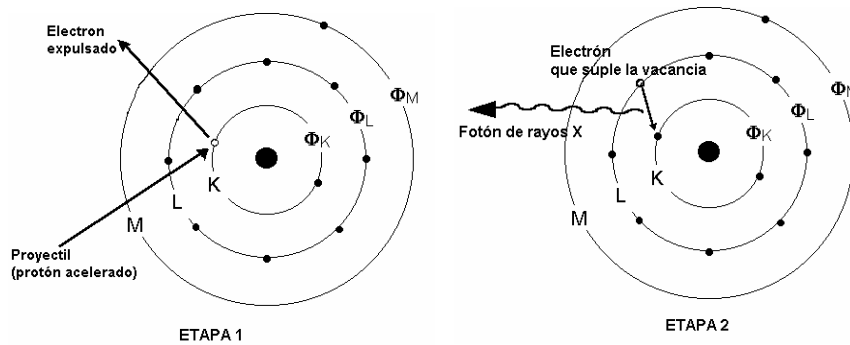


Fig 1.2: Etapas de producción de rayos X característicos.

La contribución relativa de cada uno de los procesos se caracteriza generalmente con el rendimiento de fluorescencia, que es la probabilidad de que se emita un fotón cuando se llena una vacante. El rendimiento de fluorescencia es cercano a 1 para elementos pesados y es una fracción muy pequeña para los elementos ligeros. El relleno de las vacantes, de acuerdo con la teoría cuántica, en la que sólo algunas transiciones entre niveles están permitidas, se produce según se muestra en la Fig.1.3 para elementos medios y pesados.

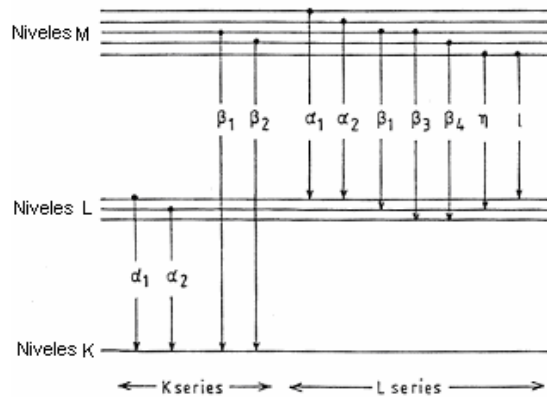


Fig.1.3: Transiciones permitidas para el relleno de vacancias en átomos medios y pesados.

El espectro de rayos X está determinado por los niveles de energía de los electrones en el átomo, por lo que son característicos de cada elemento, permitiendo la identificación del mismo.

Las transiciones hasta la capa K se denominan  $K_\alpha$  cuando provienen de la capa L y  $K_\beta$  cuando provienen de la capa M. Las transiciones hasta la capa L se denotan como  $L_\alpha, L_\beta$ , etc. y tiene muchas componentes, sobre todo en el caso de los elementos pesados. El espectro completo de rayos X es bastante complicado, aunque algunas de las componentes



tienen aproximadamente la misma energía. Por ejemplo la  $K_{\alpha 1}$  y  $K_{\alpha 2}$ , por lo que aparecen en el espectro como un solo pico; además, algunas transiciones son de poca intensidad.

La eficiencia de los detectores usados [Si(Li) o Ge] permanece casi constante en el intervalo de energías de 5-25 keV, pero decae bruscamente para energías menores o mayores. Es esta propiedad, junto con la disminución de la sección eficaz de producción de líneas K con el aumento de Z, lo que determina qué serie de rayos X se utiliza para el análisis de cada elemento. En la Fig.1.4 se muestra la energía de los rayos X correspondientes a cada serie en función del número atómico de los elementos.

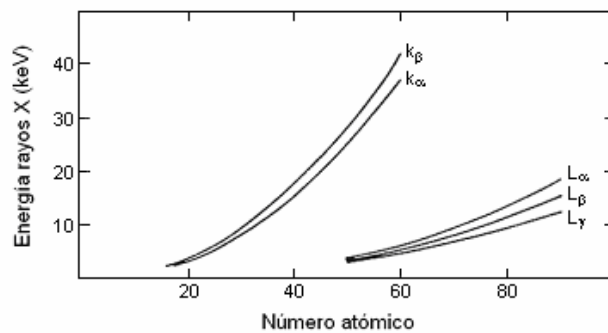


Fig.1.4: Energía de las líneas principales de emisión de rayos X en función del número atómico.

Conocer las tasas de emisión (intensidades relativas, i.e.  $K_{\beta}/K_{\alpha}$ ) de cada una de las líneas es de suma importancia para el proceso de cuantificación con PIXE. Las mismas permiten separar las líneas traslapadas presentes en el espectro. Por ejemplo, las que se traslapan en la región de la  $K_{\alpha}$  del elemento Z y la  $K_{\beta}$  del elemento Z-1, para el caso de las líneas K. Estas intensidades relativas han sido calculadas con una gran variedad de aproximaciones teóricas, usándose para la determinación de las concentraciones las más rigurosas.

Un espectro típico de PIXE se muestra en la Fig.1.5. Está compuesto fundamentalmente por las líneas  $K_{\alpha}$  y  $K_{\beta}$  de los elementos ligeros y medios y las líneas L de los elementos pesados.

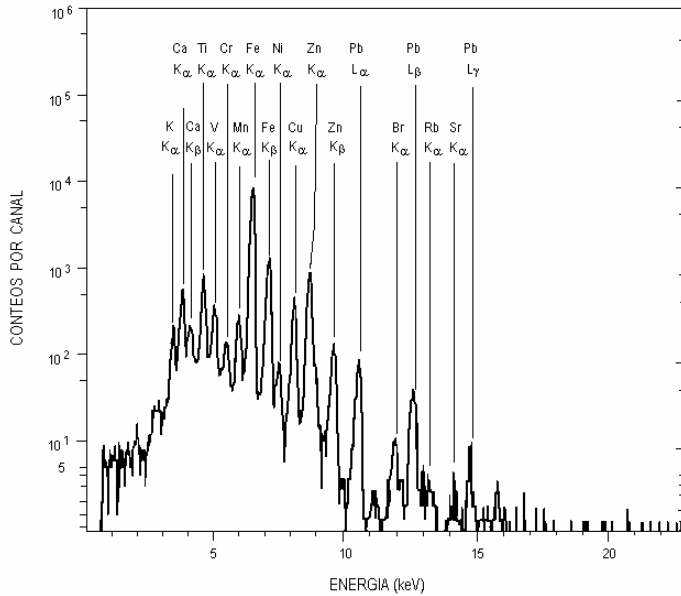


Fig.1.5: Espectro típico de PIXE de una muestra de agua de lluvia.

En la figura 1.5 se observan los rayos X característicos presentes en el espectro, sobre un fondo continuo, que es el que determina principalmente el límite de detección para cualquier elemento. Es por esto que resulta fundamental, para el análisis con PIXE, entender el origen de este fondo.

### 1.2.2 Origen del fondo en los espectros de rayos X.

Este fondo continuo se origina por los siguientes procesos:

1. *Bremsstrahlung* de los protones incidentes: Como ya se había mencionado, este proceso contribuye de manera insignificante al fondo y se observa como una pequeña cola en la región de alta energía del espectro.
2. *Bremsstrahlung* de los electrones: Este es el principal contribuyente al fondo y se debe a la desaceleración de los electrones. En la Fig.1.6 se muestran las principales componentes de la radiación de frenado de los electrones.

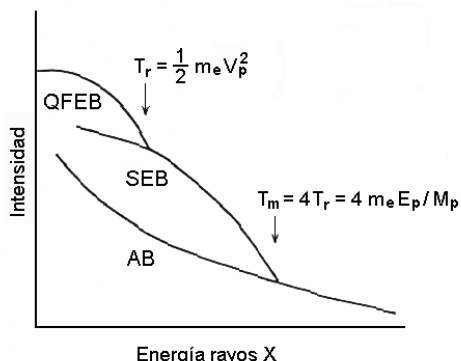


Fig.1.6: Componentes principales de la radiación de frenado para los electrones.

**QFEB** (Quasi-free electron bremsstrahlung): es el bremsstrahlung de los electrones casi libres. Ocurre cuando la velocidad de la partícula incidente es mucho mayor que la velocidad del electrón en el orbital, por lo que puede decirse que está prácticamente libre y en reposo. Entonces el electrón es dispersado por el campo coulombiano de la partícula incidente, emitiendo QFEB. Para protones de 3 MeV, se tiene  $T_r=1.6$  keV.

**SEB** (Secondary electron bremsstrahlung): es el bremsstrahlung de los electrones secundarios. Ocurre cuando los electrones que fueron arrancados de los átomos, son dispersados por el campo coulombiano de los núcleos atómicos de la muestra, como ya se explicó previamente.

**AB** (Atomic bremsstrahlung): es conocido como bremsstrahlung atómico y ocurre cuando un electrón que es arrancado del átomo regresa a su nivel inicial en el átomo ionizado. Si el estado final es un estado del continuo, entonces el proceso comprende tanto la ionización como la emisión de un fotón y se conoce como ionización radiativa. Éste es el principal contribuyente al fondo a energías superiores a  $T_m$ .

3. Rayos  $\gamma$  provenientes de las reacciones nucleares: La presencia de elementos ligeros en la muestra, causa un fondo inevitable de rayos  $\gamma$  con energías de cientos de keV. La interacción de éstos en el detector ocurre por efecto Compton, resultando en un fondo esencialmente plano en la región 1-30 keV, que es la región donde se colectan usualmente los espectros de PIXE.

### 1.2.3 Sección eficaz de ionización.

Al irradiar la muestra con un haz de protones, se logran extraer los electrones enlazados de los átomos de las capas K y L, lo que permite la posterior emisión de rayos X. El conocimiento de las secciones eficaces de estos procesos de ionización se hace crucial en PIXE.

La sección eficaz de ionización de la subcapa *i*-ésima de un elemento de número atómico *Z* de la muestra se incrementa con la energía de la partícula incidente, alcanzando un valor máximo cuando la velocidad del proyectil se iguala a la del electrón de la subcapa *i*-ésima que es extraído. La energía del proyectil es entonces  $E = (M/m)U_i(Z)$ , donde *M* y *m* son las masas del proyectil y el electrón, respectivamente y *U<sub>i</sub>* es la energía de enlace del electrón. La energía del proyectil para el caso de los protones, debe ser tres ordenes de magnitud superior a la energía de enlace del electrón, del orden del MeV. Posteriores incrementos en la energía del proyectil provocan un decremento de la sección eficaz de ionización.

En la figura 1.7 se ilustra el comportamiento y los valores de la sección eficaz de ionización de la capa K y L para protones, su dependencia con la energía del proyectil *E*, en el rango típico de *E* en PIXE y con el número atómico del material *Z*. Se observa como la sección eficaz de ionización decrece con el aumento de *Z*, hecho que ocurre muy bruscamente para el caso de la capa K, como ya se había mencionado anteriormente.

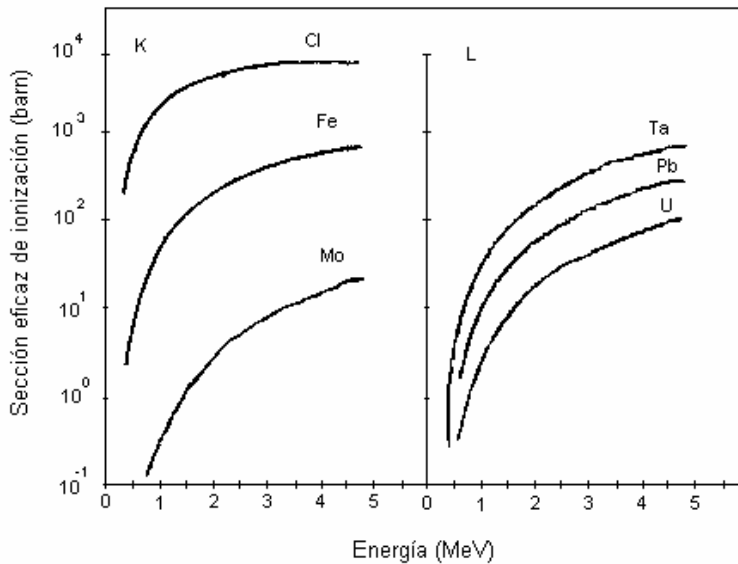


Fig.1.7. Secciones eficaces de ionización de las capas K y L en función de la energía del protón *E* y el número atómico del material *Z*.

#### 1.2.4 Instrumentación para PIXE.

##### Acelerador.

Para realizar los análisis, se empleó el acelerador Tándem de 3 MV (NEC 9SDH-2 Pelletron) del instituto de Física de la UNAM. En la Fig.1.8 se presenta esquemáticamente el acelerador y las líneas de PIXE.

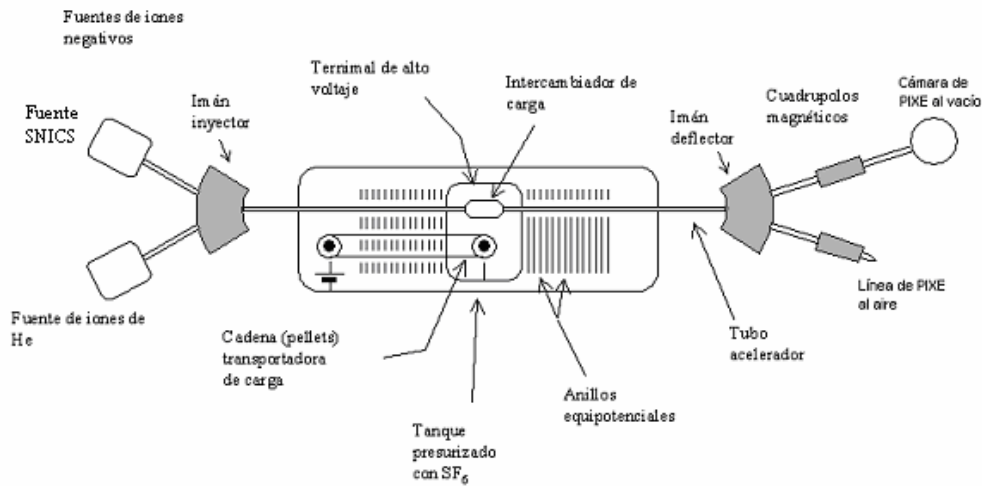


Fig 1.8: Representación esquemática del Peletrón y las líneas de PIXE.

Para nuestros análisis utilizamos la fuente de iones “SNICS” (Sputter Negative Ion Cesium Source), donde se pueden obtener iones negativos de una gran cantidad de elementos químicos de la siguiente manera: Se prepara un sólido que contenga al elemento del que se quiere formar un ion negativo. Un “cátodo” formado por un cilindro de cobre libre de oxígeno de aproximadamente 6 mm de diámetro exterior, parcialmente ahuecado, se rellena con esta sustancia y se inserta en la fuente SNICS. Ahí se le aplica una diferencia de potencial negativa de aproximadamente 5 kV y se pone en presencia de vapores de Cesio. Los átomos de Cesio se ionizan fácilmente y se impulsan a golpear la superficie de nuestra sustancia, arrancando de esta manera los átomos y moléculas más superficiales. En presencia de los propios vapores de Cesio, todos los átomos o moléculas con electronegatividad positiva, irán arrancando electrones a los átomos de Cesio, produciendo de esta manera más iones positivos de Cesio y formando al mismo tiempo los iones negativos de los átomos y moléculas que ahí se encuentran.

Estos iones negativos recién formados se dirigen hacia el acelerador a través de una nueva diferencia de potencial de extracción, de aproximadamente 50 kV. Así TODOS los iones negativos formados son extraídos de la fuente. Por esta razón se utiliza un imán que obliga a estos iones a seguir una trayectoria circular cuyo radio depende de su masa. De esta forma, como todos los círculos se tocan en el punto de entrada al imán, luego de haber recorrido un arco de circunferencia de algunos grados, las trayectorias se van separando. El sistema escoge un radio de curvatura fijo, lo que permite en principio escoger una masa dada, que será la que se inyecte finalmente al acelerador.

Todos aquellos iones negativos se inyectan finalmente al acelerador Peletrón, que es un acelerador electrostático de dos etapas, también llamado tándem y que tiene una terminal de alta tensión positiva en el centro de un tanque. Desde el punto de inyección hasta la terminal de alta tensión hay un “tubo acelerador” que tiene los elementos geométricos suficientes para permitir a todos los iones negativos ser conducidos al interior de este tubo

al vacío hacia la terminal, acelerándose gradualmente hasta adquirir finalmente la energía correspondiente al potencial de la terminal.

Al entrar al interior de la terminal, que es metálica, por la ley de Gauss, el campo eléctrico es cero. Durante unos 60 cm mantendrán su velocidad constante, excepto que en el camino se encontrarán con una cortina de nitrógeno y al interactuar con esos átomos y moléculas, los iones trasladándose a altas velocidades perderán electrones (“Stripping”), convirtiéndose ahora en iones con una carga positiva igual al número de electrones perdidos. Ahora tendremos iones positivos con carga 1+, 2+, 3+, etcétera. Para un isótopo dado, la distribución de estados de carga no es arbitraria. Es un proceso que ha sido estudiado y se conoce que si lanzamos un gran número de isótopos idénticos a través de un material dado, obtendremos una distribución de estados de carga que depende de la velocidad del ion, de su propia identidad y del material que atraviesa. A esa distribución se le conoce como la distribución de estados de carga en equilibrio.

En el momento en que los iones, ahora positivos, salen del interior de la terminal de alta tensión, por un nuevo tubo acelerador que los conduce siguiendo una línea recta hacia el exterior de la máquina, en lugar de ser atraídos por el potencial positivo, serán repelidos y nuevamente acelerados alejándose de la terminal. La segunda etapa también es llamada de alta energía.

A la salida del acelerador tenemos una mezcla de iones de distintos elementos, estados de carga y velocidades. Por lo que se hace necesario un segundo campo magnético, el imán deflector, para producir nuevas trayectorias circulares con radios dependientes del estado de carga, velocidad y masa, de acuerdo a la fuerza de Lorentz. Para, en esta segunda oportunidad, hacer una selección más estricta de la masa y energía de los iones que deseamos conservar e inyectar en la línea de investigación correspondiente. Luego el haz es enfocado por los cuadrupolos magnéticos, antes de incidir sobre la muestra.

Todo este sistema se encuentra al vacío para reducir la dispersión de los haces de iones. El mismo se logra con bombas mecánicas de pre-vacío y turbomoleculares de alto vacío colocadas en diferentes puntos del sistema. El vacío es del orden de  $10^{-8}$  Torr.

### **Detectores de rayos X y electrónica asociada [5,8]**

Para los análisis de PIXE, se necesita ante todo una buena resolución de energía. Por esto, los detectores de centelleo o los contadores proporcionales no se usan comúnmente. La opción más conveniente para PIXE son los detectores semiconductores de Si(Li) o Ge.

#### **Detectores Semiconductores.**

Cuando un material tipo p se pone en contacto con un material tipo n, los electrones libres del tipo n se recombinan con los huecos del tipo p formando una juntura o zona libre de cargas. Cuando la radiación incide en esta zona, provoca un par electrón-hueco, en un proceso similar al de las cámaras de ionización. Los electrones fluyen en una dirección y los huecos en otra y se colectan en electrodos. El número total de cargas colectadas es proporcional a la energía de la radiación incidente.

En el caso de espectroscopía de rayos X o  $\gamma$  es necesario tener un área efectiva mayor que la juntura que normalmente se logra. Como es complicado producir materiales con un nivel muy bajo de impurezas, para favorecer las características del material puro, se hace un proceso de compensación con litio. El litio se difunde en el material original tipo p hasta lograr un balance entre el material tipo p y el tipo n. Cuando el proceso de difusión se completa, a lo largo de casi todo el volumen se forma un material con propiedades similares a las intrínsecas del material puro.

La principal desventaja de este tipo de detectores reside en que la distribución de litio a temperatura ambiente resulta sumamente inestable, por lo que estos detectores se deben almacenar y operar a bajas temperaturas (normalmente a la temperatura de nitrógeno líquido, 77 K). Este enfriamiento contribuye además a la disminución de los pares electrón-hueco en el cristal.

Aunque este proceso de compensación con Li, es ampliamente usado en la fabricación de detectores de Si(Li), ya no es necesario para los detectores de Ge, debido a que se obtienen cristales de germanio suficientemente puros desde 1976.

Las ventajas de los detectores semiconductores son:

- Alta densidad del medio ionizado; esto implica una considerable eficiencia de detección por unidad de volumen efectivo del detector.
- La energía necesaria para producir un par de portadores de carga en los semiconductores es aproximadamente 10 veces menor que en los gases, y 100 veces menor que en un centellador. Por lo tanto, para una misma energía impartida, la cantidad de portadores de carga producidos es mucho mayor en los semiconductores, lo cual se traduce en menores fluctuaciones estadísticas y por lo tanto una mejor resolución.
- La movilidad de los electrones y huecos es elevada y el volumen efectivo del medio detector es reducido; ello se traduce en un tiempo de recolección de cargas muy breve (del orden de nanosegundos), por lo que la resolución en tiempo es elevada.

### **Resolución de un detector.**

Una propiedad importante de un detector para su uso en espectrometría es la capacidad para poder discriminar fotones de energías muy próximas entre sí. Supóngase dos detectores distintos, simultáneamente expuestos a radiación monoenergética. En la Fig. 1.9 se presentan las respectivas distribuciones de amplitudes de impulsos (función respuesta de cada detector).

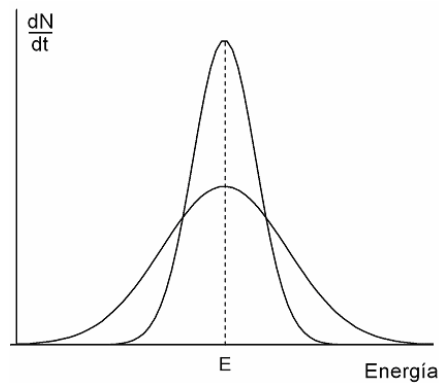


Fig.1.9: Función respuesta de dos detectores.

Aunque ambas distribuciones están centradas en el mismo valor  $E$ , el ancho de ambas difiere notablemente. Estos anchos reflejan la magnitud de las fluctuaciones estadísticas de las señales producidas en cada interacción, suponiendo que por cada interacción se aportó la misma energía al detector.

La capacidad de un detector para discriminar las energías de los fotones incidentes es tanto mayor cuanto menor sea el ancho de su función respuesta. Ello se cuantifica con un parámetro denominado “resolución” del detector. La resolución es un parámetro adimensional.

En el caso de PIXE los espectros de rayos X están compuestos por varios picos. Cuando se trata de picos bien distanciados, resulta fácil asociar a su posición una energía usando una relación funcional (lineal o cuadrática) establecida experimentalmente con base en una medición de un espectro de fuentes conocidas. Cuando los picos están parcialmente superpuestos esta tarea resulta más difícil dado que deben separarse los picos compuestos en individuales. Actualmente existen códigos computacionales que facilitan mucho esta tarea.

### **Sistema de adquisición de espectros.**

La carga liberada en el detector como consecuencia de la radiación incidente, pasa a la electrónica asociada al mismo, que la transforma en una señal de pulso o voltaje, cuya altura es proporcional a la energía de la radiación incidente. Los principales componentes de la misma son:

*Preamplificador:* Es el encargado de generar una señal de tensión proporcional a la carga que recibe del detector. Como la carga liberada en el detector no provoca una señal de tensión grande, es necesaria su amplificación para ser tratada. En este dispositivo, como su nombre lo indica, se realiza una preamplificación de la señal antes de ser tratada y analizada.



*Amplificador lineal:* Este componente realiza un tratamiento de las señales previo a su análisis. El amplificador al recibir señales del preamplificador las vuelve a emitir de forma tal que están amplificadas, separadas, con mejor definición y presentan una mejor relación señal-ruido.

*Apilamiento de la señal.*

Como los detectores requieren de un tiempo para procesar una señal, existe una probabilidad de que dos pulsos lleguen sin que haya transcurrido el tiempo de resolución del sistema. Esto implica una distorsión en el espectro final. Este fenómeno se denomina apilamiento de la señal. Una reducción sustancial de este fenómeno se logra usando un circuito adicional en el amplificador llamado PUR (del inglés Pile-Up rejector), que elimina señales susceptibles de estar afectadas por el apilamiento de pico.

Sin embargo, aún existe la posibilidad de que dos señales alcancen simultáneamente el detector. Para reducir esta probabilidad debe disminuirse la tasa de conteo reduciendo la intensidad del haz o reduciendo los picos más intensos en el espectro de PIXE. Esto se puede alcanzar tanto por reducción de la razón de conteo del detector (disminución de la corriente o aumento de la distancia muestra-detector), o mediante el uso de absorbedores apropiados de rayos X que van a disminuir la intensidad en partes selectivas del espectro.

*Analizador multicanal:* Su misión es hacer corresponder un cierto intervalo de alturas de señal, o sea un cierto intervalo de energías de los fotones de rayos X, con un valor de una nueva variable natural. Esta variable se denomina canal y la representación gráfica del número de señales-canal, es lo que se denomina espectro.

El número de canales elegido es un compromiso entre la estadística del canal y la resolución en energía, o sea, resolución de los picos asociados a estas energías. Se obtiene una mejor estadística con un menor número de canales y se diferencian mejor dos picos con un mayor número de canales. El criterio recomendado es que un pico se extienda al menos 5 canales. [5]

### **Eficiencia de un sistema de detección de rayos X.**

La eficiencia absoluta de un sistema de detección de rayos X viene dada por la siguiente ecuación:

$$\varepsilon = \frac{\Omega}{4\pi} \cdot Filt \cdot \varepsilon' \quad (1.2.4.1)$$

donde:

$\Omega/4\pi$ : es la fracción de ángulo sólido definida por el colimador situado justo antes del detector y referida al centro de la muestra.

*Filt*: es el factor que introduce la atenuación que se produce en la lámina del material introducida antes del detector, denominado filtro.

$\epsilon^I$ : es la eficiencia intrínseca, que considera la atenuación en todos los materiales fijos que el haz de rayos X encuentra antes de alcanzar el volumen activo de detector y la absorción en el volumen activo del detector.

**Cámaras al vacío y arreglo al aire.**

Las cámaras de muestras dependen mucho de las características y el tipo de experimento que se vaya a realizar. Hay numerosas condiciones para la cámara de muestras en PIXE, aunque no todas pueden ser logradas, debido al espacio experimental disponible, el equipo asociado como válvulas, detectores, etc. y las restricciones que impone la muestra específica a analizar. Pese a todo esto hay algunas reglas que debemos asegurarnos que se cumplan:

- El haz de iones debe ser uniforme y estar bien colimado.
- El detector de rayos X debe estar colocado de forma tal que pueda medir los rayos X característicos que se emiten en la superficie de la muestra.
- La cámara debe ser fácilmente evacuada y mantener el vacío necesario.
- Los parámetros geométricos del experimento deben ser reproducibles.

En las figuras 1.10 y 1.11 se muestran los arreglos experimentales de las líneas de PIXE al aire y al vacío, en el acelerador Peletrón del Instituto de Física de la UNAM.

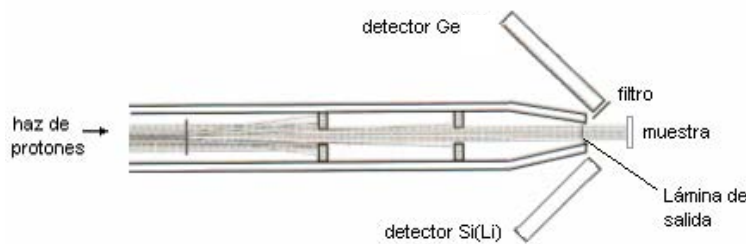


Fig.1.10 Arreglo experimental de la línea de PIXE al aire. [6]

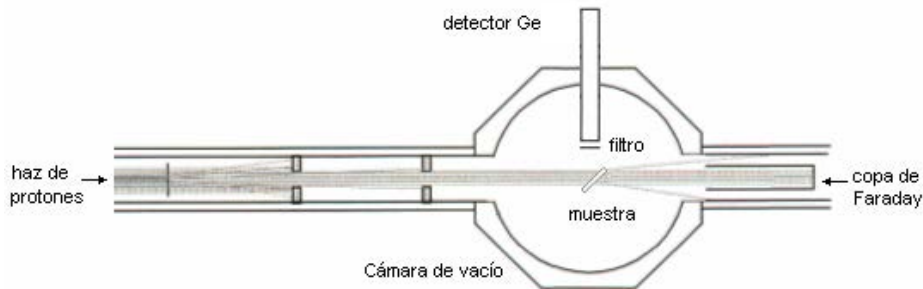


Fig.1.11: Arreglo experimental de la línea de PIXE al vacío. [7]

### **Arreglo geométrico.**

Las pérdidas de energía del haz de iones, la atenuación de los rayos X y la emisión de radiación de frenado, por electrones secundarios, son procesos físicos que van a estar fuertemente afectados por el arreglo geométrico de los componentes principales en la cámara de PIXE.

El *bremsstrahlung* de los electrones secundarios y el atómico son anisotrópicos, presentando un máximo para un ángulo de 90° con respecto de la dirección del haz. Por ello es recomendable para reducir el fondo, mejorando la relación señal-fondo, alejar lo más posible de 90° el sistema de detección. El ángulo más comúnmente usado es el de 135°.

#### **1.2.5 Influencia de la matriz.**

Para considerar los efectos de matriz en PIXE, varios fenómenos deben tenerse en cuenta. Debido a que la irradiación de la muestra se realiza con partículas cargadas, éstas van perdiendo su energía en la medida que van penetrando en la muestra y pueden frenarse totalmente si la muestra es suficientemente gruesa; sin embargo, la densidad de corriente del haz permanece casi constante.

En tanto, la sección eficaz de producción de rayos X, para la mayoría de los elementos, va disminuyendo con la disminución de la energía del haz de protones y esto hace que sólo unos pocos rayos X característicos se produzcan en las capas más internas de la muestra. Además hay que considerar el efecto de matriz en el soporte. Este último efecto se corrige contando con que la concentración de impurezas en el soporte, está por debajo de la cantidad detectable con PIXE.

Además se debe tener en cuenta la atenuación de los rayos X característicos dentro de la muestra. Este efecto ocurre cuando el haz de fotones atraviesa la muestra en dirección al detector. Los fotones no pierden progresivamente su energía como lo hacen las partículas cargadas, sino que en cada proceso de interacción con el medio (por efecto fotoeléctrico, Compton o producción de pares) se elimina un fotón del haz.

Podemos definir un coeficiente lineal de atenuación  $\mu$ , de tal manera que, cuando  $I_0$  fotones inciden perpendicularmente en un absorbente delgado de espesor  $x$ , su intensidad  $I_\gamma$  después de atravesar dicho espesor viene dado por  $I_\gamma = I_0 e^{-\mu x}$ . El coeficiente lineal de atenuación  $\mu$  depende del medio con el que interacciona el fotón y de su energía.

#### **1.2.6 Exactitud, precisión y límites de detección.**

Cuando se realizan los análisis de PIXE prestando una cuidadosa atención a todos los parámetros que influyen en ellos, pueden obtenerse resultados exactos y precisos. Como se reporta en la literatura [2,4], una exactitud menor que el 5% y una precisión menor que el 1% son posibles. El factor más influyente en la exactitud del método es la corrección apropiada de los efectos de matriz. De las técnicas descritas, la única que es virtualmente libre de estos efectos es AAN. Comparada con AA, PIXE tiene la ventaja de que los

procesos físicos de los efectos de matriz son bien conocidos, por lo que su magnitud puede estimarse *a priori* para una muestra dada.

La sensibilidad del método depende de una gran cantidad de parámetros experimentales. La existencia de radiación de fondo obliga a tener conteos estadísticamente definidos del fondo. El criterio recomendado para que una fluctuación en el espectro sea considerada un pico, es que el número de cuentas en el pico  $N_P$  sea al menos tres veces superior a la dispersión del número de cuentas del fondo  $N_F$ , en el mismo intervalo de energías considerado [5]. Experimentalmente, el factor que más influye es la carga, el aumento de ésta (ya sea aumentando el tiempo de colección del espectro o la intensidad del haz) mejora significativamente el límite de detección, aunque implica mayor tiempo de irradiación de la muestra y un posible mayor daño de la misma.

### 1.3 AAN (Análisis por activación neutrónica)[4,9]

#### 1.3.1 Principios.

El análisis por activación neutrónica, usa la producción de radionúclidos a partir de los elementos presentes en la muestra para su identificación y cuantificación. Las muestras se irradian con un flujo de neutrones, usualmente térmicos, en un reactor nuclear. Como resultado de las reacciones nucleares, usualmente  $(n,\gamma)$ , entre los neutrones y los isótopos estables de los elementos presentes en la muestra, pueden producirse radionúclidos.

Un tiempo después de irradiada la muestra, la radiación emitida por el decaimiento de los radionúclidos se mide con un detector adecuado. Casi todos los métodos de AAN se basan en la detección de los rayos  $\gamma$  emitidos, usando un detector de rayos  $\gamma$  de alta resolución. Los elementos presentes en la muestra son identificados a través de la energía y la intensidad relativa de las líneas de emisión  $\gamma$  (fotopicos) en el espectro y las áreas se relacionan con la cantidad de los mismos en la muestra. De forma simplificada la relación entre el área del pico  $P$  y la cantidad  $m$  de un elemento presente en la muestra viene dada por la siguiente relación:

$$P = \varepsilon h t_m \frac{m \theta}{M} N_A \sigma \Phi \left[ 1 - e^{-\lambda t_i} \right] e^{-\lambda t_d} \quad (1.3.1)$$

donde:

$\varepsilon$ : es la eficiencia de detección del fotopico incluyendo ángulo sólido.

$h$ : es la intensidad de los rayos  $\gamma$ .

$t_m$ : es el tiempo de conteo.

$t_i$ : es el tiempo de irradiación.

$\theta$ : es la abundancia del isótopo estable a partir del cual se produce el radionúclido.

$M$ : es el peso atómico del elemento.

$N_A$ : es el número de Avogadro.

$\sigma$ : es la sección eficaz de la reacción nuclear.

$\Phi$ : es el flujo de neutrones.

$\lambda$ : es la constante de decaimiento del radionúclido.

$t_d$ : tiempo de decaimiento. Es el tiempo transcurrido desde que se irradia la muestra hasta que se comienza a contar.

El factor  $[1 - e^{-\lambda t}]$  es conocido como factor de saturación.

### 1.3.2 Instrumentación.

Para un análisis multielemental y de alta sensibilidad usando AAN, el acceso a un reactor nuclear de investigación es imprescindible. El reactor debe estar equipado con un sistema de cápsulas que permitan un fácil y rápido acceso a los sitios de irradiación en el núcleo del reactor o cerca de él. La energía de los neutrones en los sitios de irradiación debe ser térmica y el flujo debe ser del orden de  $10^{12}$  neutrones/cm<sup>2</sup>s o mayor.

Contar con sistemas eficientes de detección de rayos  $\gamma$  fue lo que permitió que el AAN se estableciera como una técnica sensible y multielemental y en particular, el advenimiento de los detectores de germanio hiperpuro (HPGe) y Ge(Li), ya que la espectrometría  $\gamma$  es una parte fundamental de AAN y consiste en medir la radiación proveniente de las muestras activas. La interacción de la radiación  $\gamma$  con el detector ocurre por tres efectos fundamentales que son: efecto fotoeléctrico, efecto Compton y formación de pares, los cuales se describieron en la sección 1.1.2.

Para irradiar las muestras se usó un reactor TRIGA MARK que cuenta con varios sistemas de irradiación de muestras. Se usó el sistema fijo de irradiación de cápsulas (SIFCA), con un flujo neutrónico de  $9 \times 10^{12}$  neutrones/cm<sup>2</sup>s. El tiempo de irradiación de las muestras depende de la sección eficaz del elemento, su abundancia isotópica, la sensibilidad deseada y de la vida media de los isótopos que se desean cuantificar. Para nuestro caso, los elementos de interés tienen vida media larga, por lo que requieren mayores tiempos de irradiación y conteo. Para coleccionar el espectro se usó un detector de germanio hiperpuro. Asociado a éste se encuentran el preamplificador, el amplificador, un dispositivo para rechazar el apilamiento de la señal, un convertidor analógico-digital y un analizador multicanal asociados a una computadora para coleccionar el espectro.

### 1.3.3 Métodos analíticos.

**Método absoluto:** la cantidad de un elemento dado puede ser determinada en principio usando la ecuación 1.3.1. Este cálculo absoluto no es muy utilizado debido fundamentalmente a la inexactitud en la determinación de las constantes nucleares y a la dificultad del cálculo de algunos parámetros experimentales, como el flujo neutrónico. El flujo puede variar dentro de ciertos márgenes según la potencia de operación del reactor, disposición de los elementos del combustible, grado de quemado de los mismos y proximidad de otras muestras.

**Método relativo:** consiste en irradiar simultáneamente con la muestra desconocida un peso conocido del o los elementos a determinar y medir las actividades relativas de la muestra y el patrón, con el mismo detector y las mismas condiciones geométricas. Como todos los

parámetros nucleares y de irradiación son iguales para la muestra y el patrón, la cantidad del o los elementos desconocidos puede ser determinada por la siguiente relación:

$$\frac{A_m}{A_c} = \frac{m_m}{m_c} \quad (1.3.3.1)$$

$$m_m = m_c \frac{A_m}{A_c} \quad (1.3.3.2)$$

donde:

$m_m$  y  $m_c$  son las masas del elemento desconocido y el patrón.

$A_m$  y  $A_c$  son las actividades medidas del elemento a determinar y el comparador respectivamente. Éste fue el método usado en nuestros análisis.

**Método del patrón interno:** Se usa en algunas ocasiones para corregir errores de autoabsorción del flujo neutrónico en el interior de las muestras, cuando éstas contienen grandes cantidades de uno o varios elementos con altas secciones eficaces de activación o absorción de neutrones, provocando una atenuación del flujo neutrónico y como consecuencia una activación diferente entre la muestra y el patrón.

#### 1.3.4 Influencia de la matriz.

Pese a la alta resolución de los detectores de (HPGe) y Ge(Li), la detección de las líneas de rayos  $\gamma$  presentes en el espectro, está fuertemente determinada por la presencia de otros radionúclidos en la muestra. Esto se debe esencialmente a que la mayoría de las interacciones de los rayos  $\gamma$  en el detector están en la región continua del efecto Compton. Este fondo se extiende desde 0 keV hasta una energía muy próxima al fotopico. En consecuencia, la suma de los fondos Compton de emisiones intensas y de alta energía, puede enmascarar la presencia de líneas poco intensas de baja energía.

Sin embargo, debido a que AAN es un método de análisis retardado, con la activación en una etapa y la detección en otra, se pueden encontrar tiempos óptimos de decaimiento e irradiación para la detección de algún elemento en particular. En la práctica, esta optimización no puede realizarse para cada elemento individual, por lo que hay que hacer ciertos compromisos en los esquemas de irradiación-detección que se propongan.

#### 1.3.5 Exactitud, precisión y límites de detección.

Tomando ciertas precauciones, los análisis de AAN pueden ser muy exactos. Debido a que los neutrones y los rayos  $\gamma$  no son fuertemente absorbidos por la matriz, las correcciones por efectos de absorción son pequeñas y en ocasiones despreciables. Las interferencias de ciertas reacciones nucleares, por ejemplo en la determinación de Mg a través de la reacción  $^{26}\text{Mg}(n, \gamma)^{27}\text{Mg}$  que interfiere con  $^{27}\text{Al}(n, p)^{27}\text{Mg}$ , pueden corregirse y casi nunca son importantes. Las variaciones en el flujo neutrónico pueden ser importantes, pero son corregidas fácilmente mediante el uso de monitores de flujo. Las interferencias en el espectro como la superposición de dos líneas  $\gamma$  de diferentes radionúclidos, pueden ocurrir pero son tomadas en cuenta en el análisis.

La mayoría de las fuentes de error en AAN pueden controlarse, por lo que el factor fundamental que influye en la precisión del análisis es la estadística de conteos. En los mejores casos, pueden alcanzarse precisiones del orden de 1-2%.

Los límites de detección en AAN están determinados por numerosos factores. Como se puede ver en la ecuación (1.3.1), influyen en el análisis las constantes naturales y los parámetros experimentales. Para análisis sensibles se requiere un flujo alto de neutrones y para la detección, usar elementos de vida media larga con grandes períodos de irradiación es lo deseable. La sensibilidad va a depender también del fondo de  $\gamma$  presente en el espectro y éste a su vez depende de la composición de la muestra. Por estas razones, no pueden reportarse límites generales de detección.

#### **1.4 Absorción atómica [4].**

##### ***1.4.1 Principios.***

En absorción atómica se utiliza el hecho de que los átomos en estado gaseoso son capaces de absorber radiación óptica con frecuencias bien definidas. Suministrando energía térmica a la muestra en un atomizador, el elemento a determinar se convierte en una población de átomos libres (vapor atómico), casi todos en estado base. Estos átomos pueden absorber cuantos de energía y pasar a un estado excitado, para luego volver a su estado base emitiendo exactamente la misma cantidad de energía. Estas transiciones desde y hacia el estado base, se llaman transiciones resonantes. Haciendo pasar a través del vapor atómico radiación óptica de la frecuencia correspondiente a las transiciones resonantes y midiendo la intensidad transmitida de la misma, se puede cuantificar la cantidad del elemento presente en la muestra. De acuerdo a la ley de Lambert-Beer, existe una relación lineal entre la absorbancia  $A$  y el número de átomos del analito en el vapor atómico.

De todo esto resulta evidente, que la instrumentación para AA consiste esencialmente de una fuente de radiación, un atomizador, un monocromador y un detector de radiación. Éste último es generalmente un fotomultiplicador.

##### ***1.4.2 Influencia de la matriz.***

Las interferencias por efectos de matriz en AA son consecuencia de que el analito está acompañado por contaminantes en la muestra. Si no se consideran adecuadamente estas interferencias, la determinación incurre inevitablemente en errores. Es útil dividir estas interferencias en dos categorías: interferencias espectrales y no espectrales.

Interferencias espectrales: Proviene de la superposición directa de la línea del analito con líneas de resonancia de otros elementos presentes, o más importante, por la absorción de la radiación proveniente de la fuente por las bandas moleculares superpuestas de los contaminantes o de la dispersión de la radiación por partículas no volatilizadas. La interferencia espectral causada por el primer efecto es fácilmente evitada usando líneas de resonancia alternativas del analito. Para la corrección de los dos últimos efectos, se usan técnicas instrumentales.

Interferencias no espectrales: Afectan la señal del analito directamente. Son convenientemente clasificadas de acuerdo al lugar, etapa o proceso donde se originan y por lo tanto se discrimina transporte, volatilización del soluto, fase vapor e interferencias de distribución espacial. Las interferencias no espectrales pueden ser reducidas haciendo a las muestras y las soluciones estándares lo más similares posibles.

#### **1.4.3 Exactitud, precisión y límites de detección.**

Bajo condiciones apropiadas, la precisión de AA es de 1-2%. Sin embargo la exactitud está fuertemente determinada por la habilidad de lidiar adecuadamente con los efectos de matriz. La sensibilidad está influenciada por numerosos factores; el más importante es la fluctuación del fondo. Los límites de detección se determinan frecuentemente por la variabilidad de los valores de los blancos.

Referencias.

- [1] Gamboa de Buen I. *Notas de clases, curso de Física de Radiaciones*. UNAM 2001.
- [2] Johansson, S.A.E. y J.L. Campbell. *PIXE: A novel technique for elemental analysis*. John Wiley & Sons LTD, (1988), Capítulos 1 y 2.
- [3] Llabador, Y y P Moretto. *Applications of Nuclear Microprobes in the Life Sciences*. World Scientific, (1998), 274 p.
- [4] Maenhaut, W. *Analytical techniques for atmospheric trace elements*. J. M. Pacyna and B. Ottar (eds). *Control and Fate of Atmospheric Trace Elements*, 259-301.
- [5] Martín Domínguez, J. E. *Análisis de sedimentos de la Ría de Huelva mediante TPIXE*. Trabajo de Investigación de la Universidad de Sevilla, Programa de tercer ciclo "Física". 1992-1994.
- [6] J.L. Ruvalcaba, M. Monroy, J.G. Morales, K. López. *The new external beam set-up of the Pelletron Accelerator at UNAM, Mexico*. In Abstracts for the Ninth International Conference on PIXE and its Analytical Applications. University of Guelph, Guelph, Canada, 2001, p. 62.
- [7] J. Miranda, L. Rodríguez-Fernández, O.G. de Lucio, K. López y J.A. Harada. *A new beam line for characteristic X-ray experiments at the Pelletron accelerator, Instituto de Física, UNAM*. *Rev. Mex. Fís.* 46 (2000) 367.
- [8] Knoll, G. F. *Radiation detection and measurements*. John Wiley & Sons Inc., New York, (1989), Capítulos 8, 9, 10 y 18.
- [9] Navarrete M., Gaudry A., Revel G., Martínez T., Cabrera L. *Urinary Selenium excretion in patients with Cervical Uterine Cancer*. *Biological Trace Element Research* 79, (2001), 97-105.



## Capítulo 2: Metodología

La preparación de muestras para análisis y determinación de trazas, juega un papel muy importante para PIXE. Tradicionalmente la preparación de muestras para determinar especies inorgánicas en alimentos incluye la digestión ácida, la combustión y la fusión alcalina, las cuales requieren de una gran cantidad de reactivos químicos para eliminar la fuerte interferencia y/o efecto quelante de la matriz orgánica. Estos tipos de preparación de muestras usualmente las contaminan con elementos provenientes de los reactivos, además de consumir mucho tiempo y generar gran cantidad de desechos. El caso de la combustión tiene la desventaja adicional de la volatilización de algunos elementos de interés debido a las altas temperaturas. [1,2]

Como alternativas a estos métodos tradicionales se encuentran la Fotólisis con luz ultravioleta (Fotólisis UV) con lámparas de mercurio y la digestión con microondas. En esta última, el contenedor de la muestra es transparente a las microondas por lo que la muestra absorbe directamente la radiación (MHz a GHz). Ésta transmite su energía a las moléculas polares presentes en la muestra, agua, ácidos, etc, forzándolas a vibrar a altas frecuencias. Esto produce un calentamiento de la muestra sin que se caliente el contenedor, lo que implica una insignificante contaminación y muy baja absorción de los elementos por el contenedor. Pero la descomposición de materia orgánica requiere de precauciones estrictas lo que conlleva a tediosos procedimientos y no se evita la contaminación de la muestra por los reactivos químicos. [2]

La preparación de muestras de alimentos con Fotólisis UV con lámparas de mercurio, presenta claras ventajas con respecto a otros métodos debido fundamentalmente a la baja contaminación de la muestra, debido al poco uso de reactivos, además de ser un proceso que consume poco tiempo y genera pocos desechos.

Como el objetivo principal de este proyecto es la cuantificación de elementos traza en frutas y verduras, debemos emplear métodos rápidos de preconcentración de muestras. Como parte del proyecto, se propone un nuevo método con este fin. Además, se utilizarán algunos métodos convencionales para comparar los resultados obtenidos con esta nueva propuesta.

### 2.1 Preparación de muestras.

La nueva metodología que se propone para la degradación de la materia orgánica es la fotólisis con luz UV en presencia de  $H_2O_2$  usando un láser excímero, lo que nos permite realizar este proceso mucho más rápido que con las lámparas convencionales de mercurio. Este es un método eficiente, rápido y simple de digestión de muestras para una mejor detección de elementos traza con PIXE.

Para el mismo se emplea un haz pulsado de luz UV (248 nm) de gran intensidad, en presencia de  $H_2O_2$ . La materia orgánica es oxidada por los radicales libres producidos por la fotólisis del  $H_2O_2$  y del  $H_2O$  resultando en una descomposición rápida y simple de la materia orgánica. Se puede comprobar que la degradación de la matriz orgánica ocurre

indirectamente por los radicales OH y no por la radiación UV directamente. Aunque se producen estos radicales por la fotólisis del agua presente en la muestra, no son suficientes para degradar el alto contenido de materia orgánica que tienen los alimentos, por lo que la introducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> permite disminuir considerablemente el tiempo de reacción.

Los radicales hidroxilos oxidan sustancias orgánicas principalmente mediante sustracción de hidrógeno. Esta reacción genera radicales orgánicos, que mediante la adición de oxígeno, originan radicales intermedios que terminan, por sucesivos pasos oxidativos, en dióxido de carbono, agua y sales inorgánicas.

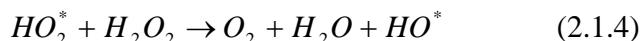
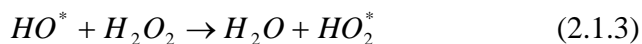
La digestión UV para cualquier tipo de muestras es directamente proporcional a la intensidad de la radiación y al tiempo de irradiación. Crece con el aumento de la temperatura de la muestra, lo cual requiere de una optimización debido a la posible pérdida de elementos de interés. Es inversamente proporcional a la concentración de materia orgánica. [2]

### **2.1.1 Modelo completo de reacción [2]:**

Formación de radicales:



Descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:



Reacciones finales:



El electrón de la ecuación 2.1.5 puede ser producido por efecto fotoeléctrico.

### **Consideraciones para el modelo cinético del proceso de oxidación con UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [3].**

- La desaparición del sustrato debida a la fotólisis directa con UV es muy baja en comparación con la obtenida durante el proceso de oxidación UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- La concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> permanece constante e igual al valor inicial, durante el experimento, suponiendo que la concentración de los intermediarios de la reacción no influye sobre la concentración de los radicales OH<sup>\*</sup>.

El paso inicial para el proceso de oxidación con UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es la fotólisis del peróxido de hidrógeno a 248 nm y la formación de radicales hidroxilo:



Los radicales HO\* atacan el sustrato (2.1.9) o el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2.1.10)



Los radicales HO<sub>2</sub>\* pueden generar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediante la siguiente reacción:



Entonces la degradación del sustrato puede escribirse como: ([]: concentración.)

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_p [HO^*][S] \quad (2.1.13)$$

con:

$$\frac{d[HO^*]}{dt} = 2\phi_{H_2O_2} \frac{W_{abs}}{V_{sol}} - k_h [HO^*][H_2O_2] - k_p [HO^*][S] \quad (2.1.14)$$

donde:

$\phi_{H_2O_2}$ : Rendimiento cuántico primario por la fotólisis directa del peróxido de hidrógeno.

$V_{sol}$ : Volumen de la solución acuosa que contiene la materia orgánica.

$W_{abs}$ : Poder de absorción de la solución y se puede expresar de la siguiente manera:

$$W_{abs} = I_0 [1 - \exp(-2.3l(\epsilon_S [S] + \epsilon_{H_2O_2} [H_2O_2]))] f_{H_2O_2} \quad (2.1.15)$$

donde:

$I_0$ : Intensidad de la radiación ultravioleta.

$l$ : Camino óptico.

$\epsilon_S$  y  $\epsilon_{H_2O_2}$ : Coeficientes de extinción molar del sustrato y del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente, a 248 nm.

$f_{H_2O_2}$ : Fracción de radiación UV absorbida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Suponiendo la hipótesis de estabilidad para los radicales, la concentración de OH· puede escribirse como:

$$[HO^*]_E = \frac{2\phi_{H_2O_2} I_0 [1 - \exp(-2.3l(\varepsilon_{H_2O_2} [H_2O_2] + \varepsilon_S [S]))]}{V_{sol}(k_h [H_2O_2] + k_p [S])} f_{H_2O_2} \quad (2.1.16)$$

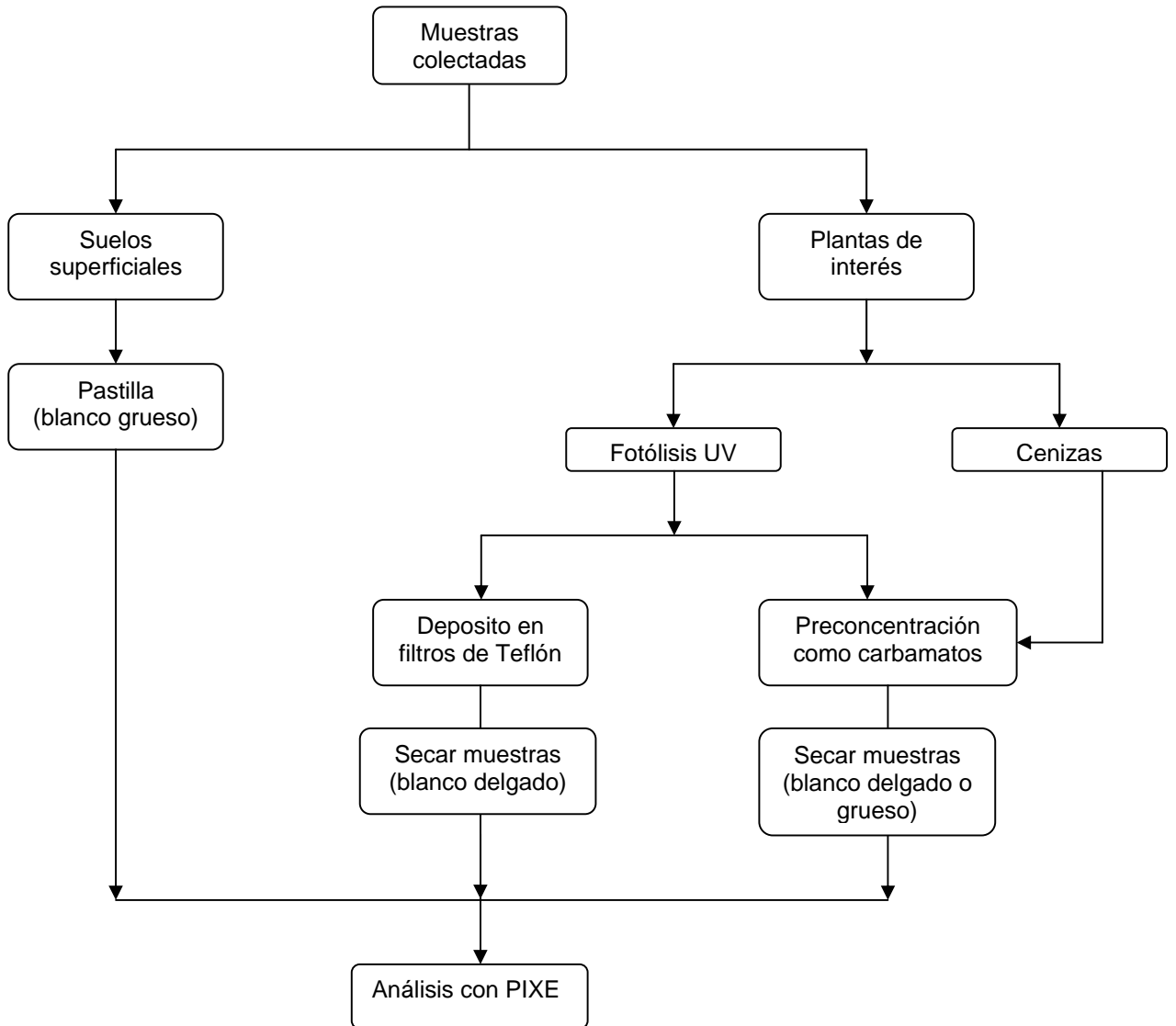
Sustituyendo en la ecuación (2.1.13) queda:

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_p \frac{2\phi_{H_2O_2} I_0 [1 - \exp(-2.3l(\varepsilon_{H_2O_2} [H_2O_2] + \varepsilon_S [S]))][S]}{V_{sol}(k_h [H_2O_2] + k_p [S])} f_{H_2O_2} \quad (2.1.17)$$

De la ecuación (2.1.17) se puede estimar experimentalmente el valor de  $k_p$ .

### 2.1.2 Esquema de preparación de muestras.

La preparación de muestras para los diferentes análisis se realizó según se muestra en el siguiente esquema:



## 2.2 Materiales y Métodos.

Todos los reactivos utilizados son de grado analítico o suprapure. El agua utilizada es desionizada con un sistema Millipore.

Reactivos:

- APDC (Ammonium pyrrolidinedithiocarbamate,  $C_5H_{12}N_2S_2$ ) (Merck)
- DDTC (diethyldithiocarbamate sodium,  $C_5H_{10}NNaS_2 \cdot 3H_2O$ ) (Merck)
- Acido ascórbico L (+) (Merck)
- Cupferron GR  $C_6H_9N_3O_2$  (Merck)
- Oxina (8-Hidroxiquinolina  $C_9H_7NO$ ) (Merck)
- Solución estándar de Paladio 1000 mg/kg CertiPUR (Merck)
- $HNO_3$  (ácido nítrico) 65 % Suprapur (Merck)
- $H_2O_2$  30 % Suprapur (Merck, Fulka o Aldrich)
- Agua desionizada.
- $NH_4OH$  25 % Suprapur (Merck)
- 2-Propanol GR (Merck)
- Solución estándar ICP VIII de 24 elementos, (Merck), cada uno se encuentra a la concentración de 100 mg/L. Contiene los siguientes elementos: Al, B, Ba, Be, Bi, Ca Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, K, Li Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Se, Sr, Te, Tl y Zn.

### 2.2.1 Estudio de campo.

Se estudió la concentración de metales traza en plantas de dos zonas de cultivo cercanas a la Ciudad de México, el Valle del Mezquital y Tláhuac. Las mismas han sido regadas con aguas residuales provenientes de actividades domésticas, industriales y comerciales de la ciudad por más de 50 años. La localización de ambas zonas se muestra en la figura 2.1. El análisis se llevó a cabo en diferentes partes de plantas de frutas y vegetales, cultivados en estas dos zonas. Esta información es relevante tanto para futuros estudios de transporte y acumulación de metales traza en tejido vegetal y por supuesto, para su potencial toxicidad, debida a la concentración en partes comestibles que forman la cadena alimenticia de seres humanos y animales.

El Valle del Mezquital se encuentra en la subcuenca del río Tula, la cual pertenece a la cuenca del río Moctezuma, Alto Pánuco. En el valle existen tres corrientes principales de régimen perenne: el río Tula, el río Actopan y el río Salado, las cuales cruzan la zona con dirección predominante de sur a norte. Además existe un sistema de presas derivadoras y de canales de distribución para el manejo y control de las aguas de riego y un sistema de drenaje para los volúmenes excedentes. Los embalses más importantes son la presa Requena y Endhó.



Fig.2.1: Ubicación geográfica de las dos zonas de cultivo estudiadas.

### *Transporte y Características de las Aguas Residuales*

El Valle de México, donde se asientan la Ciudad de México y su zona metropolitana, es una cuenca cerrada que drena sus aguas residuales y pluviales de sur a norte, a través de tres salidas artificiales: el Gran Canal, el Emisor Central y el Emisor Poniente. Estas aguas han sido conducidas a las áreas de riego del Valle del Mezquital desde 1890.

El agua transportada al Valle del Mezquital tiene en promedio un flujo de  $50.7 \text{ m}^3/\text{s}$  de los cuales  $38.1 \text{ m}^3/\text{s}$  corresponden a aguas residuales domésticas, industriales y comerciales y los restantes  $13 \text{ m}^3/\text{s}$ , calculados como promedio anual, provienen de la lluvia que se concentra en los meses de mayo a octubre. Esto provoca una elevada variabilidad en la cantidad de agua durante el año.

Las aguas naturales contienen una cantidad reducida de impurezas, lo que permite la vida animal, su uso en la agricultura y en actividades pecuarias. El uso de aguas residuales para irrigación, sin ningún tratamiento previo, las convierte en fuente de contaminación para los suelos y las plantas. En la zona se observa poca variedad de cultivos y aunque no se puede demostrar que sea causada por la concentración de metales pesados a niveles tóxicos, análisis de los suelos y plantas colectados en la región, muestran una clara acumulación de los metales pesados. [4]

En contraste, en la delegación de Tláhuac, se cultiva una gran variedad de frutas, vegetales, tubérculos y flores. En la actualidad, en esa región se produce el 15% de los productos agrícolas y sus acuíferos proveen alrededor del 8% del agua que se consumen en la Ciudad de México. La explotación de los acuíferos causó que se secaran los manantiales que alimentaban de agua fresca los canales. Para mantener el agua necesaria para la irrigación,

se bombean aguas residuales en los mismos. Sin embargo, a finales de los 80, la mayoría de los canales estaban secos.

La contaminación de los canales se debe a las aguas residuales (aguas negras) provenientes de la ciudad y de los desechos domésticos de más de 20,000 habitantes de asentamientos irregulares. Además la disminución de la vegetación y el aumento de la urbanización de la zona, han traído como consecuencia una disminución del 30% en el promedio anual de precipitaciones. [5]

### ***2.2.2 Preparación de muestras con fotólisis UV.***

Las muestras colectadas se lavan previamente para eliminar restos de suelo y otros materiales particulados depositados en la misma. Este proceso se realiza primeramente con bastante agua potable y luego con agua destilada y agua desionizada varias veces. Después se secan en una estufa a 90 °C, se muelen y se tamizan lo más fino posible (150-200 mesh), de acuerdo al tipo de matriz. Para la digestión de las muestras con fotólisis UV, se pesan de 50-100 mg del polvo. Estos 50-100 mg se colocan en un tubo de cuarzo de 12 mL de capacidad y se agrega la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> correspondiente, 3, 4.5 ó 6 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%).

Se usa un láser excímero Lambda Physik LPX200 (248 nm), con una energía de 400 mJ/pulso. La frecuencia del pulso es de 60 Hz y el área de irradiación es de 2.5x1.5 cm<sup>2</sup>. Los tubos con las muestras se colocan a 30 cm del láser, en un porta muestras con capacidad para 12 tubos sujeto a un rotor de 15 rpm, el cual va alternando la posición de las mismas frente al láser. Las muestras se agitan constantemente durante todo el proceso. Para las muestras digeridas a temperatura ambiente, se usa un sistema de enfriamiento para mantener la temperatura a 30 °C. Las muestras a 90 °C se calientan usando una placa calefactora. Después de la irradiación (el tiempo total se calcula multiplicando la cantidad de muestras por el tiempo de digestión individual), se filtran por un filtro de membrana Nuclepore de 0.45 µm, previamente pesado, para eliminar la materia orgánica no digerida. En la figura 2.2 se muestran los arreglos experimentales usados.

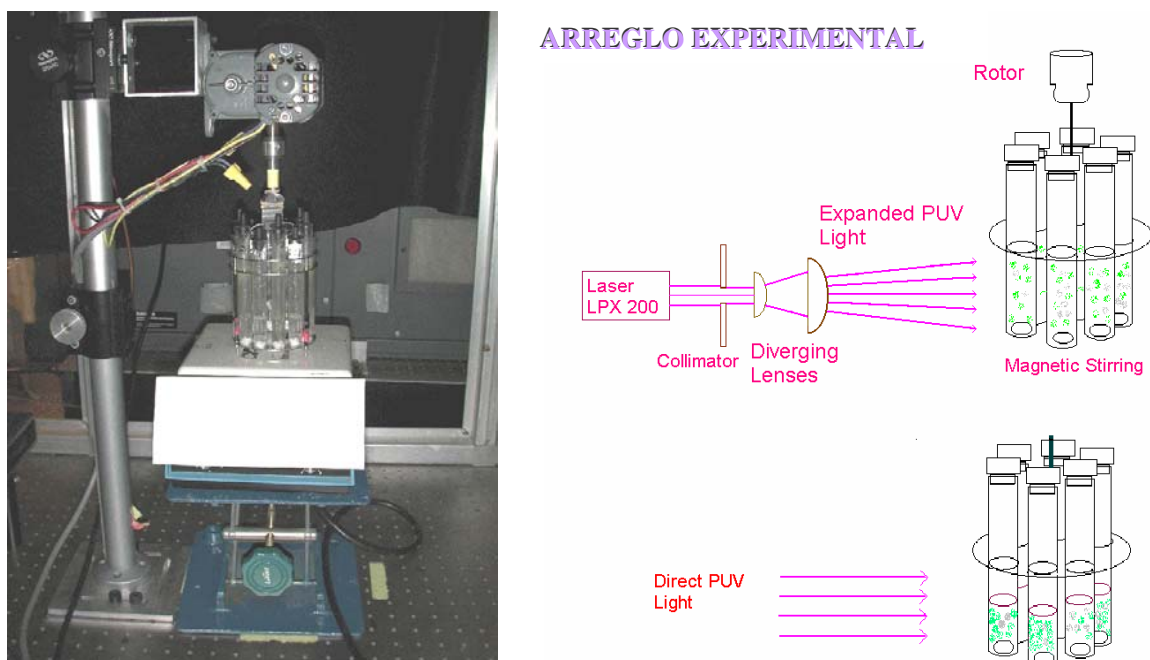


Fig.2.2: Arreglo experimental para la irradiación de muestras con UV.

### 2.2.3 Preparación de las muestras para su análisis con PIXE después de la fotólisis UV.

Para el análisis con PIXE se requiere eliminar el líquido restante de la digestión y concentrar sobre un soporte los elementos de interés. La materia orgánica no digerida durante el proceso se filtra a través de un filtro de membrana Nuclepore de  $0.45 \mu\text{m}$ , previamente pesado. La preparación de muestras para el análisis con PIXE se realiza de las siguientes maneras:

1. Depositando una o varias alícuotas sobre un filtro de Teflón, dejando secar y realizando el análisis como blanco delgado. En este caso se hace el análisis al aire y se logra que el tamaño de la muestra sea comparable con las dimensiones del haz. Éste tiene la desventaja de que solo se detectan los elementos en concentraciones mayores que  $1 \text{ mg/kg}$ .
2. Preconcentrando los metales presentes en la muestra como carbamatos y realizando el análisis como blanco delgado, grueso o semigrueso. Aunque el factor de concentración es mayor, permitiendo detectar virtualmente todos los elementos que forman carbamatos, se pierden algunos que no llegan a formarlos. El análisis se realiza en la cámara de vacío [6], donde se logra un tamaño de haz mucho mayor que al aire, comparable con el tamaño de la muestra.

En la variante de extraer los elementos traza como carbamatos, se requiere una manipulación mínima de la muestra. Esta técnica se basa en la gran estabilidad de los carbamatos de numerosos elementos y su baja solubilidad en agua determinada por el pH.



El paladio es usado como coprecipitante y estándar interno, ya que sus carbamatos tienen muy alta estabilidad y es un elemento raro en el tipo de muestras a analizar. [7]

Se caracterizaron dos métodos de extracción de los elementos como carbamatos. Para ello, se usó el estándar de Merck de 24 elementos. Se preparó cada muestra independiente, añadiendo 5 µg totales de cada metal. Se prepararon doce réplicas para cada caso con su respectivo blanco. A cada muestra se le añadió la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> correspondiente a muestras reales, según el caso y se aforó a 50 mL. En este caso no se irradiaron con UV.

#### **Método 1:**

1. Se prepara una solución de 40 mL agua conteniendo 100 µg/L de 24 elementos (Solución patrón).
2. Se ajusta el pH de la solución a 4.
3. Se añade 1 mL de una solución de APDC y DDTC al 10% preparada en el momento de usarla.
4. Se agregan 100 µL de una solución de Pd a 1000 mg/kg como coprecipitante y estándar interno.
5. Se afora a 50 mL
6. Se agita por 5 minutos y se deja reposar por 30 minutos.
7. Se filtra a través de un filtro Nuclepore de ésteres de celulosa de 0.45 µm de poro.
8. El filtro se seca y se guarda en un desecador, para su posterior análisis con PIXE.
9. Este procedimiento se realiza para cada muestra.

#### **Método 2: [8]**

1. Se prepara una solución de 40 mL agua conteniendo 100 µg/L de 24 elementos (Solución patrón).
2. Se ajusta el pH de la solución a 3.5 – 4.
3. Se añaden 30 mg de APDC, 300 mg de ácido ascórbico, 20 mg de cuferron, y 15 mg de bisulfito, previamente disueltos en 5 mL de agua desionizada y 30 mg de oxina previamente disuelta en 2 mL de propanol.
4. Se le agregan 100 µL de una solución de Pd a 1000 mg/kg, como coprecipitante y estándar interno.
5. Se afora a 50 mL.
6. Se agita por 5 minutos y se deja reposar por 30 minutos.
7. Se filtra a través de un filtro Nuclepore de ésteres de celulosa de 0.45 µm de poro.
8. El filtro se seca y se guarda en un desecador, para su posterior análisis con PIXE.
9. Este procedimiento se realiza para cada muestra.

Para AAN se usaron las mismas muestras que para el análisis con PIXE y para AA solo se digirieron con UV y se filtraron previamente por un filtro de membrana Nuclepore de 0.45 µm, previamente pesado, para eliminar la materia orgánica no digerida.

#### **2.2.4 Pastillas de suelos.**

Se pesan 0.5 g de suelo, previamente secado y molido. Utilizando un pastillador, se prensa el suelo pesado para obtener una pastilla de aproximadamente 4 mm de espesor. Las pastillas son analizadas con PIXE como blancos gruesos.

#### **2.2.5 Calcinación.**

Para la descomposición de la materia orgánica por calcinación se pesan 3 g de la muestra en un crisol (ésta no debe sobrepasar la mitad del crisol) previamente pesado, después de haberlo puesto a peso constante durante 2 h (aprox.) en la estufa a 600 °C. Se calcina la muestra, primero por una hora a 350 °C hasta que no se desprendan humos y luego se va aumentando la temperatura 100 °C cada hora, hasta llegar a 550 °C. Se mantiene a esta temperatura por 2 h, cuidando que no aumente. Se repite la operación anterior si es necesario, hasta conseguir unas cenizas blancas o ligeramente grises, homogéneas. Se enfrían en el desecador y se pesan entre 0.25 g y 0.5 g, que son disueltos en agua desionizada a la cual se le disminuyó el pH a 1, usando HNO<sub>3</sub>. Luego se preconcentran los elementos de interés como carbamatos.

### **2.3 Análisis con PIXE.**

El análisis con PIXE se llevó a cabo con el acelerador PELETRON NEC 9SDH de 3 MV del IFUNAM. Las muestras de plantas preconcentradas (blancos delgados, semigruesos o gruesos) fueron bombardeadas al vacío con un haz de protones de 3 MeV con una corriente de 20-50 nA durante 5-10 minutos. Las pastillas de suelos (blancos gruesos) fueron bombardeadas al aire con protones de 3 MeV con una corriente de 50 nA durante 5 minutos al igual que los filtros de Teflón, sólo que para éstos la corriente usada fue de 10 nA.

Los rayos X emitidos fueron detectados con un detector de germanio Canberra LEGe. Debido a que este trabajo sólo se basó en la detección de elementos pesados y traza fue necesario colocar un filtro de aluminio de 38 µm de espesor frente al detector para disminuir los conteos en la parte de baja energía del espectro de PIXE. La calibración del sistema de detección se llevó a cabo utilizando películas de Micromatter para blancos delgados y pastillas de material certificado de suelo IAEA-SOIL-7, sedimento lacustre IAEA-SL-1, sedimento lacustre Buffalo River NIST 1547, Peach Leaves NIST 1547a y Tomato Leaves NIST 1573a, para blancos gruesos. Los arreglos geométricos se describieron en el capítulo 1.

#### **2.3.1 Tipos de blancos.**

Si el haz de protones pierde energía a su paso por la muestra, por debajo de un porcentaje, (> 1%) sobre el cual es relevante la pérdida de energía en el cálculo de la composición de la muestra, se dice que ésta es delgada. Si pierde toda su energía, o sea, se frena completamente dentro de la muestra, se dice que ésta es gruesa. Si pierde energía en un porcentaje relevante, pero no se frena dentro de la muestra, se dice que ésta es semigruesa.

El uso de blancos gruesos y semigruesos tiene sus ventajas y desventajas. Entre las últimas tenemos que el cálculo de las concentraciones se hace más complejo al requerir correcciones por el frenado de los protones y la atenuación de los rayos X característicos, la muestra se carga más, la medida de la carga se hace más difícil, al no poderse hacer colocando una caja de Faraday al final de la cámara y además la muestra puede dañarse por el calentamiento que se produce en ella, al ceder el haz toda su energía. Todos estos inconvenientes son superables. Sus ventajas son que la preparación de muestras es más fácil y rápida, que hay menos riesgo de contaminación o pérdida de elementos en la preparación y que la homogeneidad es menos crítica al promediarse sobre un volumen mayor.

#### Bibliografía.

- [1] Buldini, P. L., S. Cavalli, A. Trifiró. *State-of-the-art ion chromatographic determination of inorganic ions in food*. J. Chromatography A 789 (1997) 529-548.
- [2] Buldini, P. L., S. Cavalli, A. Mevoli. *Sample pretreatment by UV photolysis for the ion chromatographic analysis of plant material*. J. Chromatography A 739 (1996) 167-173.
- [3] Anderozzi, R., V. Caprio, R. Marotta and D. Vogna. *Paracetamol oxidation from aqueous solutions by means of ozonation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV system*. Water Research 37 (2003) 993-1004.
- [4] Cajuste, L. J. y R. Carrillo. *La contaminación por metales pesados en suelos agrícolas y aguas residuales*.
- [5] Wirth C. J. *The governmental response to environmental degradation in the Xochimilco Ecological Zone of Mexico City*. For delivery at the 1997 meeting of the Latin American Studies Association.
- [6] J. Miranda, L. Rodríguez-Fernández, O.G. de Lucio, K. López y J.A. Harada. *A new beam line for characteristic X-ray experiments at the Pelletron accelerator, Instituto de Física, UNAM*. Rev. Mex. Fís. 46 (2000) 367.
- [7] Ghermandi G, R Cecchi y P Laj *Procedures for target preparation to improve PIXE efficiency in environmental research*. Nucl Instrum and Meth in Phy. Res. B 109 (1996) 63-70.
- [8] H. A. van der Sloot, G. D. Wals, C. A. Weers and H. A. Das. *Simultaneous Elimination of Sodium-24, Bromium-82 and Phosphorus-32 in the Determination of Trace Elements in Biological Materials by Neutron Activation Analysis*. Anal. Chem. 52, (1980), 112-117.

## Capítulo 3: Obtención de las concentraciones (Programa GUPIX)

### 3.1 Cuantificación con PIXE. [1,2]

El análisis de la emisión de rayos X involucra dos pasos igualmente importantes:

1. El mecanismo de excitación de los átomos de la muestra para lograr la emisión de los rayos X característicos.
2. La detección e identificación de estos rayos X, lo cual nos permite clasificar el elemento en estudio y la intensidad de la emisión nos permite conocer la concentración de dicho elemento.

Existen cuatro procesos físicos de importancia para PIXE, que se representan gráficamente en la figura 3.1:

1. Las partículas cargadas (protones o iones pesados) entran al material o muestra y sufren numerosas colisiones con núcleos y electrones.
2. La energía de las partículas cargadas va disminuyendo a lo largo de la trayectoria de acuerdo con el poder de frenado de la muestra.
3. En algunos de los átomos ionizados se emiten rayos X característicos, y la probabilidad viene dada por la sección eficaz de producción de rayos X.
4. Los rayos X emitidos por la muestra, son atenuados en la matriz (blancos gruesos).

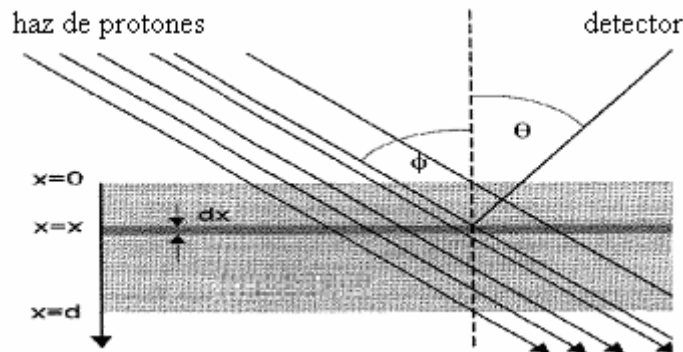


Fig.3.1: Representación esquemática de PIXE, para una muestra de espesor d.

Además de que la emisión de rayos X ocurre con una cierta probabilidad, la composición de la muestra influye también en el frenado del haz de iones y en la atenuación de los rayos X.

En el caso del análisis por PIXE, el campo de radiación (rayos X) en el elemento Z de la muestra que sale en la dirección del detector, puede escribirse de la siguiente forma:

$$Y(Z) = \frac{N_{av} w_{KZ} b_{KZ} \epsilon_z}{A_z} N_p C_z \int_{E_0}^{E_f} \frac{\sigma_z(E) T_z(E)}{S(E)} dE \quad (3.1.1)$$

donde:  $N_p$  es el número de protones que incidieron sobre la muestra,  $A_Z$  es la masa atómica del elemento,  $\omega_Z$  es la producción de fluorescencia de rayos X (K o L),  $b_Z$  es la fracción de rayos X totales que aparecen como líneas  $K_\alpha$  o  $L_\alpha$ ,  $\varepsilon_Z$  es la eficiencia absoluta del sistema de detección para la línea en cuestión,  $N_{av}$  es el número de Avogadro,  $S$  es la sección transversal del haz, que se supone tiene una distribución de carga uniforme,  $C_Z$  es la concentración del elemento Z. El término  $T_Z(E)$  describe la transmisión de los fotones desde las profundidades sucesivas dentro de la muestra y puede escribirse como:

$$T_Z(E) = \exp \left\{ - \left( \frac{\mu}{\rho} \right)_Z \frac{\cos \phi}{\sin \theta} \int_{E_0}^{E_f} \frac{dE}{S(E)} \right\} \quad (3.1.2)$$

donde:  $\phi$  es el ángulo que forman la normal de la muestra y el haz de protones,  $\theta$  es el ángulo formado entre la normal de la muestra y el detector y  $(\mu/\rho)_Z$  es el coeficiente másico de atenuación.

Queda claro del análisis anterior que para llevar a cabo un análisis confiable por PIXE, muchas condiciones deben cumplirse. Un análisis exitoso puede realizarse con una buena caracterización de la muestra (superficie plana, espesor y composición de la matriz conocidos), y un control absoluto sobre las condiciones experimentales. En el caso de muestras delgadas el análisis es mucho más simple que en el caso de las muestras gruesas.

El proceso de cuantificación puede llevarse a cabo de dos formas:

1. Con un cálculo aproximado de los parámetros fundamentales.
2. Comparando la muestra desconocida con una muestra estándar (se determina experimentalmente una constante de calibración).

Los factores más importantes de incertidumbre para PIXE, que influyen en su exactitud y precisión como técnica analítica son los siguientes:

1. Energía de la partícula  $E(0)$ .
2. La exposición total de la muestra debida al haz incidente Q.
3. Geometría del experimento ( $\theta$ ,  $\phi$ ), donde  $\phi$  es el ángulo que forman la normal de la muestra y el haz de protones y  $\theta$  es el ángulo formado entre la normal de la muestra y el detector.
4. Eficiencia en la detección ( $\varepsilon$ ).
5. Composición de la matriz.
6. Incertidumbre estadística en la determinación del área del pico.
7. Incertidumbre en la determinación de las secciones eficaces de producción de rayos X y de los coeficientes de atenuación de los rayos X.

### 3.2 Programa para el cálculo de las concentraciones (GUPIX). [1,2,3]

“The Guelph PIXe software package” (GUPIX) [1,2], es un programa para computadoras desarrollado en la Universidad de Guelph, Ontario, con el objetivo de analizar los espectros

obtenidos con PIXE. Las primeras versiones del programa fueron realizadas en la década de los 80.

Los espectros de PIXE son usualmente complejos, presentando un gran número de picos de varios elementos, aproximadamente de forma gaussiana y situados sobre un fondo continuo cuya intensidad depende de la energía del protón para una muestra dada. Para lograr cuantificar concentraciones elementales a partir de este espectro, es necesario determinar primeramente el área de un pico por cada elemento presente en el espectro, generalmente de su línea principal, ya sea K o L. Luego hay que convertir esa área a concentraciones elementales.

La primera etapa se realiza generalmente ajustando por mínimos cuadrados un modelo al espectro. Este modelo tiene una parte para los picos y otra para el fondo. Es necesario en esta etapa conocer la respuesta del detector (forma de los picos), la forma del fondo y las calibraciones en energía y resolución del espectro. Se requiere además de una base de datos con las intensidades relativas de los rayos X de cada elemento, así como de la información física pertinente para modificarlas teniendo presentes los efectos de matriz y de absorbente sobre ellas.

En la segunda etapa se hace uso de la expresión matemática de PIXE para obtener las concentraciones elementales a partir de las áreas de los picos. La intensidad de los rayos X  $Y(Z,M)$  de la línea principal de un elemento Z en una matriz M dada es:

$$Y(Z, M) = Y_{lt}(Z, M) \times C_z \times Q \times fq \times \Omega \times \varepsilon \times (trans) \quad (3.2.1)$$

donde:

$Y_{lt}(Z,M)$ : es la intensidad teórica.

$C_z$ : es la concentración real del elemento Z en la matriz M.

$Q$ : es la carga medida.

$fq$ : es el factor de conversión de la carga a  $\mu\text{C}$ .

$\Omega$ : es el ángulo sólido del detector en estereorradianes.

$\varepsilon$ : es la eficiencia intrínseca del detector (cerca de 1 para energías entre 5-20 keV).

$trans$ : es la transmisión a través de filtros o absorbentes colocados entre la muestra y el detector.

Se combina  $fq$  y  $\Omega$  en una constante instrumental llamada  $H$  la cual es en principio independiente del elemento a determinar y de la matriz.  $H$  se determina corriendo estándares que tengan preferiblemente similitud con la matriz de la muestra a analizar. Cuando la carga se mide en  $\mu\text{C}$ ,  $H$  es solo el ángulo sólido del detector.

Entonces la ecuación para determinar las concentraciones elementales es:

$$C_z = \frac{Y(Z, M)}{Y_{lt}(Z, M) \times H \times Q \times \varepsilon \times trans} \quad (3.2.2)$$

### 3.2.1 Modelo de los picos.

Denotemos por  $I_{mm}$  la intensidad relativa de la línea  $m$ -ésima de un elemento  $Z$ , con esta cantidad normalizada a la unidad para la línea principal considerada. Sea  $I'_{mz}$  dicha cantidad extraída del espectro de la muestra considerada.  $I'_{mz}$  es  $I_{mm}$  modificada por la atenuación de los rayos X en la muestra,  $t_{mz}$ , (si ésta no fuera fina), por la atenuación de los rayos X a través de los filtros que colocamos entre la muestra y el detector,  $f_{mz}$ , y por la eficiencia intrínseca del detector,  $\varepsilon_{mz}$ . La relación entre ambas puede escribirse como:

$$I'_{mz} = NI_{mz} t_{mz} f_{mz} \varepsilon_{mz} \quad (3.2.1.1)$$

Donde  $N$  es un factor de normalización para mantener la línea principal con intensidad relativa a la unidad. Para conocer las magnitudes de  $t_{mz}$ ,  $f_{mz}$ ,  $\varepsilon_{mz}$  es necesario conocer los espesores másicos de los filtros, ángulos de incidencia de los protones y del detector y la energía de los protones. Además debemos usar bases de datos de secciones eficaces de ionización, coeficientes másicos de atenuación, y poderes de frenado y para calcular los dos últimos, debemos conocer la composición de la matriz.

Las cuentas canal a canal del espectro de rayos X de un elemento  $Z$  serán:

$$E_z(c) = A_z \sum_m F(c, z, m) I'_{mz} \quad (3.2.1.2)$$

donde  $c$  denota el canal,  $F(c,z,m)$  es la función que describe la forma del pico y  $A_z$  es la amplitud de la gaussiana del pico principal del elemento  $Z$ . La contribución de los rayos X característicos en el espectro de PIXE es entonces:

$$E(c) = \sum_z E_z(c) \quad (3.2.1.3)$$

Las líneas superpuestas en el espectro, se tratan para su separación y, resumiendo, las intensidades relativas de las líneas de rayos X de cada elemento se pueden evaluar y el espectro de un elemento se puede construir, sea cual sea el grosor de la muestra, suponiendo que conocemos la matriz (concentración de los elementos mayoritarios (>1%) y minoritarios (0.1%-1%) de la muestra). El espectro total es simplemente una suma de los espectros elementales. Finalmente, si la calibración energía-canal es dada y la forma de los picos a través de la función  $F(c,z,m)$  conocida, entonces las únicas magnitudes desconocidas son las amplitudes de las gaussianas  $A_z$  de las líneas principales de cada elemento, lo cual reduce el número de parámetros en el ajuste, haciendo más rápido el cálculo.

Una opción interesante que brinda el programa, es la posibilidad de designar como línea principal de uno o más elementos otra de sus líneas, refiriendo el resto de las líneas a la línea elegida. Esto es útil si la línea principal del elemento de interés se superpone a una línea de otro elemento, ya que en este caso, el pico tendría no sólo que sobresalir estadísticamente de una manera significativa del fondo, sino también del pico con el que se traslapa, lo que estropea el límite de detección (LDD). Cuanto más intensa es la línea que se

traslapa con la línea principal que nos interesa, más útil resulta esta posibilidad, mejorando los resultados obtenidos.

### ***3.2.2 Filtrado del fondo.***

Existen dos formas de modelar el fondo en los espectros de PIXE, ya que la función que describe la forma del pico es analítica, algunos autores siguen también esta línea para modelar el fondo. Otros prefieren eliminarlo a través de operaciones matemáticas, evitando cualquier elección de una forma funcional para describirlo. De esta última manera es que se realiza el modelado de fondo con el programa GUIPIX, que convoluciona con ese fin el espectro con un filtro sombrero de copa, el cual describiremos a continuación.

Si se ve el eje de energías del espectro como un eje temporal, se observa que el espectro contiene tres bandas de frecuencias: (a) el continuo, que tiene baja frecuencia, (b) los picos, que tienen frecuencia intermedia y (c) las fluctuaciones canal a canal de altas frecuencias debidas a la estadística de conteos. Bajo esta perspectiva, una operación matemática sobre los datos experimentales, capaz de eliminar bandas de frecuencia (filtrado de datos) sería interesante para eliminar el fondo. Se usa un filtro sombrero de copa de área cero que reduce el tiempo de cálculo por ser más simple.

### ***3.2.3 Subrutinas del programa.***

En la mayoría de los análisis realizados se usó la subrutina 2 (trace calc), en la cual se supone conocida la matriz y se introduce en el programa para que la tenga en cuenta. Si la muestra es fina, bastará con ajustar por mínimos cuadrados el modelo de los picos filtrado al espectro de la muestra filtrado y calcular las concentraciones elementales a través de la ecuación (3.2.2), tras conocer las áreas de los picos con el ajuste. En este caso no es necesario corregir las intensidades relativas de las líneas por el factor de atenuación en la matriz de la muestra de los rayos X, según la energía del mismo. Para el análisis de muestras gruesas esta corrección si es necesaria, lo que obliga a conocer la composición de la matriz.

También, en caso de desconocer la matriz, el programa tiene una subrutina que permite determinar primero los componentes de la misma y luego realizar el cálculo de las trazas.

### ***3.2.4 Control de errores. [1,2,3,4]***

El programa incluye y reporta los errores cometidos durante el proceso de ajuste. Para el caso de blancos gruesos, un estudio de las bases de datos de los parámetros dentro de la integral, para el cálculo de las concentraciones, concluyó que el programa debería ser capaz de medir una concentración elemental con una incertidumbre del 3%, usando una línea K, la cual aumenta ligeramente para el caso de una línea L, debido a mayores errores en las bases de datos de la sección eficaz de producción de rayos X. Sin embargo para lograr esto, la muestra debe ser lisa, tener bien definido el ángulo de la muestra con el haz y se debe considerar óptima la deconvolución que se realice del espectro. La consideración de otros errores se deja en manos del usuario.



En nuestro caso sólo consideramos los errores que incluye el programa, debido a que, como ya se ha mencionado anteriormente, se utiliza un estándar interno, calculando las concentraciones de los elementos presentes en la muestra de la siguiente manera:

$$c_{RZ} = \frac{c_{RE}}{c_{GE}} c_{GZ} \quad (3.2.4.1)$$

donde  $c_{RZ}$  es la concentración real del elemento Z en la muestra,  $c_{RE}$  es la concentración real del estándar que adicionamos en la muestra,  $c_{GE}$  y  $c_{GZ}$  son las concentraciones del estándar y del elemento Z obtenidas con el programa GUPIX, respectivamente.

Con este procedimiento, eliminamos los posibles errores en el cálculo de Q, el cual se dificulta bastante sobre todo para arreglos al aire como el que usamos en ocasiones, o en el análisis de blancos gruesos. Además eliminamos los errores instrumentales incluidos en H.

Sólo nos queda considerar la incertidumbre en la preparación de las muestras, la cual está bien caracterizada con los instrumentos que usamos tanto para pesar como para pipetear. En la validación del método, que se detalla en los capítulos siguientes, se obtiene una precisión y exactitud del método con un coeficiente de variación (CV) menor que el 5% para muestras independientes.

Para el caso de las muestras de suelo, donde no es posible incluir un estándar interno, la calibración del sistema se lleva a cabo analizando patrones externos de matriz similar, como el estándar certificado de suelo IAEA-SOIL-7, sedimento lacustre IAEA-SL-1 y sedimento lacustre Buffalo River NIST 1547, alternándolos con las muestras a analizar. Además se controlan rigurosamente los parámetros como geometría del experimento y corriente del haz, para garantizar que el análisis sea lo más preciso posible.

#### Bibliografía.

- [1] J. A. Maxwell, J. L. Campbell and W. J. Teesdale. *The Guelph PIXE Software Package*. Elsevier. Nucl. Instr. and Meth. in Phys. Res. B 43 (1989) 218
- [2] Johansson, S.A.E. and J.L. Campbell. *PIXE: A novel technique for elemental analysis*. John Wiley & Sons LTD, (1988), pp 347.
- [3] José Enrique Martín Domínguez. *Análisis de sedimentos de la Ría de Huelva mediante TTPIXE*. Trabajo de Investigación de la Universidad de Sevilla, Programa de tercer ciclo "Física". 1992-1994.
- [4] J. L. Campbell and J. A. Cookson. Uncertainties in TTPIXE Analysis. Nucl. Instr. and Meth. 212 (1983) 427

## Capítulo 4: Optimización y validación del método.

### 4.1 Diseño de experimento factorial para la optimización del proceso de digestión con fotólisis UV. [1,2]

Todas las actividades relacionadas con la planeación y la realización de estudios de investigación tienen implicaciones estadísticas. Es posible que las comparaciones entre tratamientos de un método específico, se vean afectadas de manera sustancial por las condiciones en las que ocurren. Con frecuencia, las interpretaciones claras de los efectos para un factor de tratamiento, deben tomar en cuenta los efectos de otros factores. Para investigar más de un factor a la vez se utilizan los diseños factoriales.

Los diseños factoriales producen experimentos más eficientes, pues cada observación proporciona información sobre todos los factores y es factible ver las respuestas de un factor con diferentes niveles de otros factores en el mismo experimento. La respuesta a cualquier factor observado en diferentes condiciones, indica si los factores actúan en las unidades experimentales de forma independiente. La interacción entre los factores ocurre cuando su actuación no es independiente.

Como parte de la propuesta de un nuevo método para la digestión de matrices orgánicas y su posterior análisis con PIXE, se propone un diseño factorial para optimizar los factores más importantes que intervienen en la reducción de masa y los porcentajes de recuperación de los elementos de interés, cuando la muestra es digerida con fotólisis UV. Además se comparan los resultados obtenidos con el método optimizado y un método convencional, en este caso la calcinación.

#### 4.1.1 Diseño factorial.

**Hipótesis principal:** La digestión con fotólisis UV permite concentrar ciertos elementos traza presentes en frutas y verduras, a un nivel detectable y cuantificable con PIXE.

**Hipótesis Secundaria #1:** Se pueden encontrar las condiciones óptimas de la digestión, teniendo en cuenta el tiempo de irradiación, la relación masa a digerir/cantidad de  $H_2O_2$ , para lograr una óptima reducción de masa y óptimos porcentajes de recuperación de los elementos de interés.

**Hipótesis Secundaria #2:** Se puede establecer un patrón de disminución de la concentración de ciertos elementos durante el proceso de digestión, en dependencia de su concentración y el tipo de matriz.

**Hipótesis Secundaria #3:** Para cada tipo de matriz se obtiene una reducción de masa, con la cual se concentran ciertos elementos por encima de su límite de detección y cuantificación con PIXE.

Factores que intervienen en el diseño para las pruebas de hipótesis 1 y 2:

1. Tiempo de irradiación: se realizó la irradiación de las muestras por 5 min y 10 min.
2. Relación masa a digerir/cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se probaron tres relaciones: 50 mg/3 mL, 50 mg/4.5 mL y 50 mg/6 mL.
3. Concentración de los elementos de interés. Se probaron las siguientes concentraciones: 0 µg, 10 µg, 20 µg, 100 µg y 200 µg del estándar de 24 elementos.

En la tabla 1 se muestra el diseño factorial utilizado para las pruebas de hipótesis 1 y 2.

Tiempo de digestión	Cant.H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /masa a digerir	masa total (µg)
5 min	50mg/3mL	0 µg
		10 µg
		20 µg
		100 µg
		200 µg
	50mg/4.5mL	0 µg
		10 µg
		20 µg
		100 µg
		200 µg
	50mg/6mL	0 µg
		10 µg
		20 µg
		100 µg
		200 µg
10 min	50mg/3mL	0 µg
		10 µg
		20 µg
		100 µg
		200 µg
	50mg/4.5mL	0 µg
		10 µg
		20 µg
		100 µg
		200 µg
	50mg/6mL	0 µg
		10 µg
		20 µg
		100 µg
		200 µg

Tabla 1: Diseño factorial.

Cada punto del diseño se repitió para una matriz de frutas y una de verduras. Se hicieron 3 réplicas de cada experimento, generando un total de 180 muestras con un total de 5 concentraciones a estudiar.

Para la prueba de hipótesis #3 se realizó la digestión con estándares internacionales de cada una de las matrices y en las condiciones óptimas encontradas en las pruebas de 1 y 2, para los límites de detección y cuantificación con PIXE, con 12 réplicas cada una.

Para la interpretación de los resultados se determinó si los factores son independientes o si de lo contrario, era necesario realizar el análisis de los efectos de los factores, entendiéndose por efecto, algún cambio en la respuesta medida (reducción de masa y porcentaje de recuperación de los elementos de interés) por un cambio en el nivel de dicho factor.

Para estudiar el efecto de la temperatura, que como ya se ha visto, favorece la reducción de masa pero puede causar volatilización de los elementos de interés, comparamos las mejores condiciones encontradas a 30 °C, realizando ahora la digestión durante 5 min a 90 °C. Al igual que en el caso anterior, se estudiaron los porcentajes de recuperación después de la digestión y después de preconcentrar los elementos como carbamatos.

#### *Materiales y Métodos:*

Las muestras a estudiar (en este caso espinaca y ciruela) son previamente secadas, molidas y tamizadas. Se toman 50 mg de polvo y se le añaden las concentraciones correspondientes del estándar de 24 metales dentro de los cuales se encuentran los de interés. El proceso de digestión se realiza manteniendo una temperatura constante de 30 °C o 90 °C según el caso.

Luego del proceso de digestión, se filtran en un filtro de membrana Nuclepore de 0.45  $\mu\text{m}$  previamente pesado, para eliminar la materia orgánica no digerida. La solución se afora a un volumen constante y se toman alícuotas de 200  $\mu\text{l}$  a los cuales se le agregan 25  $\mu\text{L}$  de una solución de Pd a 1000 mg/kg como estándar interno. Después se realiza el depósito de 80  $\mu\text{l}$  en un filtro de teflón previamente pesado, este depósito se realiza de 20  $\mu\text{L}$  cada vez, para mantener el tamaño de la muestra comparable con las dimensiones del haz de protones. Se determina la reducción de masa pesando los filtros antes y después de depositar la muestra. Los porcentajes de recuperación después de la digestión se determinan a partir de las concentraciones determinadas con PIXE.

El resto de la muestra se somete a otro proceso de preconcentración de los elementos como carbamatos, previamente caracterizado y se cuantifican las concentraciones con PIXE. En este paso podemos estudiar las pérdidas de elementos durante la preconcentración cuando la muestra fue sometida previamente a la UV, ya que los grados de oxidación de algunos elementos cambian durante el proceso, lo cual puede implicar que no formen carbamatos.

## 4.2 Validación de un método analítico. [2,3,4,5]

Un método analítico es la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir para llevar a cabo el análisis de los componentes de una muestra. Analito es el o los componentes específicos de una muestra a medir en un análisis. Este proceso de medición debe ser confiable para ser utilizado con un propósito dado.

Con este objetivo se realiza la validación del método analítico, que es el proceso mediante el cual se demuestra, con estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada, es decir cumple con su propósito. Un proceso de validación debe incluir todo lo que se requiera para demostrar que un método puede cuantificar la concentración de un analito (o series de analitos) en una matriz dada con confiabilidad.

Los parámetros de desempeño a estudiar, para que el método quede validado son los siguientes:

### **Precisión.**

Es el grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea. Está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor del valor medio o central y se expresa matemáticamente como la desviación estándar relativa (RSD) o coeficiente de variación (CV).

La precisión de un método analítico se determina sobre el sistema, al estudiar la respuesta analítica del mismo ante una cantidad agregada de analito, y sobre el método que es la llamada precisión intermedia o tolerancia interdía/analista.

La precisión del sistema se evaluó analizando un sextuplicado de muestras a 4 niveles de concentración agregando alícuotas de un estándar de 24 elementos en solución a 100 mg/kg. Se midió la respuesta analítica y se determinó la media aritmética, desviación estándar y el coeficiente de variación.

El criterio de aceptación fue  $CV \leq 5\%$ .

### **Linealidad.**

Es lo que nos permite asegurar que los resultados obtenidos directamente o mediante una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo definido.

El método que nos permite ajustar valores estadísticos a una recta se denomina mínimos cuadrados y consiste en construir dicha recta de manera que la suma de cuadrados de las desviaciones verticales de todos los puntos respecto a la recta sea mínima. Conjuntamente se determina el rango lineal, que es la concentración mínima y máxima del analito donde se ha probado la linealidad.

**Linealidad del sistema:** Es la proporcionalidad entre la respuesta analítica del sistema (y) y la concentración agregada del analito (x). El análisis debe realizarse con estándares certificados de referencia y las curvas se construyen con al menos 5 niveles de concentración por triplicado.

Se determinó la linealidad del sistema mediante la construcción de una recta con 12 niveles de concentración cada uno por triplicado, con la respuesta analítica del sistema en función de la concentración del analito. Se decidió incluir todos los niveles en el análisis debido a la variabilidad en la concentración de los elementos de interés en las matrices a estudiar.

Se calcularon la pendiente ( $b_1$ ), la ordenada al origen ( $b_0$ ), el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y el intervalo de confianza para la pendiente  $IC(\beta_1)$ . Como criterios de aceptación se usaron  $r^2 \geq 0.98$  y que el intervalo de confianza para la pendiente no incluyera el cero.

**Linealidad del método:** Es la proporcionalidad que existe entre la cantidad adicionada del analito en la muestra (x) y la cantidad recuperada del mismo (y). En este análisis se debe involucrar toda la metodología de preparación de muestras (digestión y preconcentración), para asegurar que los resultados obtenidos sean directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra. Las curvas se construyen con al menos tres niveles de concentración por triplicado.

Se determinó la linealidad del método mediante la construcción de una recta con 12 niveles de concentración cada uno por triplicado, con la concentración recuperada en función de la concentración adicionada del analito. Se analizaron las mismas concentraciones que para la linealidad del sistema.

Se calcularon la pendiente ( $b_1$ ), la ordenada al origen ( $b_0$ ), el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) el intervalo de confianza para la pendiente  $IC(\beta_1)$ , el intervalo de confianza para la ordenada al origen  $IC(\beta_0)$ , y el coeficiente de variación de regresión ( $CV_{y/x}$ )

Como criterios de aceptación se usaron  $r^2 \geq 0.98$ , que el intervalo de confianza para la pendiente incluya la unidad, que el intervalo de confianza para la ordenada al origen incluya el cero y que el coeficiente de variación de regresión no exceda el 5%.

#### **Exactitud y repetibilidad del método.**

La exactitud es la concordancia entre el valor obtenido empleando el método y el valor de referencia. Es también conocida como error sistemático o tendencia y corresponde a la diferencia entre el valor de referencia y el valor obtenido del analito. Este último se expresa como porcentaje de recobro del analito.

La repetibilidad es la precisión del método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes aplicando el método analítico y realizadas por el mismo analista usando los mismos instrumentos.

### **Estabilidad analítica de la muestra.**

Es la propiedad de una muestra, preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de los elementos de interés, después de mantenerse bajo condiciones específicas durante un tiempo determinado.

### **Sensibilidad.**

Es la mínima concentración de analito que puede producir un resultado significativo, ya sea para detectarlo o cuantificarlo. Se expresa a través de los límites de detección y cuantificación.

*Límite de detección:* Es la mínima concentración de analito que se puede detectar pero no necesariamente cuantificar. Esta cantidad corresponde a tres veces la relación señal/ruido. Se expresa en unidades de concentración.

*Límite de cuantificación:* Es la mínima concentración de analito que puede ser determinada con una exactitud y precisión aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas. Esta cantidad corresponde a diez veces la relación señal/ruido. Se expresa en unidades de concentración.

### **Robustez.**

Es la capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en los parámetros normales de operación del método. Se refiere a factores internos del método.

### *Materiales y Métodos.*

Con las condiciones óptimas encontradas para la digestión se prepararon las muestras para las pruebas de validación. La digestión se realizó con 50 mg por muestra del estándar de hojas de espinaca NIST 1570a y agregando las cantidades correspondientes del estándar de 24 elementos. En todos los casos se prepararon los blancos correspondiente y se preconcentraron las muestras para su posterior análisis con PIXE.

Para la preparación de muestras, se utilizó Pd como estándar interno y como respuesta analítica del sistema, las concentraciones, ajustadas a dicho estándar, obtenidas con el programa GUPIX, según se explica en el capítulo 3.

Las fórmulas utilizadas para el cálculo de los diferentes parámetros se encuentran en el anexo I.

Bibliografía.

- [1] Kuehl, R. O. *Diseño de experimentos. Principios estadísticos para el diseño y análisis de investigaciones*. 2<sup>da</sup> Edición (2001), Thomson Learning. Caps. 1-6.
- [2] Croxton, F. E. y Dudley J. Cowden. *Estadística general aplicada*. 2<sup>da</sup> Edición (1954). Fondo de cultura económica.
- [3] Comisión de validación de métodos analíticos. *Métodos analíticos. Guía de Validación*. Edición (2002). Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A. C.
- [4] Romero Guzmán, C. J. *Validación de un método para cuantificar aminoácidos en cereales y leguminosas por HPLC*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM (2003).
- [5] Delgado Martínez, L. *Desarrollo de un método analítico para medir el contenido de alcaloides en lupinos por cromatografía de gases*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM (1998).



## **Capítulo 5: Importancia toxicológica de los metales traza.**

### ***5.1 Introducción.***

De los más de 106 elementos conocidos por el hombre, 84 son metales, por lo que no es de extrañar que las posibilidades de contaminación metálica en el ambiente sean numerosas. Hay que tener presente que los metales son elementos naturales que (desde la edad del cobre) han desempeñado un papel fundamental en el desarrollo de las civilizaciones. El problema surge cuando prolifera su uso industrial y su empleo creciente en la vida cotidiana termina por afectar a la salud. De hecho, el crecimiento demográfico en zonas urbanas y la rápida industrialización han provocado serios problemas de contaminación y deterioro del ambiente, sobre todo, en los países en vías de desarrollo.

Pero no todos los metales son peligrosos; algunos, pese a su toxicidad, se presentan de forma muy escasa o insoluble, por lo que el número de estos elementos dañinos para la salud sólo engloba a unos pocos. De entre ellos, destacan el plomo y el mercurio, seguidos por el berilio, el bario, el cadmio, el cobre, el manganeso, el níquel, el estaño, el vanadio y el zinc. Aunque su presencia natural no debería ser peligrosa (es parte del equilibrio de la naturaleza), lo que sucede es que, desde la Revolución Industrial, su incorporación al medio ambiente por diferentes vías ha crecido vertiginosamente.

La peligrosidad de los metales pesados es mayor al no ser química ni biológicamente degradables. Una vez emitidos, pueden permanecer en el ambiente durante cientos de años. De hecho, la toxicidad de estos metales ha quedado documentada a lo largo de la historia: los médicos griegos y romanos ya diagnosticaban síntomas de envenenamientos agudos por plomo, mucho antes de que la toxicología se convirtiera en ciencia.

### ***5.2 Efectos del hierro en la salud humana.***

El hierro es un elemento esencial en la nutrición humana. Se encuentra en una serie de proteínas de importancia biológica, entre ellas la hemoglobina y los citocromos, y también en muchas enzimas de oxidación-reducción [1]. La mayor parte de los alimentos, excepto la leche, lo contienen en cantidades suficientes como para que no exista déficit de este metal en la dieta [2]. Sin embargo, el hierro se absorbe con dificultad y la mayoría de los individuos apenas cubren sus necesidades diarias [3].

Aproximadamente, sólo se absorbe un 10% del hierro ingerido [1,3] y la composición de la dieta condiciona su absorción; la presencia de iones carbonato, fosfato, oxalato y fitatos dificultan este proceso [2]. Los fitatos se encuentran presentes en los cereales, cacao, nueces, mandarinas, etc., mientras que los oxalatos abundan en espinacas, cacao, plátanos, café, té y ajonjolí [4]. Los agentes reductores como la vitamina C aumentan la absorción.

Las necesidades varían según la edad, el sexo y el estado fisiológico del individuo y el organismo es capaz de regular la absorción a dichas necesidades [1]. Se han establecido niveles entre 7 y 14 mg/día para un individuo adulto. Las mujeres gestantes necesitan además 15 mg/día. La deficiencia de hierro da lugar a desórdenes musculares y disminución de la capacidad física al esfuerzo, anomalías en el comportamiento como

apatía, somnolencia e irritabilidad, disminución del rendimiento intelectual, así como una incidencia más elevada de infecciones en niños.

Su ingestión en exceso produce hemosiderosis [2,5] y hemocromatosis. Hoy, se piensa que esta última se produce por un defecto congénito del metabolismo, el cual origina un aumento en la absorción del hierro. Además, el aporte desmesurado interfiere en el proceso de absorción y la utilización consiguiente del cobre, zinc y manganeso.

### ***5.3 Efectos del cobre en la salud humana.***

El cobre es un elemento esencial para el hombre [6]. Interviene en el desarrollo de los huesos y del tejido elástico, en el funcionamiento del sistema nervioso central y en la síntesis de hemoglobina. Las recomendaciones diarias para su consumo se estiman en 2 mg [7,8]. Dada su gran distribución, es prácticamente imposible preparar una dieta que contenga menos de esta cantidad.

La absorción del cobre es del orden del 30% y es disminuida por altas ingestas alimentarias de hierro, molibdeno y zinc. Este elemento se almacena preferentemente en el hígado, riñón, músculos, corazón y cerebro. Su deficiencia produce anemia, neutropenia y desmineralización ósea, mientras que la ingestión en exceso es tóxica.

Aunque no son frecuentes las intoxicaciones agudas por este metal, dadas sus propiedades laxantes, se caracterizan por náuseas, vómitos, dolor de cabeza y debilidad. En los casos más graves causa taquicardia e hipertensión, que pueden ir seguidas por ictericia, anemia hemolítica, uremia y muerte.

### ***5.4 Efectos del zinc en la salud humana.***

El zinc es un micronutriente esencial y por lo general se le considera como uno de los elementos menos peligrosos [8]. La absorción gastrointestinal es del 20 al 30%, si bien existen factores que la condicionan. Así, se ve favorecida por los aminoácidos cisteína, metionina e histidina, por los azúcares fructosa y lactosa y por la vitamina C. Por el contrario es entorpecida por dosis elevadas de fitatos, fósforo, cobre, manganeso, hierro y estaño. Se acumula en hígado, páncreas, riñones y próstata.

La presencia de zinc en una amplia variedad de enzimas demuestra su importante papel en el metabolismo [8]. La Food and Nutrition Board de la Academia Nacional de Ciencias de EUA, recomienda una ingesta diaria de este elemento de 15 mg para adultos [9]. Su carencia provoca disminución del crecimiento, hipogonadismo marcado y piel áspera y seca.

A pesar de ser un elemento esencial para el hombre, a dosis elevadas resulta tóxico. Entre los síntomas de toxicidad se incluyen vómitos, deshidratación, desequilibrio electrolítico, dolor abdominal, letargo, mareos y pérdida de coordinación muscular. Dosis diarias de 150 mg interfieren con el metabolismo del cobre y del hierro.

La toxicidad de este elemento se incrementa por la presencia de cobre y níquel. Sin embargo, hay que resaltar que el zinc tiene un papel antitóxico muy importante como antagonista metabólico del cadmio.

### ***5.5 Efectos del plomo en la salud humana.***

El plomo es un metal carente de valor biológico, es decir, no es requerido para el funcionamiento normal de los seres vivos. Debido a su tamaño y carga, el plomo puede sustituir al calcio ( $\text{Pb}^{2+}$ : 0.84 Å;  $\text{Ca}^{2+}$ : 0.99 Å), y además de manera preferente, siendo su sitio de acumulación, los tejidos óseos. Esta situación es particularmente alarmante en los niños, que debido a su crecimiento incorporan altas cantidades de calcio. Altas dosis de calcio hacen que el plomo sea "removido" de los tejidos óseos, y que pase a incorporarse al torrente sanguíneo. Una vez ahí puede inducir nefrotoxicidad, neurotoxicidad e hipertensión. Niveles de plomo en sangre de 0.48 µg/L pueden inducir en los niños:

- Daño durante el desarrollo de los órganos del feto.
- Daño en el sistema nervioso central.
- Reducción de las habilidades mentales e iniciación de desórdenes del comportamiento.
- Daño en las funciones del calcio (anteriormente discutido).

A su vez, niveles del orden de 1.2 µg/L pueden inducir:

- Descenso del coeficiente intelectual (CI). Problemas de desarrollo cognitivo y del comportamiento.
- Déficit neurológico que puede persistir hasta la adolescencia.
- Elevación de los umbrales auditivos.
- Peso reducido en recién nacidos. Desarrollo cognitivo temprano anormal.

En adultos que trabajan en ambientes expuestos a la contaminación con plomo, el metal puede acumularse en los huesos, donde su vida media es superior a los 20 años. La osteoporosis, embarazo, o enfermedades crónicas pueden hacer que este plomo se incorpore más rápidamente a la sangre. Los problemas relacionados con la sobreexposición al plomo en adultos incluyen:

- Daño en los riñones.
- Daño en el tracto gastrointestinal.
- Daño en el sistema reproductor.
- Daño en los órganos productores de sangre.
- Daños neurológicos.
- Abortos.

La comisión conjunta FAO/OMS, propone limitar el consumo de Pb por los seres humanos, basado en los efectos conocidos para la salud. Para vegetales y derivados los límites están entre 0.05 y 0.2 mg/kg.

Bibliografía.

- [1] OMS. Directives de Qualité pour L'Eau de Boisson. Vol. 2. Critères d'hygiène et Documentation à l'appui. Genève: OMS, 1986.
- [2] Doadrio López, A. *Química Bioinorgánica*. 3ª ed. Madrid: Laef, 1984.
- [3] García Rollan, M. *Alimentación humana. Errores y sus consecuencias*. Madrid: TH, 1991.
- [4] Rivero, M; Puigdueta, A; Cervera, P. *Sustancias antinutritivas*. Rev. Rol de Enfermería, 1986; 94: 64-67.
- [5] Roberts, R. H. *Sanidad Alimentaria*. Zaragoza: Acribia, 1981.
- [6] Menéndez Gallego, M. *Toxicología del cobre*. *Toxicología*, 1987; 4: 101-120.
- [7] National Academy of Sciences. *Drinking Water and Health*. Washington, 1980.
- [8] Quer-Brossa, S. *Toxicología industrial*. Barcelona: Salvat, 1983.
- [9] Mertz, W. *The essential trace elements*. Science, 1981; 213: 1332-1338.

## Capítulo 6: Resultados y discusión.

En este capítulo se reportan y se discuten los resultados obtenidos durante el desarrollo del proyecto, tanto de la optimización, la validación y las aplicaciones de la nueva metodología propuesta.

### 6.1 Optimización de la fotólisis UV. [1]

La fotólisis UV en presencia de  $H_2O_2$  resultó un procedimiento simple (fácil de operar) y rápido (5-10 min) para digerir matrices orgánicas. La descomposición de la materia orgánica en la mayoría de las matrices fue casi completa y en los otros casos, sólo quedaron pequeñas moléculas orgánicas que se eliminaron con el paso de filtración.

Para realizar la optimización del método, estudiamos la influencia de los siguientes factores:

1. Tiempo de irradiación: se realizó la irradiación de las muestras por 5 y 10 min.
2. Relación masa a digerir/cantidad de  $H_2O_2$ , se probaron tres relaciones 50 mg/3 mL, 50 mg/4.5 mL y 50 mg/6 mL.
3. Concentración de los elementos de interés. Se prepararon muestras conteniendo 0 $\mu$ g (sin elementos), 10 $\mu$ g, 20 $\mu$ g, 100 $\mu$ g y 200 $\mu$ g de cada uno de los 24 elementos del estándar.

Como respuestas del sistema para medir la influencia de cada uno de estos factores se usaron la reducción de masa y el porcentaje de recuperación de los elementos presentes en la muestra.

Para el factor 2, lo ideal hubiese sido probar con mayores concentraciones de  $H_2O_2$ , pero no se encontró comercialmente  $H_2O_2$  Suprapur a una mayor concentración.

*Reducción de masa:* Para todas las condiciones experimentales probadas, se encontró que la reducción de masa era independiente de la concentración de los analitos en la muestra, por lo que se agruparon todas las réplicas con condiciones similares de tiempo de irradiación y relación masa a digerir/cantidad de  $H_2O_2$ , en un solo punto experimental, haciendo un total de 15 réplicas. Los coeficientes de variación fueron del orden de 3-6%, en todos los casos.

En las figuras 6.1 y 6.2 se muestran los porcentajes de reducción de masa para ciruela y espinaca respectivamente. Se muestran los resultados obtenidos con 5 y 10 minutos de irradiación a 30 °C y se incluye el punto a 90°C a efectos de comparación. Para la irradiación a 90 °C se encontró también independencia de la concentración de los analitos.

En todos los gráficos mostrados a continuación, las barras de incertidumbre corresponden a la incertidumbre estadística (de n réplicas) para muestras independientes.

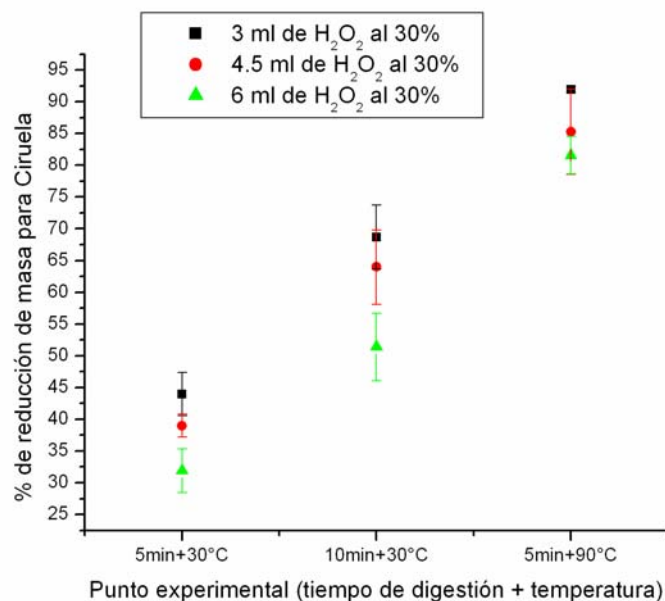


Fig.1: Porcentaje de reducción de masa para ciruela en las diferentes condiciones experimentales.

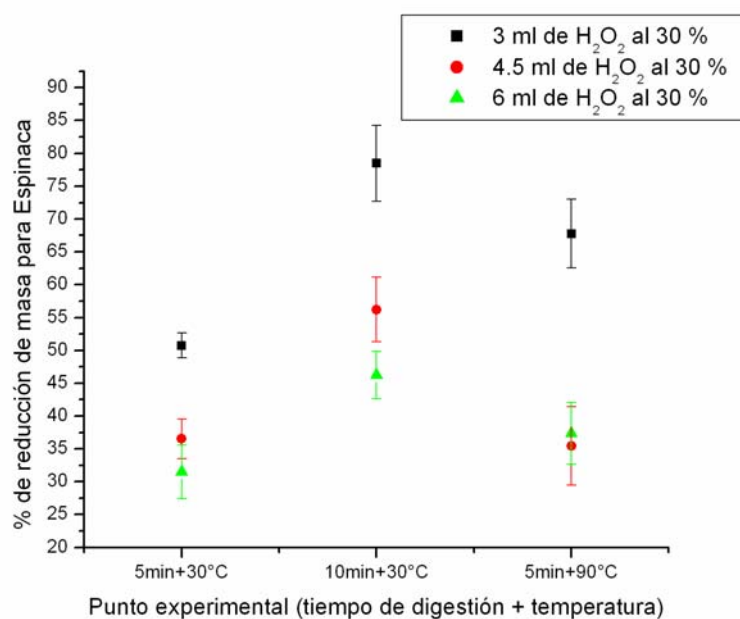


Fig.2: Porcentaje de reducción de masa para espinaca en las diferentes condiciones experimentales.

Como se puede observar en las figuras 6.1 y 6.2, las condiciones óptimas para una mayor reducción de masa se obtienen cuando se digieren 50 mg de muestra en 3 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 10 min de irradiación. Como ya se había visto en el capítulo 2, la reducción de masa es directamente proporcional al tiempo de irradiación. Una óptima digestión con sólo 3 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se explica por el tamaño del área de iluminación del láser, que en este caso es de

2.5x1.5 cm<sup>2</sup>, cubriendo casi totalmente las muestras de 3 mL, ya que éstas se encuentran contenidas en tubos de cuarzo de 1 cm de diámetro, que se van colocando secuencialmente frente al haz.

Aunque se agita la muestra constantemente durante todo el proceso, el tiempo de vida media de los radicales es muy corto ya que son muy activos químicamente, por lo que resulta más eficiente irradiar la mayor área posible de muestra. Ya para 4.5 mL y 6 mL la relación superficie de muestra / área de iluminación se hace mayor, en detrimento de la reducción de masa. Una mayor área de iluminación se puede obtener colocando una lente divergente entre el láser y las muestras, sin embargo en esta configuración la intensidad del láser se reduce, en el mejor de los casos, a un 10% de la intensidad de salida.

En las fotos 6.1, 6.2, 6.3, 6.4 y 6.5 se observan muestras antes y después de ser digeridas con fotólisis UV.



Foto 5.1: Ciruela sin tratamiento.



Foto 5.2: Espinaca sin tratamiento.



Foto 5.3: Ciruela digerida a 90 °C, 5 min 4.5 y 6 mL.



Foto 5.4: Espinaca digerida a 30 °C, 10 min, 3 mL.

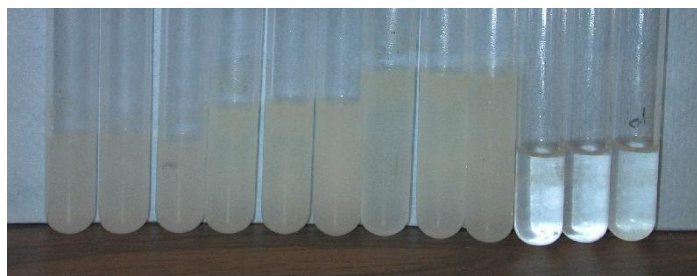


Foto 5.5: Espinaca digerida a 90 °C, 3, 4.5 y 6 mL. Ciruela digerida a 90 °C, 5 min y 3 mL.

El aspecto de las muestras después del tratamiento con fotólisis UV depende de la matriz a digerir y del tipo de tratamiento, como se observa en las fotos 6.3, 6.4 y 6.5. En la mayoría de los casos se obtienen soluciones claras e incoloras. En la foto 6.5, se observa para espinaca, la misma densidad aparente en los tres volúmenes, lo que indica que un aumento en la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no favorece la digestión y si comparamos las fotos 6.4 y 6.5, se observa como los mejores resultados de reducción de masa se obtienen con 10 min a 30 °C, en concordancia con los resultados mostrados en la figura 6.2. En cambio para la ciruela, la digestión es casi completa a 90 °C, para todos los puntos experimentales probados, como se observa en las fotos 6.3 y 6.5, de acuerdo a los resultados de la figura 6.1.

Cuando se compara el punto de 10 min a 30 °C con el punto de 5 min a 90 °C, se observa una dependencia con el tipo de matriz a digerir, por lo que no pueden ser concluyentes los resultados. Para tratar de estudiar esta dependencia en matrices representativas, se realizó la digestión de raíces, tallos, hojas y frutos de una variedad de plantas comestibles. Los resultados se muestran en la figura 6.3, en la que se puede ver que si bien la fotólisis UV a 30 °C es eficaz en la digestión de hojas y frutos, se puede concluir que con la UV a 90 °C por 5 min se obtiene mayor reducción de masa para casi todas las matrices que con la UV a 30 °C por 10 min.

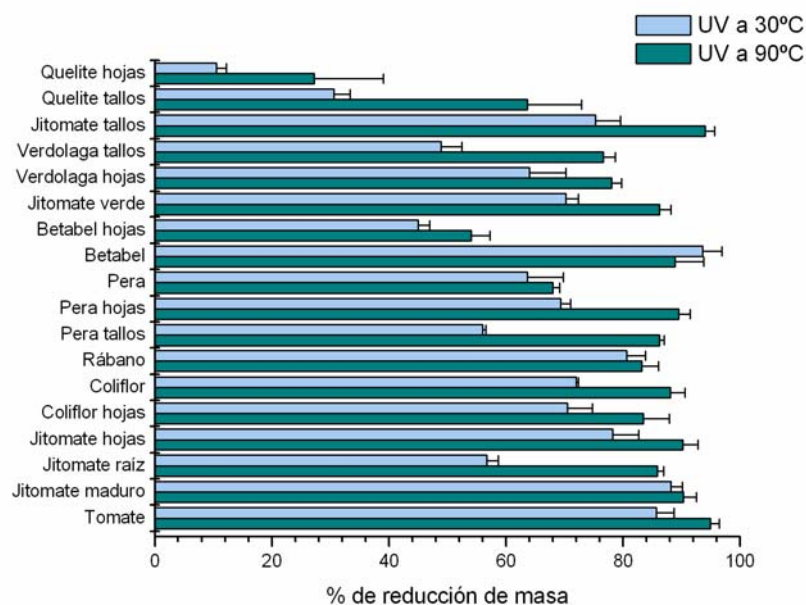


Fig.6.3: Porcentaje de reducción de masa para diferentes matrices.

### 6.1.1 Comparación entre la reducción de masa con UV y cenizas.

Para comparar el nuevo método de digestión con el método convencional de calcinación, se digirieron varias matrices, usando las mejores condiciones encontradas para la reducción de masa. Como se puede ver en la figura 6.4, la fotólisis UV se comporta de manera similar a la descomposición de materia orgánica por calcinación.



Es necesario señalar que para la fotólisis UV la digestión toma de 5-10 minutos mientras que la calcinación consume de 4 a 5 horas, con lo cual cumplimos nuestro objetivo de proponer un método lo suficientemente rápido como para analizar frutas y verduras frescas.

En el anexo II se encuentran los resultados de reducción de masa obtenidos para otras matrices por calcinación.

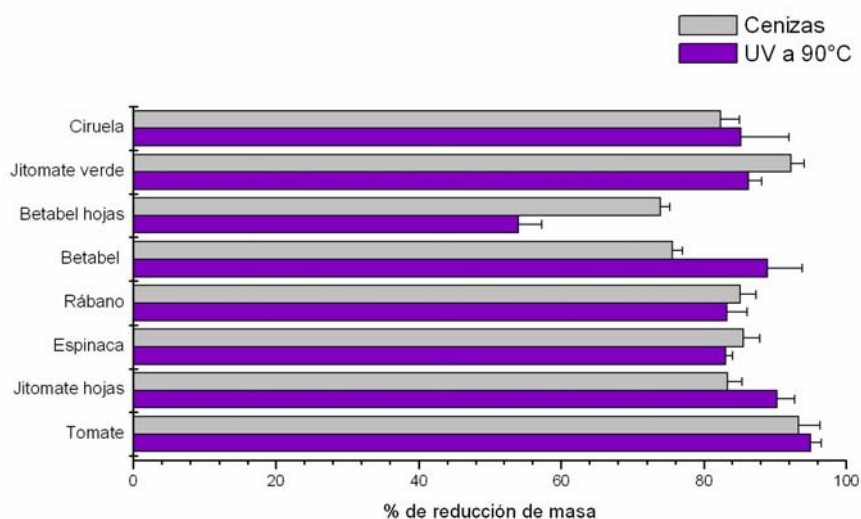


Fig.6.4: Comparación de los porcentajes de reducción de masa para diferentes matrices con dos métodos de digestión fotólisis UV y calcinación.

### 6.1.2 Porcentajes de recuperación después de la fotólisis UV.

Un paso importante para la caracterización del método propuesto, es conocer las pérdidas de algunos elementos de interés durante el proceso de digestión. Con este objetivo, después de la fotólisis UV preparamos blancos delgados (80  $\mu$ L de la solución con Pd que se dejan secar sobre un filtro de teflón) para su posterior análisis con PIXE. La recuperación de cada elemento con 5 y 10 minutos de digestión a 30 °C se muestra en las figuras 6.5 y 6.6 para espinaca y figuras 6.7 y 6.8 para ciruela.

Se encontró que el porcentaje de recuperación para elementos tales como el Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Se, Sr, y Pb varían entre 92 y 100%. Sin embargo elementos como el Cr y Mn muestran una recuperación del 60 y 80%, respectivamente, cuando se digieren con fotólisis UV. Estos porcentajes de recuperación de los elementos, son independientes de los siguientes factores: composición de la matriz, condiciones de la digestión en general y concentración de los analitos.

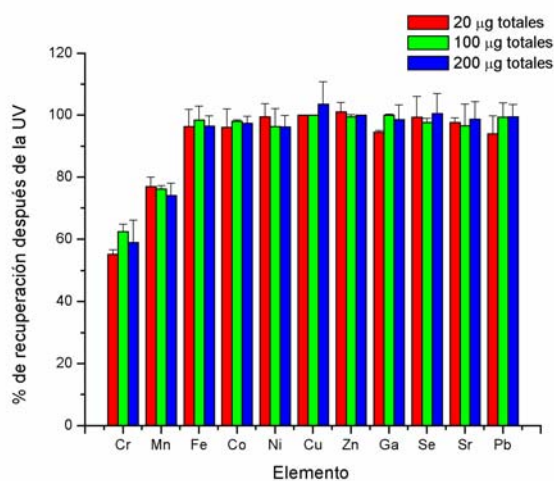


Fig.6.5: Porcentajes de recuperación para espinaca 5 min.

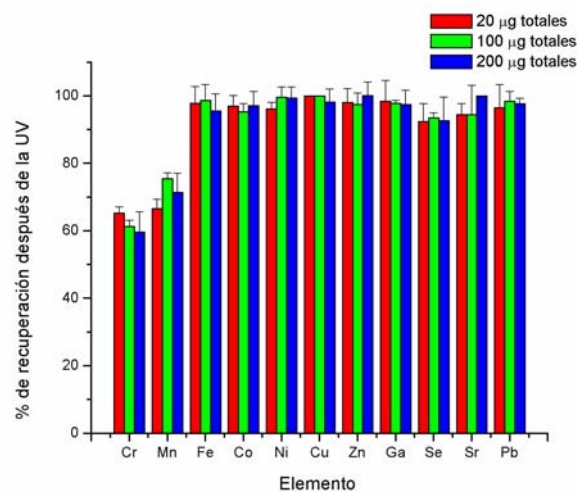


Fig.6.6: Porcentajes de recuperación para espinaca 10 min.

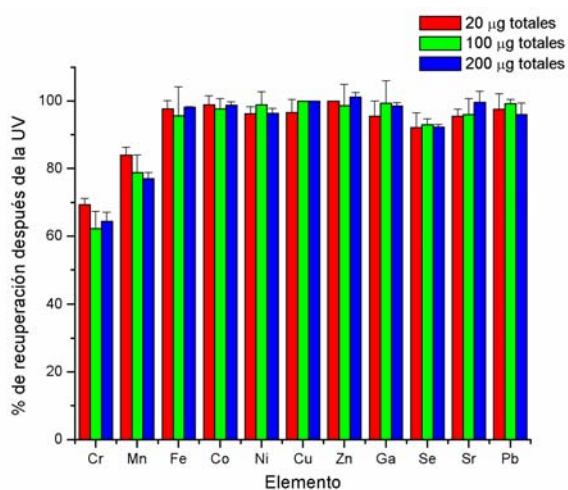


Fig.6.7: Porcentajes de recuperación para ciruela 5 min.

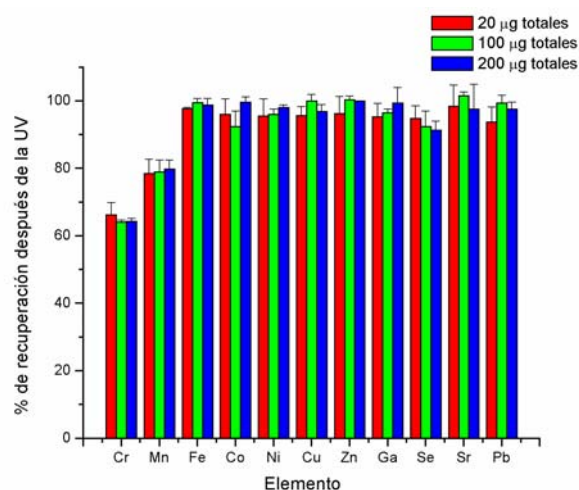


Fig.6.8: Porcentajes de recuperación para ciruela 10 min.

En la figura 6.9 se muestra la recuperación de los elementos cuando la muestra se digiere con fotólisis UV a 90 °C. De manera general no se observan variaciones significativas en la concentración recuperada excepto para Se y Sr que son entre un 2 y un 4% menores que para 30 °C. Estas magnitudes pueden considerarse dentro de la incertidumbre experimental.

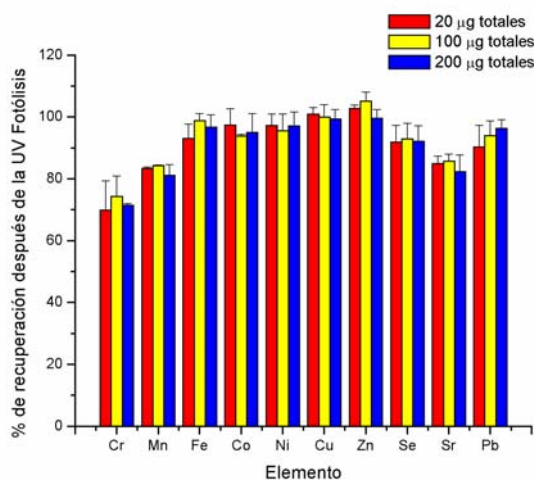


Fig.6.9: Porcentajes de recuperación para espinaca a 90 °C.

Como se puede observar de las gráficas anteriores, sólo se pudo cuantificar con este método a partir de 20 µg totales en la muestra, por lo que los puntos de 0 y 10 µg no se pudieron analizar reproduciblemente. Para convertir a mg/kg, solo hay que dividirlo por los 50 mg de muestra original. Siendo la recuperación de los elementos independiente de los demás factores, podemos decir con base en lo planteado en las pruebas de hipótesis 1 y 2, que se encontraron las mejores condiciones experimentales para la digestión y que el patrón de pérdida de los elementos es siempre el mismo.

### 6.1.3 Porcentajes de recuperación después de la preconcentración. [2]

Con la digestión se logra eliminar gran parte de la materia orgánica para casi todas las matrices estudiadas, pero ahora quedan los metales, en forma de sales inorgánicas, en una solución de aproximadamente 3.0 mL. Por esto se hace necesario un paso de preconcentración para su posterior análisis con PIXE, ya que para lograr gran sensibilidad con el método anteriormente descrito, se necesita evaporar toda la muestra, lo cual se traduce en mayor manipulación de la misma y tiempo.

Con este objetivo se caracterizan dos métodos de preconcentración de los elementos como carbamatos. De esta forma la manipulación de la muestra es mínima y es un procedimiento rápido como ya se explicó en el capítulo 2. Al aplicar los métodos descritos a las muestras se obtienen los porcentajes de recuperación mostrados en la figura 6.10, de donde se observa claramente que el método dos tiene mejor comportamiento para la mayoría de los analitos estudiados. Con este método elementos traza tales como el Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Se y Pb son concentrados como carbamatos y recuperados a un nivel cercano al 100%.

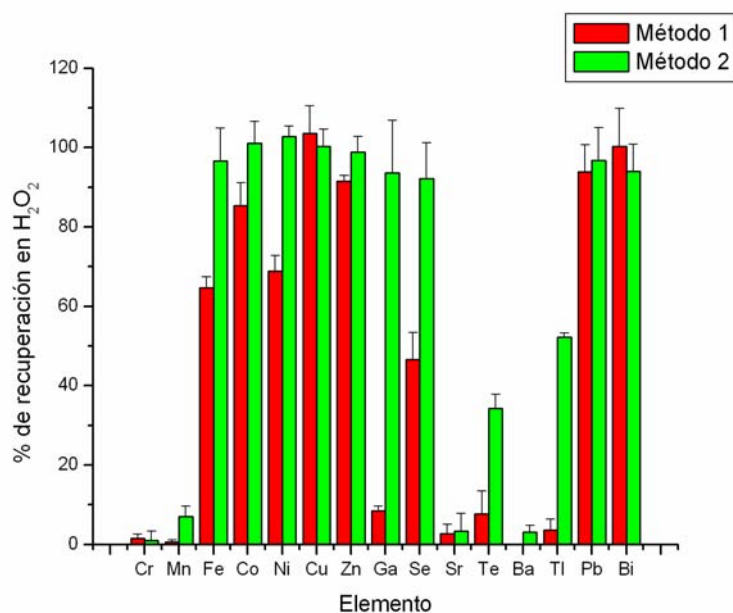


Fig.6.10: Porcentajes de recuperación para los dos métodos caracterizados.

Este método tiene la ventaja adicional de que elimina elementos mayoritarios o menores como el Na, K, Ca y P, lo cual permite realizar la cuantificación de trazas de metales pesados con PIXE con mayor precisión (disminuye el fondo debido a reacciones nucleares). Además, el eliminar estos elementos es muy importante para las muestras que se analizan con AAN, debido a que estos elementos, en especial el Na, al tener una alta sección eficaz de activación, introduce un fondo considerable en los espectros obtenidos con esta técnica. [3]

En las figuras 6.11, 6.12, 6.13, 6.14 y 6.15 se muestran los porcentajes de recuperación para cada elemento después de preconcentrarlos como carbamatos con el método 2 tanto para 30 °C como para 90 °C. Nuevamente se observa independencia de las condiciones experimentales, es decir que el porcentaje de recuperación no depende de la matriz, del tiempo de irradiación, o de la temperatura a la que se efectuó la fotólisis UV, ya que en todos los casos la recuperación es la misma, con sus variaciones dentro de la incertidumbre experimental.

Sin embargo, es importante señalar que los elementos Cr, Mn, Se y Sr no forman carbamatos en las condiciones de aplicación del método 2. Esto se debe fundamentalmente a tres factores: al pH, ya que algunos elementos sólo forman carbamatos a partir de determinado valor; a cambios en el grado de oxidación durante la fotólisis UV y otros elementos que como el Cr, forman mayoritariamente hidróxidos. [2]

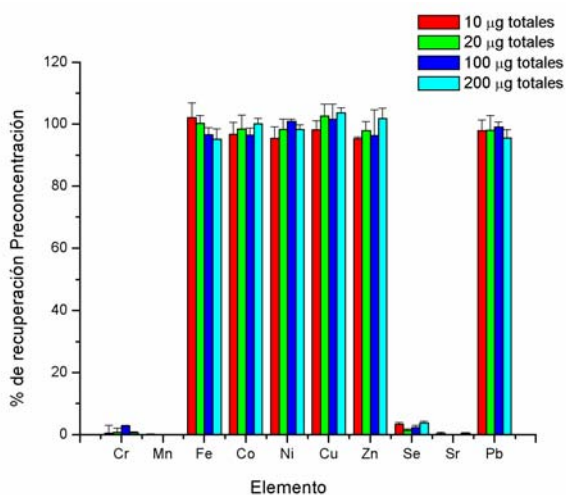


Fig.6.11: Porcentajes de recuperación para espinaca, 5 min de exposición a UV.

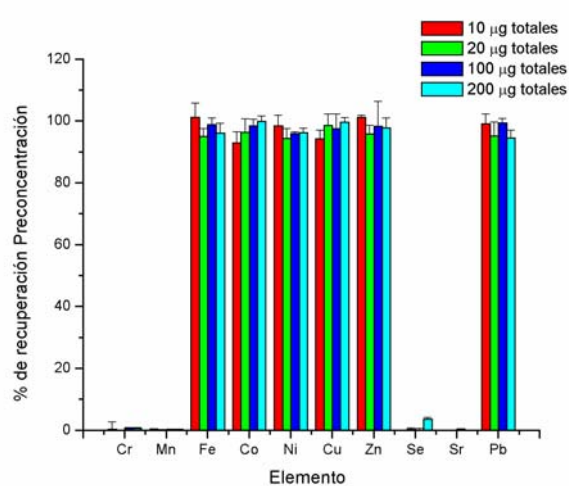


Fig.6.12: Porcentajes de recuperación para espinaca, 10 min de exposición a UV.

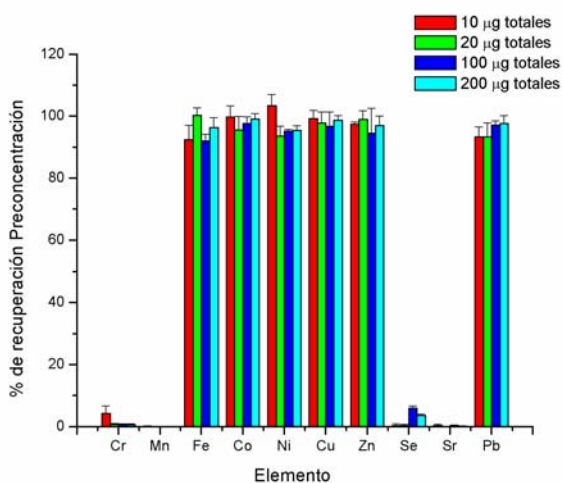


Fig.6.13: Porcentajes de recuperación para ciruela, 5 min de exposición a UV.

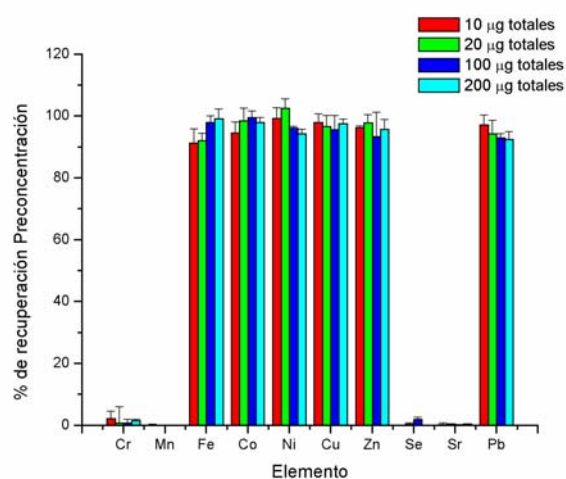


Fig.6.14: Porcentajes de recuperación para ciruela, 10 min de de exposición a UV.

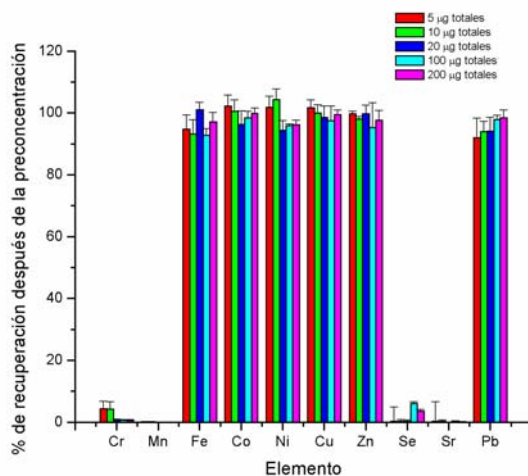


Fig.6.15: Porcentajes de recuperación para espinaca a 90 °C.

#### 6.1.4 Resultados del método optimizado en estándares internacionales.

Para comprobar la validez de la prueba de hipótesis 3, se aplicó el método ya optimizado a la cuantificación de trazas de estándares del NIST de hojas de espinaca y de durazno, por las tres técnicas propuestas. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 1 y 2. Para las concentraciones no detectadas se usó n.d.

Hojas de Espinaca NIST 1570a				
Elemento	Certificado (mg/kg)	Observado PIXE (mg/kg)	Observado AAN (mg/kg)	Observado AA (mg/kg)
Mn	75.9 (3.8)	n.d	n.d	n.d
Co	0.39 (0.02)	0.36 (0.02)	0.4 (0.01)	n.d
Ni	2.14 (0.11)	2.1 (0.1)	n.d	2.16 (0.2)
Cu	12.2 (0.61)	13.2 (0.3)	n.d	12 (0.5)
Zn	82 (4.1)	84 (6)	80 (6)	83 (5)
Se	0.117 (0.01)	n.d	n.d	n.d
Sr	55.6 (2.78)	n.d	n.d	n.d

Tabla 6.1: Porcentaje de recuperación de trazas en hojas de espinaca. Los resultados observados son el promedio de 12 réplicas.

<b>Hojas de Durazno NIST 1547a</b>			
<b>Elemento</b>	<b>Certificado (mg/kg)</b>	<b>Observado PIXE (mg/kg)</b>	<b>Observado AAN (mg/kg)</b>
Cr	1 (0.05)	n.d	1.2 (0.06)
Mn	98 (4.9)	n.d	n.d
Fe	218 (10)	200 (7)	223 (15)
Co	0.07 (0.004)	n.d	0.1 (0.01)
Ni	0.69 (0.03)	0.64 (0.05)	n.d
Cu	3.7 (0.19)	3.7 (0.2)	n.d
Zn	17.9 (0.9)	19 (1)	16.9 (1)
Se	0.12 (0.01)	n.d	n.d
Sr	53 (2.65)	n.d	n.d
Pb	0.87 (0.04)	0.84 (0.05)	n.d

Tabla 6.2: Porcentaje de recuperación de trazas en hojas de durazno. Los resultados observados son el promedio de 12 réplicas.

### **6.1.5 Descripción de la metodología final.**

Finalmente, el método FUV/PIXE quedó definido como una combinación de los siguientes procedimientos secuenciales:

1. Se toman 50 mg de la muestra a analizar, previamente seca y molida.
2. Se irradia por 5 min a 90 °C con el láser UV de 248 nm.
3. La solución resultante se filtra por un filtro de membrana Nuclepore de 0.45 µm previamente pesado, para eliminar la materia orgánica no digerida y determinar la reducción de masa.
4. Si las concentraciones que se requiere cuantificar son muy bajas, se unen varias soluciones hasta completar 150 o 200 mg de muestra original (según los límites de detección y cuantificación reportados).
5. Se preconcentran los metales como carbamatos siguiendo el procedimiento previamente caracterizado.
6. Se cuantifican las trazas con PIXE.

### **6.1.6 Porcentaje de recuperación de los elementos con cenizas.**

Para esta caracterización se usaron 6 réplicas de estándares del NIST de hojas de espinaca, hojas de tomate y hojas de durazno sin y con estándar de 24 elementos. Se degradó la materia orgánica por calcinación y luego las cenizas fueron disueltas en ácido nítrico al 65%. Se aplicó el método 2 para preconcentrar las trazas como carbamatos. El promedio de recuperación con su desviación estándar y su coeficiente de variación para cada elemento,

se muestran en la tabla 3. De ella podemos concluir que para la mayoría de los elementos tiene un comportamiento similar a la FUV/PIXE.

Elemento	% de recuperación.	$\sigma$	CV (%)
Fe	99	1	1.47
Co	95	5	5.11
Ni	95	6	6.73
Cu	95	6	6.43
Zn	56	5	9.47
Pb	96	5	5.29

Tabla 6.3: Porcentaje de recuperación de trazas con cenizas y preconcentración, promediados para tres estándares.

## 6.2 Validación. [4, 5, 6]

### *Precisión del sistema*

La prueba de la precisión con que el GUPIX determina las concentraciones que son posteriormente ajustadas al Pd como estándar interno, se aplicó para una concentración total depositada en un filtro que varió entre  $0.025 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  y  $5.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Esta prueba resultó satisfactoria para concentraciones a partir de  $0.05 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

El primer valor de concentraciones probado ( $0.025 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) resultó tener un CV del orden del 10%, cuando nuestro criterio de aceptación es del 5%. Como se verá más adelante este punto está por debajo de los límites de cuantificación calculados para cada elemento. En las tablas 6.4 a la 6.7 se muestran los promedios de las respuestas del sistema con sus respectivas desviaciones estándar y coeficientes de variación.

Elemento	Respuesta ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	$\sigma$	CV (%)
Fe	0.024	0.002	<b>8.58</b>
Co	0.024	0.002	<b>7.40</b>
Ni	0.024	0.002	<b>8.46</b>
Cu	0.024	0.002	<b>7.19</b>
Zn	0.021	0.002	<b>10.93</b>
Pb	0.024	0.002	<b>7.54</b>

Tabla 6.4: Promedio, desviación estándar y coeficiente de variación (n=6) de la respuesta del sistema para la concentración de  $0.025 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ .



Elemento	Respuesta ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	$\sigma$	CV (%)
Fe	0.051	0.002	4.26
Co	0.051	0.002	4.80
Ni	0.050	0.003	<b>5.30</b>
Cu	0.051	0.002	4.39
Zn	0.048	0.004	<b>7.33</b>
Pb	0.051	0.002	4.64

Tabla 6.5: Promedio, desviación estándar y coeficiente de variación (n=6) de la respuesta del sistema para la concentración de **0.05  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$** .

Elemento	Respuesta ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	$\sigma$	CV (%)
Fe	0.245	0.008	3.11
Co	0.244	0.007	2.83
Ni	0.233	0.011	4.73
Cu	0.249	0.006	2.56
Zn	0.235	0.012	4.97
Pb	0.239	0.008	3.32

Tabla 6.6: Promedio, desviación estándar y coeficiente de variación (n=6) de la respuesta del sistema para la concentración de **0.25  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$**  (Concentración de referencia).

Elemento	Respuesta ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	$\sigma$	CV (%)
Fe	5.02	0.04	0.88
Co	5.04	0.03	0.54
Ni	5.03	0.03	0.60
Cu	5.09	0.06	1.13
Zn	4.93	0.06	1.14
Pb	4.96	0.07	1.43

Tabla 6.7: Promedio, desviación estándar y coeficiente de variación (n=6) de la respuesta del sistema para la concentración de **5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$** .

Aunque la concentración de referencia usada fue de  $0.25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (equivalente a  $5 \text{ mg}/\text{kg}$  en  $50 \text{ mg}$  de muestra digerida), se probó la precisión del sistema en el intervalo presente en las tablas, debido a la variabilidad de concentraciones que presentan las frutas y verduras para los diferentes elementos estudiados. Es pertinente señalar que, en todos los casos estudiados, el análisis involucra la preparación de muestras y la cuantificación con PIXE.

***Linealidad del sistema.***

El sistema es lineal para todos los elementos estudiados en el intervalo de concentraciones de 0.025-20  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Nótese que en este caso se reporta el Se, porque el análisis se hace con un placebo analítico. En la tabla 6.8 se muestran los parámetros fundamentales de la linealidad del sistema.

Todos los  $r^2$  son mayores de 0.98 y los intervalos de confianza para la pendiente no incluyen el cero, que eran los criterios de aceptación para esta prueba. Esto significa que en todos los casos la respuesta del sistema es directamente proporcional a la concentración de cada uno de los analitos. Los modelos matemáticos sólo tienen validez en el intervalo generado, aunque se conoce que para PIXE, el sistema se comporta lineal en un amplio intervalo de concentraciones.

Las curvas de linealidad tanto del sistema como del método y sus parámetros correspondientes se encuentran en el anexo III.

Elemento	$y = mx + b$	$r^2$	Intervalo de confianza de la pendiente ( $\alpha = 0.025$ )	Intervalo de linealidad ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )
Fe	1.016x -0.025	1.000	1.010 - 1.023	0.025 - 20
Co	1.011x -0.023	0.999	1.002 - 1.019	0.025 - 20
Ni	1.008x -0.014	1.000	1.004 - 1.012	0.025 - 20
Cu	1.023x -0.014	1.000	1.016 - 1.029	0.025 - 20
Zn	0.968x -0.022	0.999	0.956 - 0.981	0.025 - 20
Se	0.953x +0.016	0.999	0.945 - 0.962	0.025 - 20
Pb	0.979x -0.009	1.000	0.972 - 0.986	0.025 - 20

Tabla 6.8: Ecuación de la recta ( $y=mx+b$ ), coeficiente de determinación, intervalo de confianza para la pendiente e intervalo de linealidad para los elementos estudiados.

***Exactitud y repetibilidad del método.***

El método es preciso y reproducible según se muestra en las tablas 6.9, 6.10 y 6.11. Los intervalos de confianza para la media poblacional que no incluyen el 100%, son aquéllos de los elementos con mayor variabilidad en la eficiencia de formación de carbamatos y en su estabilidad.

Concentración	0.025 µg/cm <sup>2</sup>			0.05 µg/cm <sup>2</sup>		
Elemento	% de recuperación	σ	CV (%)	% de recuperación	σ	CV (%)
Fe	97	6	6.12	98	3	2.75
Co	96	6	5.60	97	2	2.24
Ni	90	6	6.35	97	3	3.31
Cu	99	6	5.66	98	2	2.43
Zn	91	9	10.26	92	5	5.55
Pb	93	5	5.52	98	3	2.75

Tabla 6.9: Promedio, desviación estándar y coeficiente de variación (n=6) de los porcentajes de recuperación de cada elemento para la concentración de 0.025 µg/cm<sup>2</sup> y 0.05 µg/cm<sup>2</sup>. En negritas los CV>5%.

Concentración	0.25 µg/cm <sup>2</sup>			5 µg/cm <sup>2</sup>		
Elemento	% de recuperación	σ	CV (%)	% de recuperación	σ	CV (%)
Fe	99	3	3.07	98	2	2.48
Co	100	3	2.80	99	2	1.94
Ni	98	3	3.20	99	2	1.55
Cu	101	3	2.55	101	3	2.80
Zn	87	4	4.99	95	1	1.56
Pb	99	3	3.30	96	1	0.58

Tabla 6.10: Promedio, desviación estándar y coeficiente de variación (n=6) de los porcentajes de recuperación de cada elemento para la concentración de 0.25 µg/cm<sup>2</sup> y 0.5 µg/cm<sup>2</sup>.

Elemento	Intervalo de confianza para la media poblacional (α = 0.025)			
	0.025 µg/cm <sup>2</sup>	0.05 µg/cm <sup>2</sup>	0.25 µg/cm <sup>2</sup>	5 µg/cm <sup>2</sup>
Fe	90.8-103.5	95-100.6	95.6-101.9	95.9-101
Co	90.5-102.2	<b>95-99.6</b>	96.8-102.7	96.9-100.9
Ni	83.3-96.4	93.9-100.6	95-101.6	97.4-100.6
Cu	92.8-104.8	95.8-100.8	98-103.4	97.9-103.8
Zn	81.7-100.5	<b>87.1-97.8</b>	<b>82.8-91.9</b>	<b>93.7-96.8</b>
Pb	<b>87.8-99.2</b>	94.8-100.5	95.3-102.1	<b>95.4-96.5</b>

Tabla 6.11: Intervalos de confianza para los promedios de los porcentajes de recuperación de cada elemento, en negritas los que no incluyen el 100%.

**Linealidad del método.**

En la tabla 6.12 se muestran los principales parámetros estudiados en la linealidad del método. Todos los coeficientes de determinación son mayores de 0.98, los intervalos de confianza de la pendiente que no incluyen el 1, son nuevamente los elementos que presentan más variabilidad en la eficiencia de formación de carbamatos. Todos los intervalos para la ordenada al origen incluyen el cero. Algunos coeficientes de variación de regresión sobrepasan el 5%, pero no se considera significativo.

Tanto la preparación de muestras como la cuantificación con PIXE, han demostrado ser viables para el análisis rutinario de metales traza en frutas y verduras.

Elemento	y = mx + b	r <sup>2</sup>	Intervalos de confianza (α = 0.025)		CV <sub>y/x</sub> (%)
			Pendiente	Ordenada al origen	
Fe	1.009x-0.03	0.999	0.996-1.022	-0.114-0.060	<b>7.2</b>
Co	1.001x-0.02	0.999	0.992-1.009	-0.073-0.041	4.7
Ni	0.996x-0.01	1.000	0.99-1.001	-0.049-0.029	3.2
Cu	1.016x-0.02	0.999	1.008-1.024	-0.075-0.034	4.4
Zn	0.940x-0.02	0.999	<b>0.931-0.950</b>	-0.079-0.046	<b>5.5</b>
Pb	0.954x+0.003	1.000	<b>0.952-0.957</b>	-0.014-0.019	1.4

Tabla 6.12: Ecuación de la recta (y=mx+b), coeficiente de determinación, intervalos de confianza para la pendiente y ordenada al origen e intervalo de linealidad para los elementos estudiados. En negritas los intervalos de confianza para la pendiente que no incluyen el 1 y los CV mayores del 5%.

**Estabilidad analítica de la muestra.**

Para evaluar la estabilidad analítica de la muestra, sólo se consideró crítico el tiempo que transcurría desde que se agregaban los reactivos para formar los carbamatos hasta el filtrado de la misma. En este caso, se conocía de la literatura que el reactivo debe ser fresco (preparado el mismo día) y no se requieren condiciones especiales para almacenar la muestra una vez preparada.

En las tablas de la 6.13 a la 6.18 se muestran las diferencias entre las cantidades agregadas (y<sub>0</sub>=100.00 %) y las recuperadas del analito (y<sub>n</sub>), para Fe, Co, Ni, Cu, Zn y Pb, para períodos de tiempo antes de filtrar de 0.5, 1, 3, 8, 12 y 24 horas. Las diferencias en casi ningún caso sobrepasan el 5%, que es nuestro criterio de aceptación, por lo que se puede concluir que la muestra es estable. Esta prueba se realizó a la concentración de referencia de 0.25 µg/cm<sup>2</sup>.

		Tiempo antes de filtrar					
Fe	$y_0$ (%)	0.5 h $y_1$ (%)	1 h $y_2$ (%)	3 h $y_3$ (%)	8 h $y_4$ (%)	12 h $y_5$ (%)	24h $y_6$ (%)
$\bar{y}_n$	100.00	100.24	100.26	99.24	99.68	98.21	98.34
$y_0 - \bar{y}_n$	0	-0.24	-0.26	0.76	0.32	1.79	1.66

Tabla 6.13: Diferencias entre la cantidad agregada y la cantidad recuperada del analito para **Fe**.

		Tiempo antes de filtrar					
Co	$y_0$ (%)	0.5 h $y_1$ (%)	1 h $y_2$ (%)	3 h $y_3$ (%)	8 h $y_4$ (%)	12 h $y_5$ (%)	24h $y_6$ (%)
$\bar{y}_n$	100.00	97.13	99.95	97.11	96.79	100.14	99.79
$y_0 - \bar{y}_n$	0	2.87	0.05	2.89	3.21	-0.14	0.21

Tabla 6.14: Diferencias entre la cantidad agregada y la cantidad recuperada del analito para **Co**.

		Tiempo antes de filtrar					
Ni	$y_0$ (%)	0.5 h $y_1$ (%)	1 h $y_2$ (%)	3 h $y_3$ (%)	8 h $y_4$ (%)	12 h $y_5$ (%)	24h $y_6$ (%)
$\bar{y}_n$	100.00	95.58	98.77	98.56	102.04	97.21	97.18
$y_0 - \bar{y}_n$	0	4.42	1.23	1.44	-2.04	2.79	2.82

Tabla 6.15: Diferencias entre la cantidad agregada y la cantidad recuperada del analito para **Ni**.

		Tiempo antes de filtrar					
Cu	$y_0$ (%)	0.5 h $y_1$ (%)	1 h $y_2$ (%)	3 h $y_3$ (%)	8 h $y_4$ (%)	12 h $y_5$ (%)	24h $y_6$ (%)
$\bar{y}_n$	100.00	100.83	101.02	100.49	98.30	100.35	101.27
$y_0 - \bar{y}_n$	0	-0.83	-1.02	-0.49	1.70	-0.35	-1.27

Tabla 6.16: Diferencias entre la cantidad agregada y la cantidad recuperada del analito para **Cu**.

		Tiempo antes de filtrar					
<b>Zn</b>	$y_0$ (%)	0.5 h $y_1$ (%)	1 h $y_2$ (%)	3 h $y_3$ (%)	8 h $y_4$ (%)	12 h $y_5$ (%)	24h $y_6$ (%)
$\bar{y}_n$	100.00	94.25	97.39	93.96	97.63	95.20	95.11
$y_0 - \bar{y}_n$	0	<b>5.75</b>	2.61	<b>6.04</b>	2.37	4.80	4.89

Tabla 6.17: Diferencias entre la cantidad agregada y la cantidad recuperada del analito para **Zn**. En negritas las diferencias que sobrepasan el 5%.

		Tiempo antes de filtrar					
<b>Pb</b>	$y_0$ (%)	0.5 h $y_1$ (%)	1 h $y_2$ (%)	3 h $y_3$ (%)	8 h $y_4$ (%)	12 h $y_5$ (%)	24h $y_6$ (%)
$\bar{y}_n$	100.00	95.89	97.28	95.79	94.15	93.29	96.17
$y_0 - \bar{y}_n$	0	4.11	2.72	4.21	<b>5.85</b>	<b>6.71</b>	3.83

Tabla 6.18: Diferencias entre la cantidad agregada y la cantidad recuperada del analito para **Pb**. En negritas las diferencias que sobrepasan el 5%.

**Sensibilidad.**

Los límites de detección y cuantificación se muestran en la tabla 6.19 y se calcularon con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión. Con esta metodología de preparación de muestras logramos bajar, para la mayoría de los casos, los límites de detección 5 veces, o sea a 0.2 mg/kg en 50 mg de muestra digerida, tomando como referencia 1 mg/kg para muestras biológicas, que es el límite de detección reportado en la literatura.

Elemento	Límite de detección ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Límite de cuantificación ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )
Fe	0.012	0.036
Co	0.013	0.040
Ni	0.014	0.041
Cu	0.014	0.042
Zn	0.018	0.055
Se	0.015	0.044
Pb	0.016	0.048

Tabla 6.19: Límites de detección y cuantificación.

**Robustez.**

Para evaluar la robustez, sólo se consideraron críticas las variaciones en el pH de la muestra en el momento de agregar los reactivos para formar los carbamatos. El intervalo de pH del método está entre 3.5 y 4. Se amplió un poco más para esta prueba, con el objetivo de considerar pequeñas modificaciones en esta magnitud debidas a errores instrumentales o de manipulación.

En las tablas de la 6.20 a la 6.25 se muestran las diferencias entre las cantidades agregadas ( $y_0=100.00\%$ ) y las recuperadas del analito ( $y_n$ ), para Fe, Co, Ni, Cu, Zn y Pb, a distintos pH (entre 3.0 y 4.5). Nuevamente se observa que en casi ningún caso sobrepasan el 5%, que es nuestro criterio de aceptación, por lo que se puede concluir que la muestra es robusta a pequeñas variaciones del pH. Esta prueba se realizó a la concentración de referencia de  $0.25\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

		pH de la muestra				
<b>Fe</b>	$y_0$ (%)	3.0 $y_1$ (%)	3.5 $y_2$ (%)	3.7 $y_3$ (%)	4.0 $y_4$ (%)	4.5 $y_5$ (%)
$\bar{y}_n$	100.00	98.37	99.40	98.48	96.80	99.18
$y_0 - \bar{y}_n$	0	1.63	0.60	1.52	3.20	0.82

Tabla 6.20: Diferencias entre la cantidad agregada y la cantidad recuperada del analito para Fe a diferente pH.

		pH de la muestra				
<b>Co</b>	$y_0$ (%)	3.0 $y_1$ (%)	3.5 $y_2$ (%)	3.7 $y_3$ (%)	4.0 $y_4$ (%)	4.5 $y_5$ (%)
$\bar{y}_n$	100.00	98.19	100.27	99.03	100.39	99.24
$y_0 - \bar{y}_n$	0	1.81	-0.27	0.97	-0.39	0.76

Tabla 6.21: Diferencias entre la cantidad agregada y la cantidad recuperada del analito para Co a diferente pH.

		pH de la muestra				
<b>Ni</b>	$y_0$ (%)	3.0 $y_1$ (%)	3.5 $y_2$ (%)	3.7 $y_3$ (%)	4.0 $y_4$ (%)	4.5 $y_5$ (%)
$\bar{y}_n$	100.00	97.67	97.22	95.66	100.48	93.98
$y_0 - \bar{y}_n$	0	2.33	2.78	4.34	-0.48	<b>6.02</b>

Tabla 6.22: Diferencias entre la cantidad agregada y la cantidad recuperada del analito para Ni a diferente pH. En negritas las diferencias que sobrepasan el 5%.

		pH de la muestra				
<b>Cu</b>	$y_0$ (%)	3.0 $y_1$ (%)	3.5 $y_2$ (%)	3.7 $y_3$ (%)	4.0 $y_4$ (%)	4.5 $y_5$ (%)
$\bar{y}_n$	100.00	102.40	102.71	101.20	101.32	100.23
$y_0 - \bar{y}_n$	0	-2.40	-2.71	-1.20	-1.32	-0.23

Tabla 6.23: Diferencias entre la cantidad agregada y la cantidad recuperada del analito para Cu a diferente pH.

		pH de la muestra				
<b>Zn</b>	$y_0$ (%)	3.0 $y_1$ (%)	3.5 $y_2$ (%)	3.7 $y_3$ (%)	4.0 $y_4$ (%)	4.5 $y_5$ (%)
$\bar{y}_n$	100.00	97.37	94.70	96.20	95.43	95.16
$y_0 - \bar{y}_n$	0	2.63	<b>5.30</b>	3.80	4.57	4.84

Tabla 6.24: Diferencias entre la cantidad agregada y la cantidad recuperada del analito para Zn a diferente pH. En negritas las diferencias que sobrepasan el 5%.

		pH de la muestra				
<b>Pb</b>	$y_0$ (%)	3.0 $y_1$ (%)	3.5 $y_2$ (%)	3.7 $y_3$ (%)	4.0 $y_4$ (%)	4.5 $y_5$ (%)
$\bar{y}_n$	100.00	95.17	96.45	96.17	95.36	95.03
$y_0 - \bar{y}_n$	0	4.83	3.55	3.83	4.64	4.97

Tabla 6.25: Diferencias entre la cantidad agregada y la cantidad recuperada del analito para Pb a diferente pH.

### 6.3 Análisis de metales traza en suelos y plantas de dos zonas cercanas a la Ciudad de México irrigadas con aguas residuales.

#### 6.3.1 Estudio de suelos.

Para tener un estudio completo de las zonas de interés, se colectaron en cada una los suelos superficiales donde estaban creciendo las plantas estudiadas. Las muestras se prepararon de manera convencional, secando, moliendo y haciendo pastillas para su posterior análisis con PIXE (ver capítulo 2). Para los suelos no es necesario un paso de preconcentración debido a que los elementos de interés están presentes en concentraciones cuantificables. La calibración del sistema se realizó utilizando un estándar de suelo IAEA-SOIL-7 y sedimento



lacustre IAEA-SL-1. Una comparación entre los valores certificados y los obtenidos con PIXE para la concentración de los elementos de interés en sedimento lacustre Buffalo River NIST 1547 se muestra en la figura 6.16.

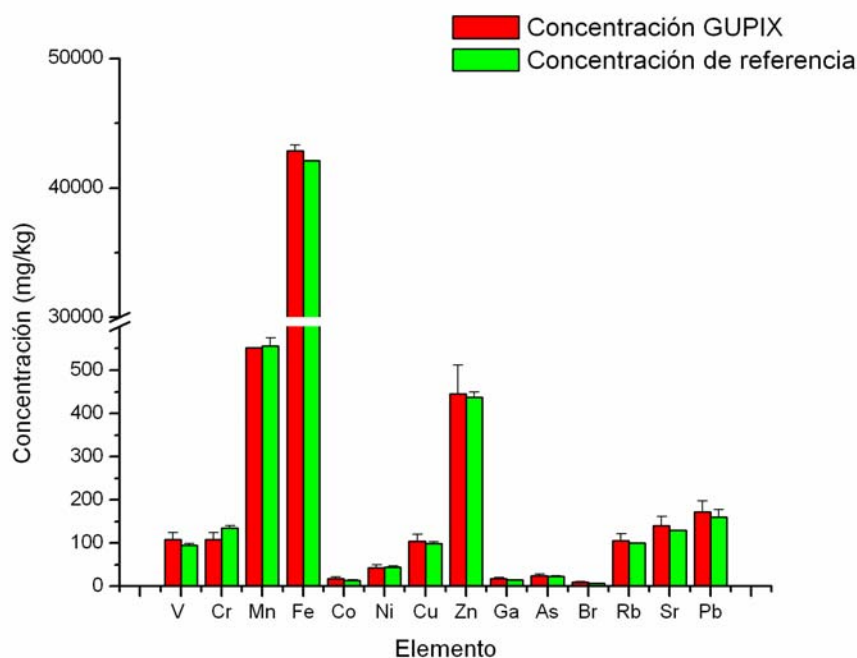


Fig.6.16: Comparación de las concentraciones obtenidas con PIXE y las certificadas, para 5 espectros.

Los resultados obtenidos para los suelos se muestran en las figuras 6.17, 6.18 y 6.19. Para los dos primeros, los resultados son el promedio de 5 réplicas y el tercero es un promedio de todos los suelos colectados en cada zona. En los suelos del Valle del Mezquital, las concentraciones de Cr, Co y Cu exceden los niveles considerados como potencialmente peligrosos, mientras que la concentración de otros elementos como Ni, Zn y Pb está cercana a estos valores. Nótese que las concentraciones de los suelos irrigados por 50 y 100 años son muy similares, lo que sugiere que en este último período de 50 años se originaron niveles más altos de contaminación.

Para los suelos de Tláhuac, la situación es más crítica en cuanto a los niveles de Pb, que exceden los niveles considerados como potencialmente peligrosos junto con el Cr, Co y Cu.

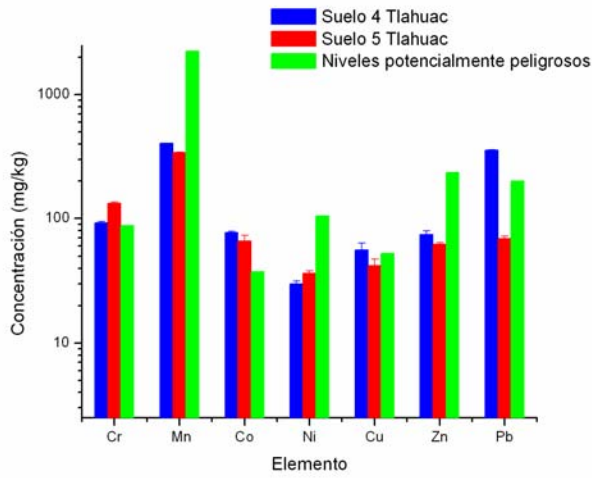


Fig.6.17: Niveles máximos encontrados en suelos de Tlahuac.

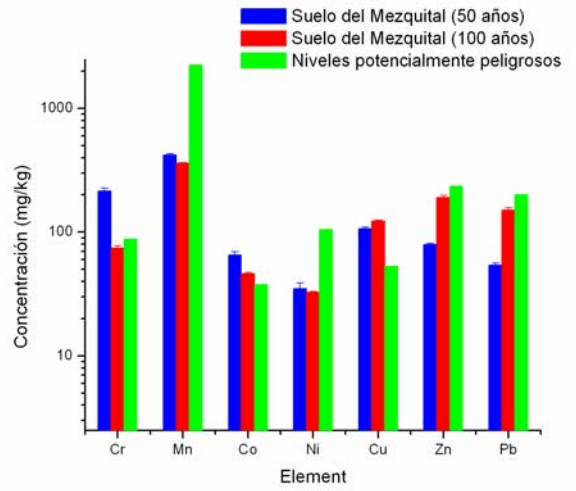


Fig.6.18: Comparación entre suelos irrigados por 50 y 100 años en el VM.

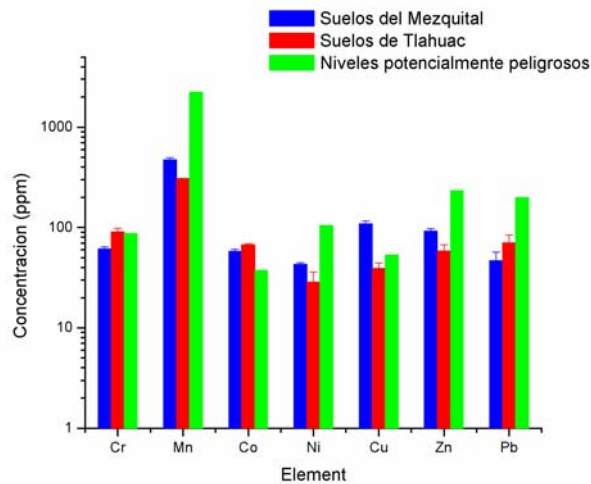


Fig.6.19: Comparación entre las concentraciones promedio de 8 suelos de Tlahuac y el Mezquital.

### 6.3.2 Estudio de plantas. [7]

Los elementos traza en plantas y su función metabólica se pueden caracterizar de acuerdo a los siguientes procesos:

1. Absorción y transporte dentro de la planta.
2. Procesos enzimáticos
3. Concentración y formas en que ocurre.
4. Deficiencia y toxicidad.
5. Competencia iónica e interacción.

Estos procesos están bien estudiados para algunos elementos traza y para otros se requiere más investigación. La reacción de la planta ante el estrés químico causado tanto por la deficiencia como por el exceso de elementos traza no está bien definida, debido a que las plantas han desarrollado mecanismos bioquímicos durante su desarrollo y evolución, que les permiten adaptarse y tolerar los cambios químicos del medio ambiente.

Las plantas revelan varias tendencias en la absorción de elementos traza. Tres características generales pueden distinguirse: acumulación, indicación y exclusión. Estas dependen en gran medida de las habilidades específicas de cada planta y difieren mucho de especie en especie.

Con el análisis cuantitativo de elementos traza en plantas, propusimos estudiar la distribución de varios metales en diferentes partes de plantas de frutas y vegetales. Además de probar las potencialidades analíticas del nuevo método propuesto, ahora aplicado a estudios de campo. Entre las frutas y verduras analizadas se encuentran quelite, membrillo, calabaza, calabacita, jitomate, ciruela, lechuga, espinaca, nopal, alfalfa, etc. También se debe tener en cuenta que algunos de estos productos se emplean en la alimentación animal. Los nombres científicos de las plantas estudiadas se encuentran en el anexo IV.

En este estudio se determinaron las concentraciones y en algunos casos la distribución en diferentes partes de la planta, de algunos elementos traza. Los resultados en mg/kg para masa seca están resumidos en las figuras 6.20 – 6.25 y en las tablas 6.28 – 6.33. Para el caso de las figuras, se incluye la comparación con los niveles tóxicos reportados en la literatura para plantas [18] y se hizo una selección para ilustrar plantas con concentraciones reportadas como normales y plantas con niveles de Cu, considerados tóxicos para las plantas.

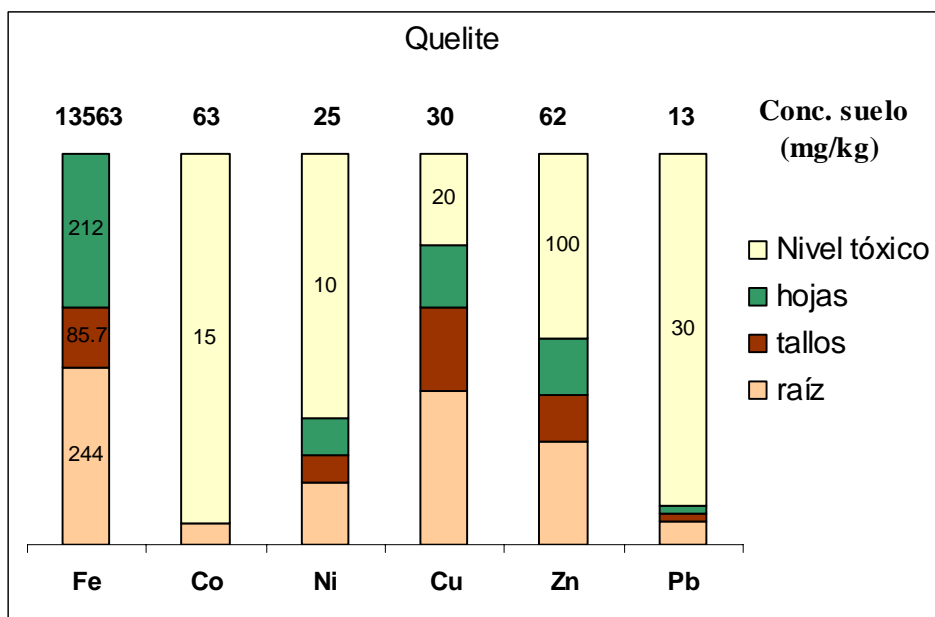


Fig.6.20: Concentraciones en plantas de quelite cultivadas en Tláhuac. Para la raíz y los tallos los niveles de Cu sobrepasan los considerados tóxicos.

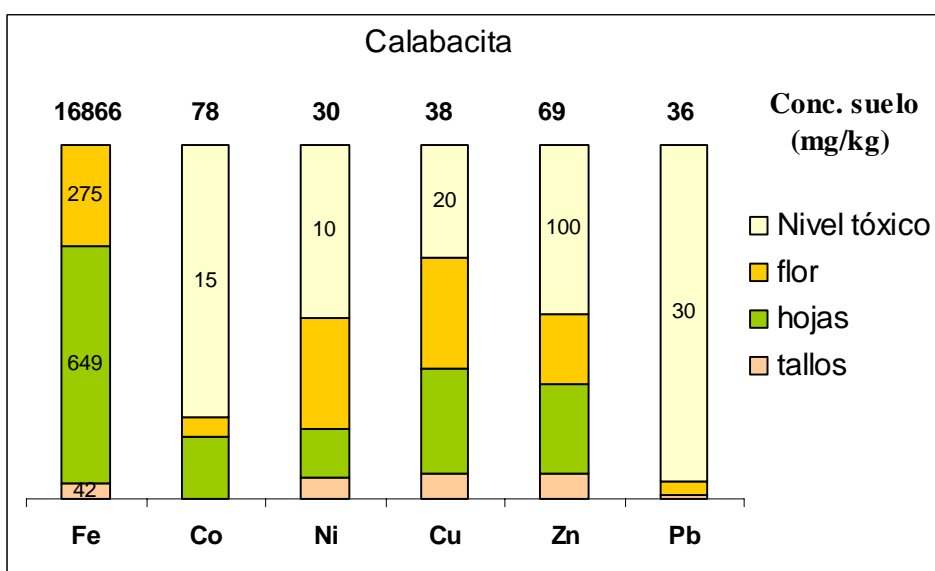


Fig.6.21: Concentraciones en plantas de calabacita cultivadas en Tláhuac. Para la flor y las hojas los niveles de Cu sobrepasan los considerados tóxicos.

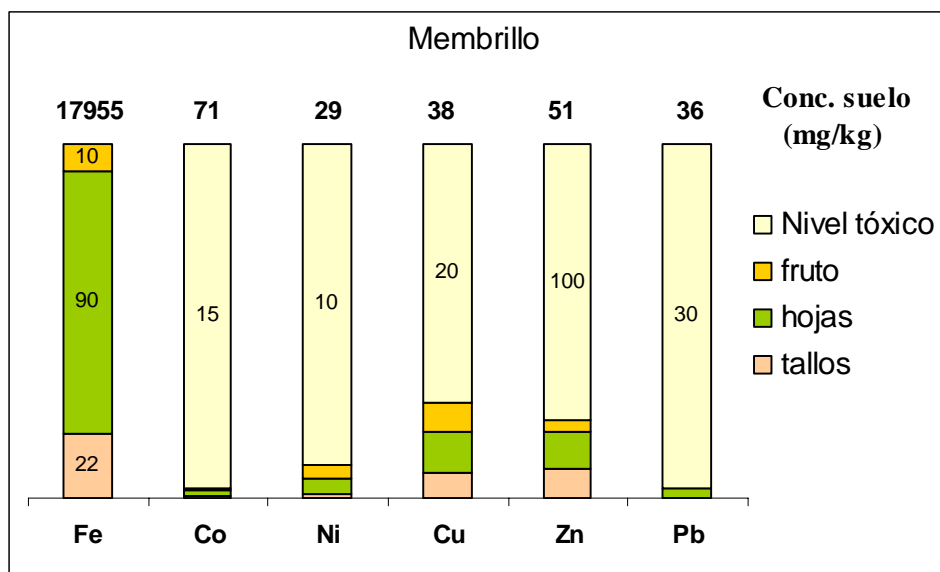


Fig.6.22: Concentraciones en plantas de membrillo cultivadas en Tláhuac.

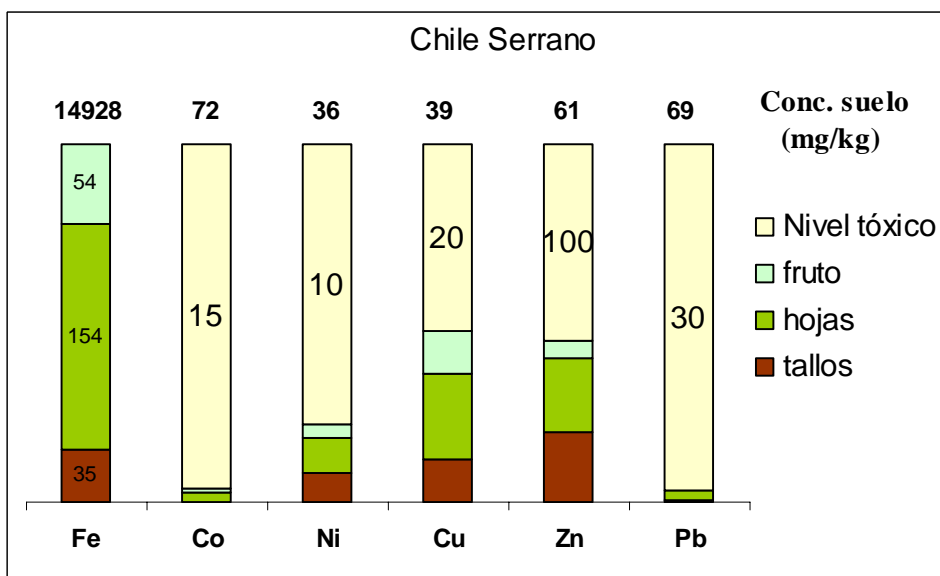


Fig.6.23: Concentraciones en plantas de chile serrano cultivadas en Tláhuac.

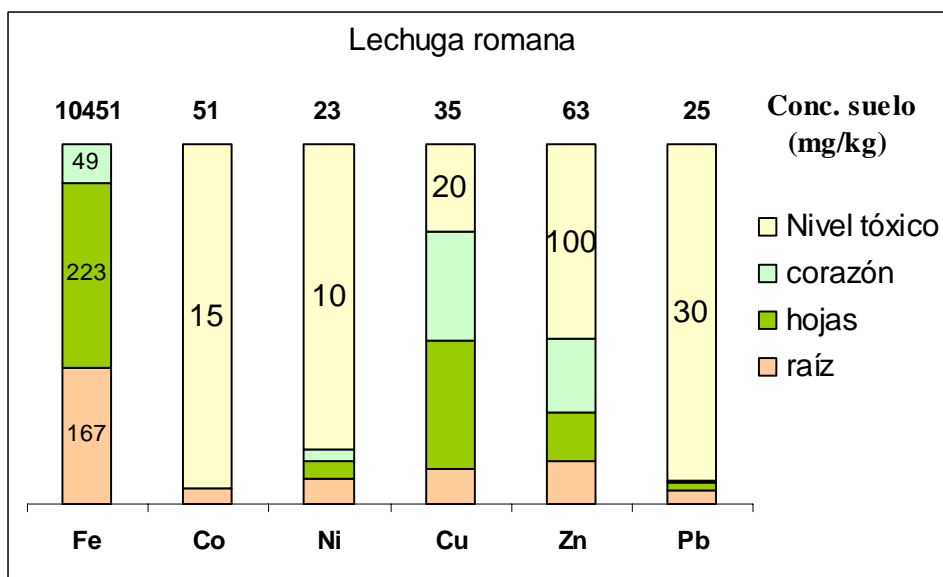


Fig.6.24: Concentraciones en plantas de lechuga romana cultivadas en Tláhuac. Para las hojas y el corazón los niveles de Cu sobrepasan los considerados tóxicos.

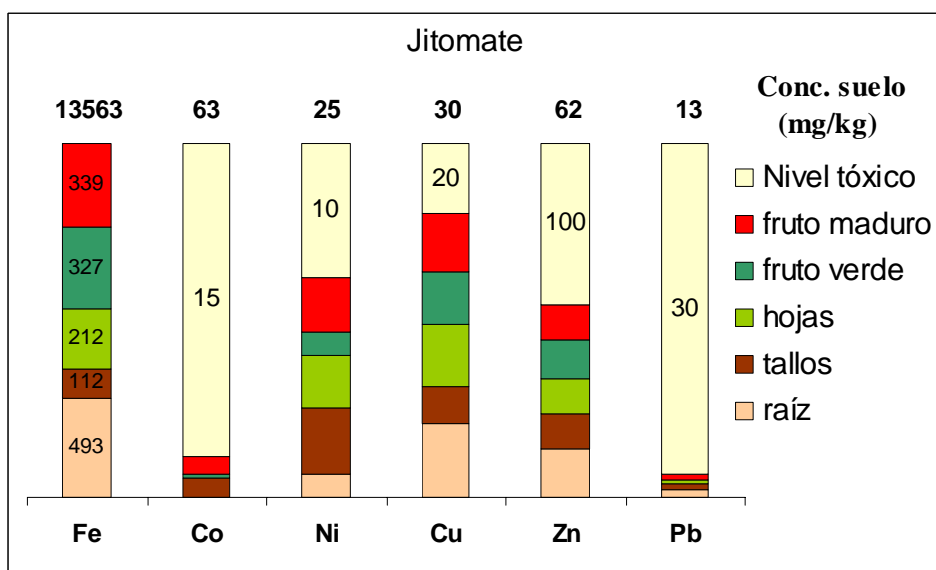


Fig.6.25: Concentraciones en plantas de jitomate cultivadas en Tláhuac. Para las hojas, la raíz y el fruto maduro los niveles de Cu sobrepasan los considerados tóxicos.

En las tablas 6.26 – 6.33 se muestran las concentraciones para Fe, Co, Ni, Cu, Zn y Pb de todas las plantas analizadas, tanto con el método FUV/PIXE como con calcinación y preconcentración. Las tablas están clasificadas por el suelo donde se colectaron las diferentes plantas estudiadas. En total se estudiaron 8 sitios (suelos 1-8). En cada caso, las

concentraciones en las plantas fueron comparadas con el análisis de muestras del suelo superficial donde se encontraban creciendo. La desviación estándar (n=8) está incluida en las concentraciones reportadas para los suelos. Los números en negritas, corresponden a valores obtenidos con el método de calcinación + preconcentración.

<b>Planta</b>	<b>Parte</b>	<b>Fe</b>	<b>Co</b>	<b>Ni</b>	<b>Cu</b>	<b>Zn</b>	<b>Pb</b>
	Suelo 1	14000 (1000)	63 (6)	25 (1)	30 (3)	62 (5)	12.8 (0.7)
Quelite	raíz	<b>240 (10)</b>	<b>0.81 (0.04)</b>	<b>2.30 (0.1)</b>	<b>31 (2)</b>	<b>31 (2)</b>	<b>1.9 (0.1)</b>
	tallos	85 (4)	0	0.98 (0.05)	18 (1)	25 (1)	0.75 (0.04)
	hojas	210 (10)	0	1.43 (0.07)	13.8 (0.7)	31 (2)	0.57 (0.03)
Tomate	fruto	127 (6)	0.69 (0.03)	4.20 (0.2)	18 (1)	19 (1)	0.44 (0.02)
Jitomate	fruto m	330 (20)	0.91 (0.05)	4.1 (0.2)	16 (1)	22 (1)	0.54 (0.03)
	fruto v	330 (20)	0.20 (0.01)	1.77 (0.09)	14.8 (0.7)	24 (1)	0
	raíz	400 (20)	0	1.73 (0.09)	21 (1)	30 (2)	0.79 (0.04)
	tallos	110 (5)	0.89 (0.04)	4.9 (0.2)	10.6 (0.5)	21 (1)	0.45 (0.02)
	hojas	240 (10)	0	3.9 (0.2)	17 (1)	22 (1)	0.29 (0.01)

Tabla 6.26: Concentración de elementos traza en Quelite, Tomate y Jitomate cultivados en el suelo 1 de Tláhuac (en mg/kg).

<b>Planta</b>	<b>Parte</b>	<b>Fe</b>	<b>Co</b>	<b>Ni</b>	<b>Cu</b>	<b>Zn</b>	<b>Pb</b>
	Suelo 2	17000 (1000)	78 (5)	305 (2)	38 (1)	69 (5)	37 (2)
Calabaza g.	tallos	<b>85 (4)</b>	<b>0.08 (0.004)</b>	<b>0.82 (0.04)</b>	<b>4.6 (0.2)</b>	<b>14 (1)</b>	<b>0.36 (0.02)</b>
Calabacita	tallos	<b>40 (2)</b>	<b>0.04 (0.002)</b>	<b>1.22 (0.06)</b>	<b>4.2 (0.2)</b>	<b>8 (0.4)</b>	<b>0.33 (0.02)</b>
	hojas	<b>640 (30)</b>	<b>3.20 (0.16)</b>	<b>2.60 (0.13)</b>	<b>17 (1)</b>	<b>30 (1)</b>	<b>0</b>
	flor	<b>270 (10)</b>	<b>1.03 (0.05)</b>	<b>6.1 (0.3)</b>	<b>18 (1)</b>	<b>24 (1)</b>	<b>1.18 (0.06)</b>

Tabla 6.27: Concentración de elementos traza en Calabaza guía y Calabacita cultivadas en el suelo 2 de Tláhuac (en mg/kg).

<b>Planta</b>	<b>Parte</b>	<b>Fe</b>	<b>Co</b>	<b>Ni</b>	<b>Cu</b>	<b>Zn</b>	<b>Pb</b>
	Suelo 3	18000 (2000)	71 (3)	29 (2)	38 (4)	51 (2)	36 (1)
Nopal	fruto	<b>33 (1)</b>	<b>0.11 (0.01)</b>	<b>1.6 (0.08)</b>	<b>3.8 (0.2)</b>	<b>16.2 (0.8)</b>	<b>0.05 (0.003)</b>
	hojas	48 (2)	0.76 (0.04)	0.59 (0.03)	12.1 (0.6)	31 (2)	0.77 (0.04)
Membrillo	tallos	<b>21 (1)</b>	<b>0.09 (0.005)</b>	<b>0.1 (0.01)</b>	<b>1.8 (0.1)</b>	<b>5.8 (0.3)</b>	<b>0.07 (0.004)</b>
	hojas	<b>88 (4)</b>	<b>0.24 (0.01)</b>	<b>0.48 (0.02)</b>	<b>2.9 (0.1)</b>	<b>7.4 (0.4)</b>	<b>0.68 (0.03)</b>
	fruto	<b>33 (1)</b>	<b>0.04 (0.002)</b>	<b>0.39 (0.02)</b>	<b>2.2 (0.1)</b>	<b>2.5 (0.1)</b>	<b>0.13 (0.01)</b>

Tabla 6.28: Concentración de elementos traza en Nopal y Membrillo cultivados en el suelo 3 de Tláhuac (en mg/kg).

Planta	Parte	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Pb
	Suelo 4		15000 (1000)	76 (4)	32 (3)	34 (1)	64 (6)
Romero	hojas	<b>63 (3)</b>	<b>0</b>	<b>3.2 (0.2)</b>	<b>15 (1)</b>	<b>24 (1)</b>	<b>0.33 (0.02)</b>
	raíz	<b>58 (2)</b>	<b>0.43 (0.02)</b>	<b>1.5 (0.1)</b>	<b>13 (1)</b>	<b>12 (1)</b>	<b>0</b>
Acelga	tallos	<b>21 (1)</b>	<b>0</b>	<b>0.1 (0.007)</b>	<b>5.1 (0.3)</b>	<b>8.5 (0.4)</b>	<b>0.12 (0.01)</b>
	hojas	130 (6)	2.4 (0.1)	2.7 (0.1)	48 (2)	55 (3)	0
Pera	tallos	115 (5)	1.7 (0.1)	2.2 (0.1)	16 (1)	24 (1)	0.94 (0.05)
	hojas	150 (7)	0.7 (0.04)	1.2 (0.1)	13 (1)	33 (2)	0.13 (0.01)
	fruto	77 (3)	1.34 (0.07)	1.2 (0.1)	16 (1)	29 (1)	1.47 (0.07)

Tabla 6.29: Concentración de elementos traza Romero, Acelga y Peras cultivadas en el suelo 4 de Tláhuac (en mg/kg).

Planta	Parte	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Pb
	Suelo 5		15000 (1000)	72 (6)	37 (3)	39 (2)	61 (2)
Chiles	fruto	<b>34 (1)</b>	<b>0.04 (0.002)</b>	<b>0.96 (0.05)</b>	<b>4.4 (0.2)</b>	<b>20 (1)</b>	<b>0.12 (0.01)</b>
	hojas	<b>152 (7)</b>	<b>0.38 (0.02)</b>	<b>1.21 (0.06)</b>	<b>8.7 (0.4)</b>	<b>21 (1)</b>	<b>0.82 (0.04)</b>
	tallos	<b>53 (2)</b>	<b>0.11 (0.01)</b>	<b>0.47 (0.02)</b>	<b>4.4 (0.2)</b>	<b>5.2 (0.3)</b>	<b>0.07 (0.004)</b>
Verdolaga	raíz	<b>128 (6)</b>	<b>0.49 (0.02)</b>	<b>4.1 (0.2)</b>	<b>20 (1)</b>	<b>31 (2)</b>	<b>0.94 (0.05)</b>
	hojas	152 (7)	1.22 (0.06)	3.8 (0.2)	10.5 (0.5)	26 (1)	0.6 (0.03)
	tallos	90 (4)	1.67 (0.08)	1.6 (0.08)	7.4 (0.4)	25 (1)	0.18 (0.01)
Coliflor	hojas	127 (6)	0	2.3 (0.1)	26 (1)	20 (1)	1.18 (0.06)
	corazón	116 (5)	0	1 (0.05)	12.4 (0.6)	17 (1)	0.21 (0.01)

Tabla 6.30: Concentración de elementos traza en Chiles, Verdolaga y Coliflor cultivados en el suelo 5 de Tláhuac (en mg/kg).

Planta	Parte	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Pb
	Suelo 6		13600 (800)	76 (6)	28 (3)	37 (1)	53 (2)
Cilantro	hojas	<b>63 (3)</b>	<b>0</b>	<b>0.16 (0.01)</b>	<b>5.9 (0.3)</b>	<b>20 (1)</b>	<b>0.46 (0.02)</b>
	raíz	<b>161 (8)</b>	<b>0.49 (0.02)</b>	<b>0.73 (0.04)</b>	<b>9.2 (0.5)</b>	<b>13 (1)</b>	<b>0.47 (0.02)</b>
Espinaca	raíz	<b>270 (10)</b>	<b>0.61 (0.03)</b>	<b>2.8 (0.1)</b>	<b>11 (0.6)</b>	<b>28 (1)</b>	<b>1.62 (0.08)</b>
	hojas	240 (10)	0	1.12 (0.06)	5.5 (0.3)	25 (1)	0
Hierbabuena	tallos	<b>79 (3)</b>	<b>0.04 (0.002)</b>	<b>0.32 (0.02)</b>	<b>4.9 (0.2)</b>	<b>17 (1)</b>	<b>0.44 (0.02)</b>
	hojas	<b>170 (8)</b>	<b>1.02 (0.05)</b>	<b>0.68 (0.03)</b>	<b>11.5 (0.6)</b>	<b>23 (1)</b>	<b>0.76 (0.04)</b>

Tabla 6.31: Concentración de elementos traza en Cilantro, Espinaca y Hierbabuena cultivadas en el suelo 6 de Tláhuac (en mg/kg).



<b>Planta</b>	<b>Parte</b>	<b>Fe</b>	<b>Co</b>	<b>Ni</b>	<b>Cu</b>	<b>Zn</b>	<b>Pb</b>
	Suelo 7	10500 (1000)	51 (1)	23 (1)	35 (3)	63 (2)	26 (1)
Betabel	planta	<b>80 (4)</b>	<b>0</b>	<b>0.63 (0.03)</b>	<b>7.1 (0.4)</b>	<b>27 (1)</b>	<b>0.55 (0.03)</b>
	raíz	<b>280 (10)</b>	<b>0.67 (0.03)</b>	<b>5.7 (0.3)</b>	<b>8.2 (0.4)</b>	<b>31 (2)</b>	<b>4.6 (0.2)</b>
	tubérculo	320 (20)	2.7 (0.1)	6.7 (0.3)	20 (1)	59 (3)	6.3 (0.3)
	hojas	181 (9)	1.19 (0.06)	1.16 (0.06)	17.3 (0.9)	26 (1)	0
Lechuga romana	corazón	<b>47 (2)</b>	<b>0</b>	<b>0.33 (0.02)</b>	<b>23 (1)</b>	<b>21 (1)</b>	<b>0.15 (0.01)</b>
	hojas	220 (10)	0	0.59 (0.03)	29 (2)	25 (1)	0.8 (0.04)
	raíz	165 (8)	0.61 (0.03)	0.79 (0.04)	7.4 (0.4)	12 (1)	1.11 (0.06)
Habas	raíz	<b>420 (20)</b>	<b>3.5 (0.2)</b>	<b>1.63 (0.08)</b>	<b>6.2 (0.3)</b>	<b>13 (1)</b>	<b>1.9 (0.1)</b>
	tallos	<b>220 (10)</b>	<b>0.53 (0.03)</b>	<b>0.86 (0.04)</b>	<b>6.3 (0.3)</b>	<b>32 (2)</b>	<b>1.34 (0.07)</b>

Tabla 6.32: Concentración de elementos traza en Betabel, Lechuga Romana y Habas cultivadas en el suelo 7 de Tláhuac (en mg/kg).

<b>Planta</b>	<b>Parte</b>	<b>Fe</b>	<b>Co</b>	<b>Ni</b>	<b>Cu</b>	<b>Zn</b>	<b>Pb</b>
	Suelo 8	9800 (900)	60 (5)	23 (1)	35 (2)	69 (5)	15.4 (0.8)
Lechuga	raíz	<b>350 (20)</b>	<b>1.82 (0.09)</b>	<b>5.2 (0.3)</b>	<b>17.1 (0.9)</b>	<b>36 (2)</b>	<b>3.13 (0.16)</b>
	hojas	<b>158 (7)</b>	<b>0.16 (0.01)</b>	<b>1.13 (0.06)</b>	<b>3.8 (0.2)</b>	<b>17 (1)</b>	<b>0.46 (0.02)</b>
Epazote	tallos	<b>35 (1)</b>	<b>0.09 (0.005)</b>	<b>0.24 (0.01)</b>	<b>3.3 (0.2)</b>	<b>24 (1)</b>	<b>0.24 (0.01)</b>
	hojas	140 (6)	0	3.4 (0.2)	32 (2)	45 (2)	3.8 (0.2)
Chiles	fruto	<b>46 (2)</b>	<b>0.13 (0.01)</b>	<b>0.73 (0.04)</b>	<b>4.4 (0.2)</b>	<b>6.2 (0.3)</b>	<b>0.18 (0.01)</b>
Rábano	tubérculo	480 (20)	1.16 (0.06)	0.94 (0.05)	11.4 (0.6)	39 (2)	5.1 (0.3)

Tabla 6.33: Concentración de elementos traza en Lechuga, Epazote, Chile y Rábano cultivados en el suelo 8 de Tláhuac (en mg/kg).

En ciertos vegetales, frutas y tubérculos mostrados (partes comestibles), se observa una concentración de Pb que supera el límite mayor recomendado por la FAO/OMS para la ingesta en vegetales y sus derivados, (0.2 mg/kg). Las partes comestibles para las que se encontraron estos valores incluyen: hojas de quelite, jitomate maduro, flor de calabaza, pera, verdolagas, hierbabuena y epazote. Valores aún mayores se observaron en los tubérculos (betabel y rábano). Esto puede considerarse potencialmente peligroso para la salud humana.

Para los otros elementos estudiados, no existen niveles máximos establecidos para un consumo seguro, por lo que los resultados se discuten con base en los niveles considerados como fitotóxicos o al porcentaje de captación comparado con el nivel del suelo.

En el caso del Fe los síntomas de toxicidad no son específicos y difieren significativamente entre las especies. Pero en este caso, la concentración de Fe, se compara con los intervalos normales de variación reportados en la literatura [8], que son de 39-130 mg/kg, para las plantas comestibles. En nuestro caso, resultan elevados para plantas tales como: quelite,

jitomate, flor de calabaza, hierbabuena, lechuga y particularmente altos (mayor que 300 mg/kg), en los tubérculos. Estos niveles corresponden aproximadamente a una captación del orden del 1% del nivel reportado en el suelo.

La captación de Co no superó el 1% del nivel del suelo en la mayoría de los casos. Niveles ligeramente mayores se observaron sólo en jitomate maduro, flor de calabaza, acelga y hierbabuena, los cuales rebasaron los niveles máximos (0.2 mg/kg) reportados como normales para algunas plantas comestibles.

Pese a que el Ni es un metal fácilmente captado por las plantas y los niveles fitotóxicos varían entre 10-100 mg/kg, dependiendo de la especie, nunca se observaron estos niveles en las plantas colectadas en Tláhuac.

La captación de Cu en cambio, es bastante elevada y alcanza niveles cercanos al 50%, con respecto al nivel del suelo, en plantas como quelite, tomate, betabel, lechuga, epazote, jitomate, flor de calabaza, pera y cercanos al 100% en la acelga. Pero sólo la acelga, la lechuga y el epazote presentan concentraciones dentro del intervalo considerado fitotóxico (20-100 mg/kg).

El Zn, al igual que el Cu, es captado en proporciones elevadas, cercanas al 50% del nivel en el suelo. Sin embargo, cuando se compara con los niveles fitotóxicos (100-400 mg/kg), los niveles observados son mucho menores.

En general, aunque los niveles en suelos son altos, los metales no son transferidos a las plantas en sus diferentes partes (con algunas excepciones). Esto puede deberse al pH altamente alcalino de los suelos de Tláhuac (entre 7 y 8.6) y al alto contenido de materia orgánica que favorece la formación de complejos que inmovilizan a los metales, reduciendo su disponibilidad para ser tomados por las plantas. [8]

En la tabla 6.34 se muestran los resultados obtenidos para plantas de alfalfa, calabacita, avena y pasto cultivadas en el Valle del Mezquital, con sus respectivos suelos. Es importante señalar que en la zona, prácticamente lo que encontramos fueron cultivos de alfalfa, por lo que la variedad de plantas estudiadas fue muy pequeña.

Planta	Parte	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Pb
Calabacita	Suelo 2	19000 (1000)	61 (6)	35 (3)	130 (10)	77 (7)	43 (2)
	tallos	420 (20)	0.17 (0.01)	1.3 (0.07)	9.6 (0.5)	18 (1)	0.98 (0.05)
	hojas	210 (10)	0.95 (0.05)	1.04 (0.05)	10.1 (0.5)	32 (2)	0.6 (0.03)
Alfalfa	Suelo 2	19000 (1000)	61 (6)	35 (3)	130 (10)	77 (7)	43 (2)
	hojas	230 (10)	0.16 (0.01)	2.7 (0.1)	6.9 (0.3)	9 (0.5)	1.14 (0.06)
	tallos	91 (4)	0.2 (0.01)	0.85 (0.04)	3.8 (0.2)	9.2 (0.5)	0.44 (0.02)
	raíz	440 (20)	1.4 (0.07)	3 (0.1)	10.5 (0.5)	10.4 (0.5)	1.9 (0.1)
Avena	Suelo 4	20000 (2000)	64 (5)	36 (1)	128 (8)	67 (3)	32 (2)
	espigas	92 (4)	0.02 (0.001)	6.8 (0.3)	9.6 (0.5)	16 (1)	0.25 (0.01)
	tallos y hojas	230 (10)	0.53 (0.03)	2.4 (0.1)	3.2 (0.2)	5.4 (0.3)	0.4 (0.02)
	planta	129 (6)	0.66 (0.03)	2.5 (0.1)	9 (0.5)	8.6 (0.4)	0.79 (0.04)
Pasto	Suelo 3	18000 (1000)	66 (3)	33 (1)	107 (4)	80 (5)	52 (2)
	pasto	114 (5)	0.54 (0.03)	8.6 (0.4)	8.1 (0.4)	55 (3)	0.45 (0.02)

Tabla 6.34: Concentraciones en plantas de alfalfa, calabacita, avena y pasto cultivadas en el Valle del Mezquital (en mg/kg).

Se observa que los niveles de Cu en suelos, están considerablemente más altos que los reportados en Tláhuac, aunque no se observa absorción significativa por parte de las plantas. Estos cultivos de la zona del Valle del Mezquital, se destinan fundamentalmente al consumo animal, pero se debe prestar atención a los niveles de ciertos elementos que pueden pasar al ser humano a través del consumo de carnes y productos animales derivados.

#### Bibliografía.

- [1] Kuehl, R. O. *Diseño de experimentos. Principios estadísticos para el diseño y análisis de investigaciones*. 2<sup>da</sup> Edición, 2001. Thomson Learning. Caps. 1-6.
- [2] Ghermandi G, R Cecchi y P Laj *Procedures for target preparation to improve PIXE efficiency in environmental research*. Nucl Instrum and Meth in Phys. Res.B 109 (1996) 63-70 APR
- [3] Van der Sloot H. A., G. D. Wals, C. A. Weers and H. A. Das. *Simultaneous Elimination of Sodium-24, Bromium-82 and Phosphorus-32 in the Determination of Trace Elements in Biological Materials by Neutron Activation Analysis*. Anal. Chem. 52, (1980), 112-117.
- [4] Comisión de validación de métodos analíticos. *Métodos analíticos. Guía de Validación*. Edición 2002. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A. C.

[5] Romero Guzmán, C. J. *Validación de un método para cuantificar aminoácidos en cereales y leguminosas por HPLC*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM (2003).

[6] Delgado Martínez, L. *Desarrollo de un método analítico para medir el contenido de alcaloides en lupinos por cromatografía de gases*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM (1998).

[7] Kabata-Pendias, A., and H. Pendias. *Trace elements in soil and plants*. 3<sup>th</sup> Edition. CRC Press. Capítulos 1-5.

[8] Ramos R., E. Andrade, N. G. Calderón, G. Murillo y C. Solís. *Int. J. PIXE* 12, (2003), 64.

## Conclusiones

Durante el desarrollo de este trabajo se ha cumplido con los objetivos propuestos. Se desarrolló, se optimizó y se validó un nuevo método de cuantificación de trazas en frutas y verduras: FUV/PIXE. El mismo permite estudiar las concentraciones de Fe, Co, Ni, Zn, Cu y Pb, presentes en las plantas desde 0.2 mg/kg, en 50 mg de masa digerida.

Un paso importante dentro del método es la preconcentración de los elementos como carbamatos, que no sólo permitió bajar los límites de detección, sino también eliminar selectivamente ciertos elementos ligeros de la misma, con el propósito de disminuir el fondo en el espectro debido a reacciones nucleares. Otra ventaja de FUV/PIXE es que no requiere de altas temperaturas para la digestión, reduciendo así la posibilidad de que se volatilicen elementos de interés de la muestra.

El método es preciso, exacto, lineal, estable y robusto, para el intervalo de concentraciones estudiadas [0.2-400 mg/kg], que abarca ampliamente la concentración a la que se encuentran la mayoría de estos elementos traza en las plantas.

Aunque no se validaron los resultados para otros elementos de interés, la limitación fundamental en este sentido fue la preparación de muestras después de la fotólisis UV. De los resultados mostrados, se puede concluir que después de la digestión, una gran cantidad de elementos se recuperan entre el 92-100%, entre ellos Fe, Co, Ni, Zn, Cu, Ga, Se, Sr y Pb. Otros son reproducibles como el Cr y el Mn, aunque los porcentajes de recuperación son más bajos, 60 y 80%, respectivamente.

Este hecho deja abiertas futuras líneas de investigación que tengan como objetivo detectar y cuantificar tanto las trazas que no formaron carbamatos, como trazas de elementos que no se probaron, como Hg, Cd y As en frutas y verduras. Otros métodos de preconcentración y variaciones en sus condiciones de aplicación (i.e. pH), podrían probarse como alternativas para estos elementos.

El uso de una fuente de luz láser intensa en el UV para la formación de radicales libres a partir de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en disolución acuosa, reduce considerablemente el tiempo de digestión de la materia orgánica, en comparación con otros métodos ya establecidos. La reducción de masa que se logra de esta forma es comparable con la de estos métodos, aunque depende del tipo de matriz. La fotólisis UV no requiere de ácidos minerales y en general reduce las fuentes de contaminación presentes en otros métodos, a causa de los reactivos químicos y las altas temperaturas que se requieren.

La simplicidad y brevedad de la preparación de muestras propuesta también pueden favorecer la realización de estudios de otros recursos naturales (i.e. aguas de riego residuales, ríos, lagos, agua potable) en peligro potencial de contaminación. Frecuentemente, estos estudios se ven seriamente limitados por la complejidad y por el tiempo requerido para los análisis. En general, con el método desarrollado, se puede cuantificar un gran número de muestras en poco tiempo. Esto permite aumentar el número de réplicas en cada estudio, mejorando así la estadística. También se podría extender su campo de aplicación a otros productos alimenticios tanto sólidos como líquidos e incluso, productos procesados.

El empleo de la técnica FUV/PIXE en el análisis de plantas y suelos de Tláhuac y del Valle del Mezquital ha arrojado resultados que indican que estas regiones de cultivo requieren de tratamiento. Los niveles de Cr, Co, Cu y en algunos casos de Pb encontrados en los suelos, superan a los considerados potencialmente peligrosos para el cultivo de plantas de consumo animal o humano.

Del estudio realizado en las plantas, se puede concluir que en la mayoría de los casos, sólo un pequeño porcentaje de las cantidades encontradas en los suelos, es absorbida por la planta. De hecho, sólo en pocos casos encontramos que las concentraciones superan las consideradas fitotóxicas.

No obstante, es importante señalar que las concentraciones de Pb en algunas partes comestibles de las plantas analizadas, excedieron los niveles considerados seguros en vegetales y derivados por la FAO/OMS para el consumo humano. La presencia del Pb a estos niveles requiere de futuros estudios, particularmente por los efectos a largo plazo que tiene este elemento en la salud humana.

## Fórmulas de cálculo empleadas en la validación. [1]

### Precisión, exactitud y repetibilidad.

Media aritmética: 
$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

Desviación estándar: 
$$s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Coefficiente de variación: 
$$CV = \frac{s}{\bar{y}} * 100$$

n: número de mediciones o réplicas.

### Linealidad.

Pendiente: 
$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

Ordenada al origen: 
$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

Coefficiente de determinación: 
$$r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}$$

Intervalo de confianza para la pendiente: 
$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0,975,n-2} S_{b_1}$$

$$S_{b_1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$S_{x/y} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}}$$

Intervalo de confianza para la ordenada al origen: 
$$IC(\beta_0) = b_0 \pm t_{0,975,n-2} S_{b_0}$$

$$S_{b0} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

Coefficiente de variación de regresión:  $CV_{y/x} = \frac{S_{y/x}}{\bar{y}} * 100$

### Exactitud y repetibilidad.

Intervalo de confianza para la media poblacional:  $IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0,975,n-1} \frac{s}{\sqrt{n}}$

Para el resto de las pruebas se usan las fórmulas de media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación. En el caso de la sensibilidad, los límites de detección y cuantificación se calcularon con el método de curva de calibración basada en la desviación estándar de regresión y se usan las mismas fórmulas que para la linealidad.

Límite de detección:  $LD = \frac{3.3 * S_{y/x}}{b_1}$

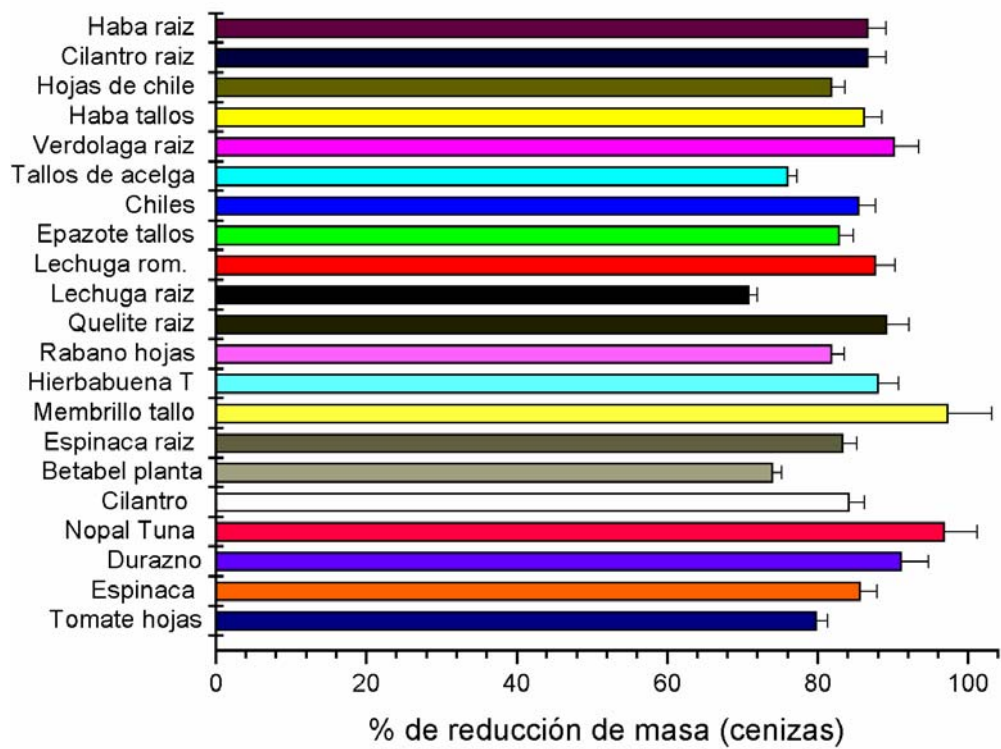
Límite de cuantificación:  $LC = \frac{10 * S_{y/x}}{b_1}$

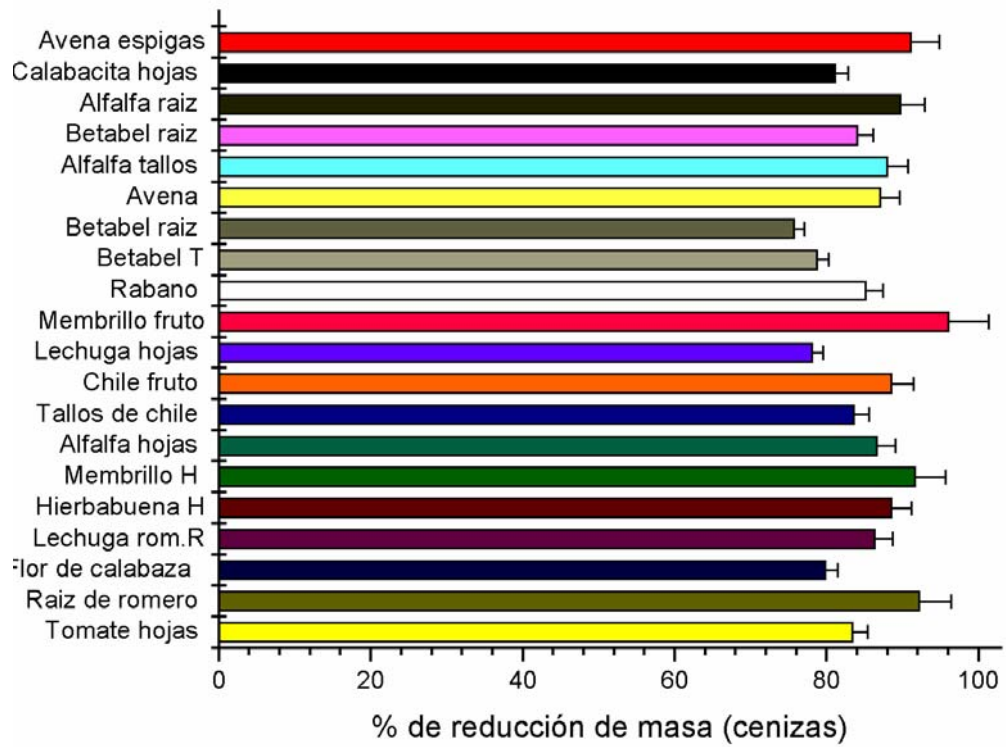
### Bibliografía.

[1] Comisión de validación de métodos analíticos. *Métodos analíticos. Guía de Validación*. Edición 2002. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A. C.



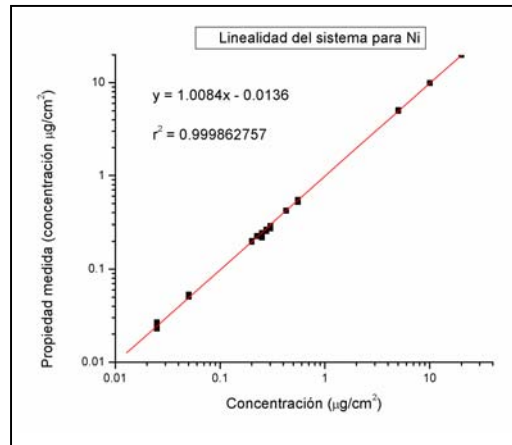
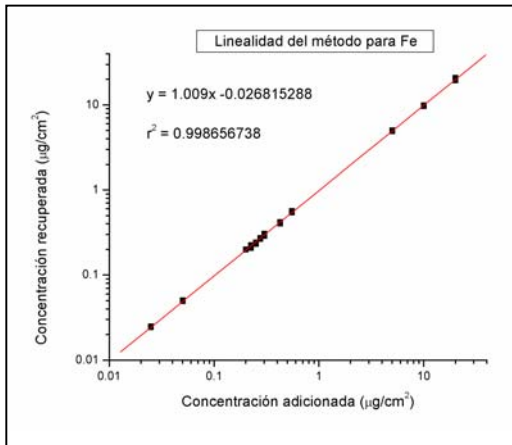
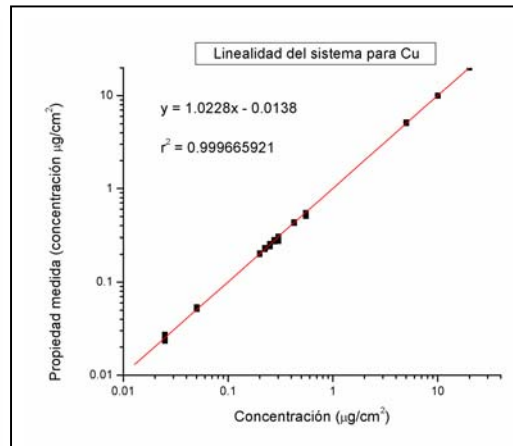
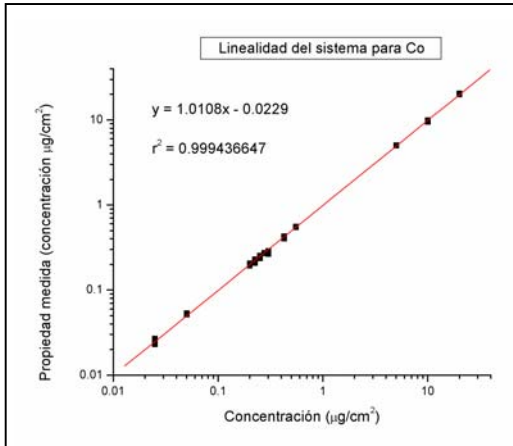
Anexo II: Porcentaje de reducción de masa de diferentes matrices usando la descomposición de la materia orgánica por calcinación o cenizas y su desviación estándar correspondiente (n=3).

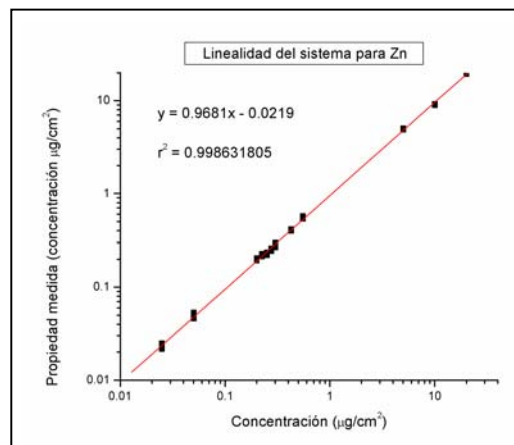
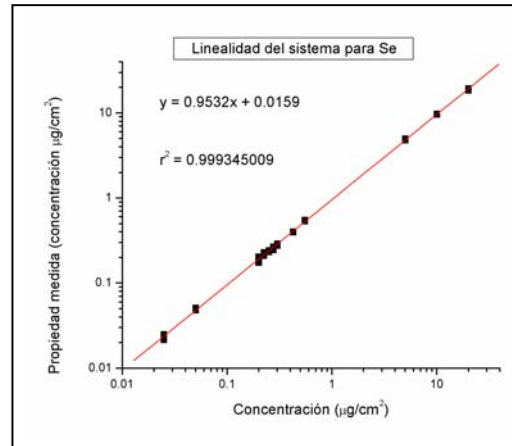
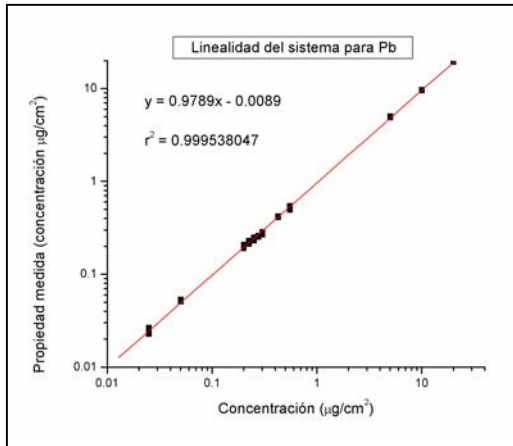




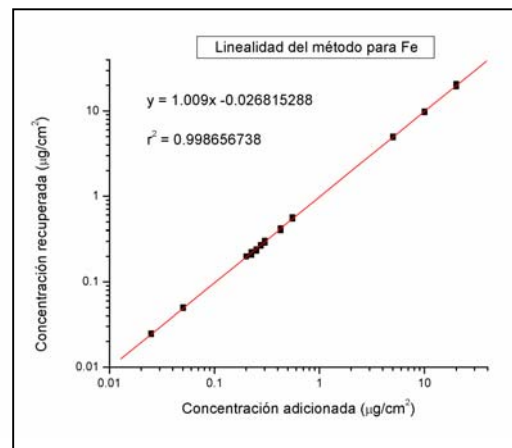
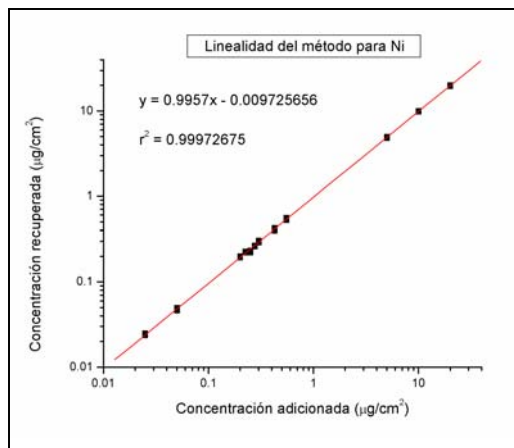
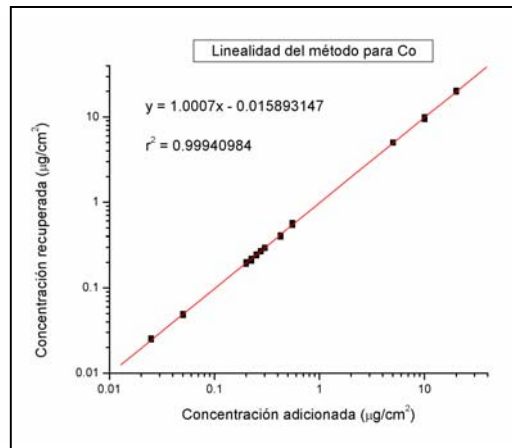
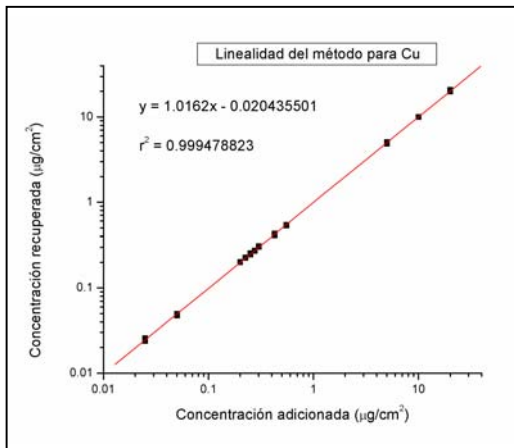
ANEXO III: Curvas de linealidad del sistema y del método.

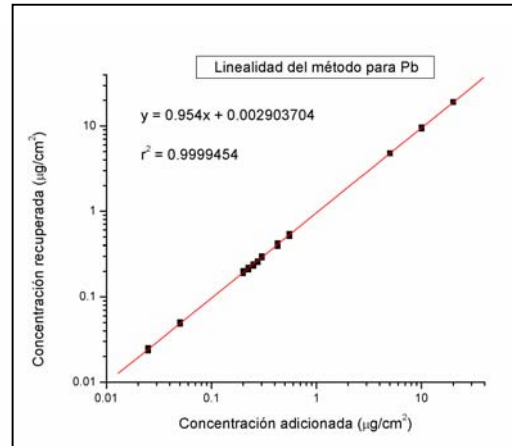
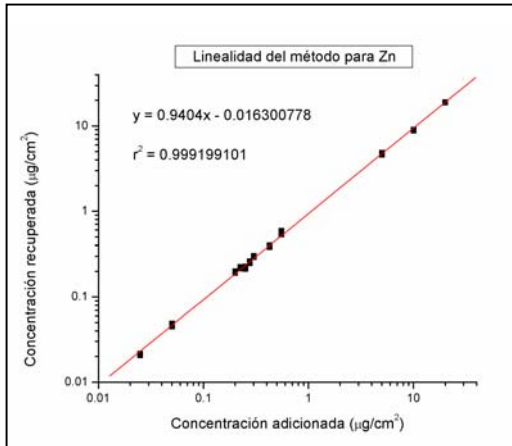
Linealidad del sistema para Co, Cu, Fe, Ni, Pb, Se y Zn. Curvas de respuesta del sistema en función de la concentración agregada.





Linealidad del método para Co, Cu, Fe, Ni, Pb, y Zn. Curvas de concentración recuperada en función de la concentración agregada.





## Anexo IV: Nombres científicos de algunas de las plantas estudiadas.

<b>Planta</b>	<b>Nombre científico</b>
Quelite	<i>Chenopodium spp.</i>
Jitomate	<i>Lycopersicum esculentum</i>
Calabaza guía	<i>Cucurbita maxima</i>
Calabacita	<i>Cucurbita pepo</i>
Nopal	<i>Opuntia robusta</i>
Membrillo	<i>Cydonia oblonga</i>
Romero	<i>Rosmarinum officinalis</i>
Cilantro	<i>Coriandrum</i>
Acelga	<i>Beta vulgaris</i>
Espinaca	<i>Spinacia oleracea</i>
Pera	<i>Pyrus communis</i>
Chiles	<i>Capsicum annum</i>
Hierbabuena	<i>Mentha piperita</i>
Betabel	<i>Beta vulgaris</i>
Verdolaga	<i>Portuclaca oleracea</i>
Lechuga romana	<i>Lactuca sativa longifolia</i>
Habas	<i>Vicia faba</i>
Coliflor	<i>Brassica oleracea L.</i>
Lechuga	<i>Lactuca sativa</i>
Epazote	<i>Chenopodim ambrosioides</i>
Rábano	<i>Raphanus sp.</i>
Alfalfa	<i>Medicago sativa</i>
Avena	<i>Avena sativa L.</i>