



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

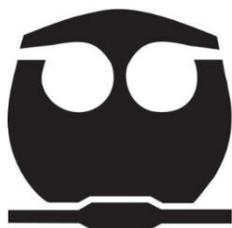
**DETERMINACIÓN DE METALES EN LARVAS CON ESPECTROSCOPIA DE
EMISIÓN ATÓMICA CON PLASMA ACOPLADO INDUCTIVAMENTE**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

BLANCA PAZ DÍAZ



MÉXICO, D.F.

2013



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: LILIANA VIRGINIA RAQUEL SALDIVAR Y OSORIO

VOCAL: Profesor: CIRO ELISEO MARQUEZ HERRERA

SECRETARIO: Profesor: JUAN MANUEL JUAREZ GONZALEZ

1er. SUPLENTE: Profesor: SILVIA CITLALLI GAMA GONZALEZ

2° SUPLENTE: Profesor: CAROLINA FLORES AVILA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 208 DEL DEPARTAMENTO DE METALURGIA, EDIFICIO D, FACULTAD DE QUÍMICA.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Ciro Eliseo Márquez Herrera

SUSTENTANTE:

Blanca Paz Díaz

Agradecimientos

A la Facultad de Química por ser mi casa durante todos estos años, por proporcionarme las oportunidades para estudiar y crecer. Porque fue el lugar en donde conocí a personas importantes y de las cuales aprendí mucho. A la UNAM ya que me enseñó a que una educación universitaria va más allá de lo académico. A esta increíble institución por darme las herramientas para mi desarrollo personal y profesional, gracias.

A mi familia (completa) por haberme apoyado en todo momento, por estar a mi lado a cada paso que di y por siempre empujarme hacia adelante. A todos mis amigos que también me han acompañado y ayudado tanto en el aspecto académico como en el personal. A todas las personas con las que me he encontrado y que han puesto su granito de arena para que yo pudiera llegar aquí.

Al Dr. Ciro Márquez Herrera por compartir su conocimiento, tiempo y espacio; por siempre mostrar interés en mi crecimiento profesional y personal. Agradezco que me haya permitido trabajar con maravillosas personas y abrir mi visión como profesionalista.

Dedicatoria

A mis padres por haberme enseñado que la perseverancia en el trabajo es clave para llegar lejos. Por darme tan maravillosos ejemplos de vida y modelos a seguir. A mi mamá por escucharme y apoyarme cada vez que estuve estresada, preocupada, triste. A mi papá por haberme iniciado en el área científica, haberme cuidado y apoyado en todo momento. A ustedes por todo lo que me han dado, por haber compartido conmigo triunfos y derrotas por igual. No sería lo que soy.

A mi hermano Asdrúbal, quien me ha aguantado en las malas y en las buenas. Porque sin importar la hora del día, tú has estado conmigo. Por todas las memorias creadas y compartidas. Por haber participado en todo este proceso. ¡Sabes que te quiero mucho y que eres el mejor hermano!

A mis abuelitos, maternos y paternos, que en algún momento me ayudaron y apoyaron. A mi abuelita Blanca por enseñarme muchas cosas que forman parte de mí y que siempre me acompañarán, por siempre recibirme en su casa, por siempre estar al pendiente.

A mis tíos Mago e Higinio por ayudarme y tratarme como una hija. A mi prima Crystal por estar ahí, por escucharme, por todas las experiencias compartidas.

A mis mejores amigas Olga Ramírez Barajas y Daniela Torres Castellanos por estar siempre conmigo y haber compartido tantas cosas tanto escolares como personales. A ti Olga pues fuiste un gran apoyo para poder ingresar a esta carrera y que culmina con este trabajo.

A mis amigos de la facultad que compartieron conmigo estrés, preocupación y desvelos. En especial a Fernanda Prieto por escucharme y ayudarme innumerables veces. A Andonery Ramírez por estar conmigo en muchas ocasiones que necesité un apoyo, por compartir tiempo, experiencias y más, te quiero mucho. Gracias a ti.

A todos mis amigos y compañeros del laboratorio. A Javier Flores por su paciencia y apoyo para enseñarme y compartir su experiencia, por ayudarme a realizar este proyecto.

A la bendición más grande que me dio la vida, a Omar Gustavo García López, quien me ha dejado compartir sus días, sus metas, sus sueños. Quien me llevado de la mano durante este tiempo, me ha apoyado, escuchado, ayudado y sobre todo entendido. ¡Gracias por estar a mi lado! Por permitirnos estar juntos a través del tiempo y la distancia, por abrazarme a cada paso, por ser tan maravilloso conmigo. ¡¡Te Amo Muchísimo!!

Contenido

Introducción.....	1
Objetivos.....	3
Hipótesis.....	4
1. Generalidades.....	5
1.1 Entomología Forense.....	5
1.1.2 Aplicaciones de la entomología forense.....	6
1.2 Insectos.....	9
1.2.1 Ciclo de vida.....	9
1.2.2 Larvas.....	10
1.2.3 Anatomía Externa del Insecto Adulto.....	12
1.2.4 Insectos de importancia forense.....	12
1.3 Colonización.....	15
1.4 Etapas de descomposición del cuerpo humano.....	17
1.5 Preparación de muestra.....	18
1.5.1 Digestión húmeda.....	18
1.5.2 Digestión con microondas.....	18
1.6 Espectroscopía de Emisión Atómica con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-OES).....	21
1.6.1 Principio de la Espectroscopía de Emisión Atómica.....	22
1.6.2 Equipo de ICP-OES.....	24
1.6.3 Interferencias.....	34
1.7 Validación de Método Analítico.....	36
1.7.1 Selectividad.....	36
1.7.2 Linealidad.....	36
1.7.3 Sensibilidad.....	37
1.7.4 Exactitud.....	37
1.7.5 Precisión.....	38
1.7.6 Robustez.....	38
1.7.7 Límite de detección.....	38

2. Desarrollo Experimental	39
2.1 Digestión	41
2.2 Selección y preparación de estándares.....	43
2.2.1 Validación	44
2.3 Análisis	44
3. Resultados	47
3.1 Resultados de Elementos Mayoritarios y Minoritarios de las Muestras	47
3.2 Validación	53
3.2.1 Linealidad y Sensibilidad	53
3.2.2 Exactitud	56
3.2.3 Repetibilidad	57
3.2.4 Interferencias de Matriz, Robustez y Selectividad.....	58
4. Análisis y Discusión.....	66
4.1 Elementos Mayoritarios	66
4.2 Elementos Minoritarios	67
4.3 Toxicología	68
4.4 Validación	69
5. Conclusiones	71
6. Bibliografía	72

Introducción

Las ciencias forenses son aquellas que se dedican al estudio de personas, lugares y cosas relacionadas a las actividades criminales. Desde el inicio de los tiempos, el hombre se ha dedicado a resolver los crímenes a partir de las herramientas que tiene a la mano. Hoy en día cualquier área de estudio puede ser aplicada a una investigación forense para llegar a conclusiones acerca de quién, cómo y por qué se ha cometido un crimen. Con el desarrollo tecnológico de las técnicas de análisis, el avance de las ciencias forenses ha sido constante aunque no por igual. Hay áreas de estudio que han sido olvidadas y su actualización ha sido lenta, tal es el caso de la entomología forense.

Debe considerarse que cuando ha ocurrido un crimen, el cadáver no siempre se encuentra íntegro debido a la descomposición del mismo. El proceso natural de descomposición que ocurre se ve afectado por diferentes factores, y uno muy importante es la presencia de los insectos que hacen del cuerpo su hábitat. En este tipo de situaciones es difícil identificar a la víctima así como determinar lo que ha sucedido por el daño causado por los insectos. Para contestar las preguntas se puede recurrir a los insectos presentes en la escena del crimen, pues contienen evidencia importante. Se podría decir que incluso son los mejores testigos ya que no mienten. Al estudio de los insectos en esta área se determina entomología forense.

Se han hecho estudios desde hace siglos acerca del papel que tienen los insectos en la descomposición de un cadáver y cómo ayudan a determinar el tiempo de muerte. A pesar de toda la información que son capaces de proporcionar, los insectos han sido poco estudiados en el área forense y su aplicación está limitada. Hay que considerar que si los insectos se alimentan del cadáver en cuestión, entonces tienen mucha información relacionada al mismo. Esto abre un nuevo campo de investigación y posible aplicación de la entomología forense

Los seres humanos tenemos una composición específica y única de elementos que nos permite vivir en equilibrio. Cada persona es diferente pues es un reflejo de su ambiente y forma de vida. Lo mismo sucede con las larvas y los insectos, tienen una

composición definida y que es determinada por su hábitat. En el caso de los insectos relacionados con una escena del crimen, tendrán una composición característica de la misma escena. Por tanto, los elementos encontrados en un insecto pueden proporcionar información acerca de la víctima y de su manera de muerte, así como del ambiente. Para llegar a conclusiones a partir de esta composición, se deben conocer los elementos que constituyen de manera regular a una larva y cuáles otros variarán de acuerdo a las condiciones de crecimiento. La técnica utilizada para determinar los elementos, así como para cuantificarlos, puede variar; sin embargo hay que tomar en cuenta que debe ser capaz de proporcionar información rápida y confiable. La espectroscopía de emisión atómica es una técnica que puede ser utilizada para dicho fin. Es una técnica que permite el análisis simultáneo de la mayoría de los elementos de la tabla periódica y en un rango de concentraciones amplio. Permite un análisis rápido, cualidad que se requiere en el área forense pues los resultados deben ser emitidos en poco tiempo y con validez para su uso en un juicio. Este tipo de aplicación es un campo fértil y que puede llegar a proporcionar información pertinente en una investigación criminal.

Objetivos

Objetivo General

- ❖ Desarrollar una metodología analítica para la determinación de metales en larvas con espectroscopía de emisión atómica y su posible aplicación en el área forense.

Objetivos Específicos

- ❖ Desarrollar un método para la digestión de larvas utilizando un horno de microondas
- ❖ Determinar la composición de metales de las larvas estudiadas
- ❖ Llevar a cabo la validación parcial de la metodología desarrollada

Hipótesis

- ❖ Si las condiciones de operación para la digestión de larvas se optimizan, entonces se logrará la destrucción completa de la matriz obteniendo soluciones ideales para su análisis con técnicas espectrofotométricas
- ❖ Si se conoce la composición de metales en las muestras de campo y en las blanco, entonces se podrán identificar marcadores específicos útiles en el área forense.

1. Generalidades

1.1 Entomología Forense

La entomología forense es la ciencia que estudia a los insectos encontrados en la escena de un crimen y utiliza dicha información para llegar a conclusiones en la investigación de casos legales. Es cuando el sistema judicial y la ciencia que estudia a los artrópodos interactúan. Los insectos que se estudian pueden variar de acuerdo a la zona geográfica y el clima, siendo los más comunes las moscas y los escarabajos. La entomología forense se divide comúnmente en 3: urbana, de productos almacenados y médico-legal (o médico-criminal) ⁽¹⁾

La historia de la entomología aplicada al área forense se remonta al siglo XIII en China ⁽²⁾ ⁽¹⁾ en donde se escribe el primer libro acerca de un caso de homicidio resuelto a partir de la evidencia proporcionada por unas moscas encontradas en el arma homicida. También en escritos medievales se encuentra evidencia de la presencia de larvas en los cuerpos. De ahí, no es sino hasta el siglo XIX con el avance de la biología que se determina la importancia de insectos en la descomposición de cuerpos humanos. Carl von Linné proporciona una nomenclatura para los insectos lo que facilita su identificación y clasificación. Mientras que Francesco Redi descarta la teoría de la generación espontánea a partir de una serie de experimentos que prueban que la carne en descomposición atrae a las moscas y si éstas tienen acceso a ella pueden colocar ahí sus huevos ⁽³⁾. Durante este siglo, en el año de 1887 en Francia, Jean Pierre Mégnin escribe el libro titulado *La Faune des Tombeaux* ⁽¹⁾ ⁽³⁾ el cual se convierte en la base de la entomología forense. Para 1897 escribe *La Faune de Cadavres* en donde describe 8 etapas de sucesión de insectos, cada etapa con su conjunto de especies. A Mégnin se le considera como el fundador de la entomología forense ⁽²⁾. Al llegar al siglo XX la información acerca de la biología y comportamiento de los insectos es basta, y esto permite más aún la sistematización de la entomología forense y su aplicación en casos legales. Se comienzan a aplicar técnicas modernas de análisis para la investigación en el área forense como lo son la secuenciación del ADN y la

microscopía electrónica de barrido para la identificación y clasificación de las especies.

1.1.2 Aplicaciones de la entomología forense

El entomólogo es capaz de determinar el periodo de actividad de los insectos de acuerdo a todas las variables que afectan la invasión y su desarrollo. A partir de los insectos encontrados y de las características generales de los mismos, se puede llegar a determinar tiempo, causa, forma y lugar de muerte. El estudio de los insectos hace posible determinar si hubo un posible transporte del cuerpo, almacenamiento, tiempo de desmembramiento, artefactos post mortem, negligencia infantil e incluso abuso sexual ^{(1) (3)}. A partir de la información recolectada, junto con la aportación de otras áreas de conocimiento, es posible llegar a la identificación de posibles sospechosos. De manera más común, la información es obtenida a partir de la necropsia y de un patólogo; sin embargo, en algunas ocasiones la descomposición del cuerpo es tal que un médico no puede determinar mucha información relevante. Es en estas situaciones que los insectos son los que nos pueden brindar la información deseada para continuar con una investigación.

La aplicación más común de la entomología forense es la determinación del Intervalo Post Mortem (IPM) ^{(1) (3) (4) (5)} o el tiempo de muerte. Para ser capaces de medir este intervalo a partir de la evidencia entomológica debemos tomar en cuenta varios factores que afectan a los insectos y su desarrollo. De manera muy general se toman en cuenta las especies presentes en el cuerpo, el estadio de desarrollo en el que se encuentran y su cantidad; también debe tomarse en cuenta el ambiente de la escena que incluye la temperatura y la humedad. La significancia de la información obtenida y la exactitud dependerá de la interpretación que se le dé a la evidencia entomológica recolectada. Al momento de llegar a la escena de un supuesto crimen en donde se encuentre uno o más cadáveres se deben primero anotar los datos relevantes al hábitat como lo son la temperatura, humedad, si es en campo abierto o locación cerrada, la estación del año y la zona geográfica. Posteriormente hay que evaluar el estado del cuerpo y determinar en qué etapa de descomposición se encuentra, así como si hay heridas distinguibles o el cuerpo se

encuentra quemado. Todos estos aspectos se deben considerar ya que afectan la colonización del cuerpo, ya sea que sea más rápida o no e incluso determinará las especies que se encuentren en el momento del hallazgo así como su cantidad. El muestreo es de vital importancia, así como el procedimiento para matar y preservar a la especie cuando es necesario o para conservarlas y permitir el término de su desarrollo en el laboratorio.

Para que la entomología forense pueda ser una ciencia aplicada y válida en un caso legal, debe de haber una investigación y actualización continua por parte de los especialistas en esta área. Se debe tomar en cuenta que la sucesión de la fauna cadavérica en parte será reflejo del hábitat y también del estado de descomposición del mismo cadáver, aquellos insectos asociados con el cuerpo son los que se deben tomar en cuenta para la determinación del Intervalo Post Mortem (IPM). Existen bases de datos donde se encuentran las olas de colonización para cada etapa de descomposición, dependiendo de la zona geográfica y estación anual ⁽¹⁾ ⁽²⁾ ⁽⁶⁾. Las bibliotecas se crean a partir de experimentos en puercos, y en algunas ocasiones, donde es permitido se llega a comprobar la información con cuerpos humanos ya sea experimentalmente o en casos reales. La experimentación en otra especie animal es posible ya que se ha comprobado que no hay especificidad de los insectos a una especie animal; sin embargo, se utiliza el puerco por su similitud biológica al ser humano. Una vez que se cuenta con estas bases de datos es posible aplicarla a un caso real a partir de las muestras recolectadas y de su evaluación por parte del entomólogo. Todo esto es válido si las condiciones bajo las cuales se construyó la biblioteca son similares a las experimentales. A pesar de considerar todos los aspectos que influyen en el desarrollo de los insectos al momento de determinar el tiempo de muerte, el valor obtenido siempre tendrá una incertidumbre asociada y esto debe ser tomado en cuenta por si algún otro tipo de información recolectada acerca del caso no concuerda con el intervalo que se ha proporcionado a partir de la información entomológica.

Hay diversas mediciones que se realizan para determinar el intervalo post mortem a partir de larvas ⁽¹⁾ ⁽³⁾:

- Tiempo de desarrollo: teniéndose el tiempo teórico o experimental en el que se tarda una especie en cumplir con todo su ciclo de vida en condiciones similares a las del lugar donde se encontró el cuerpo, se construye una curva de crecimiento contra el tiempo. Se evalúan los insectos encontrados en el cadáver, se ve en que estadio de su ciclo de vida se encuentran y se interpola el tiempo aproximado que llevan en el cuerpo a partir de la curva. Se debe de considerar la etapa de descomposición y la generación en que la especie se encuentra.
- Longitud de la larva: este método se aplica generalmente cuando el cuerpo ha estado en un lugar cerrado y la temperatura se mantiene relativamente constante. Se crean diagramas de la longitud de la larva en relación al tiempo a una dada temperatura. Se miden un cierto número de larvas encontradas en el cuerpo, se calcula la media y se lee directamente de la gráfica el tiempo de desarrollo.
- Sucesión de insectos: útil cuando la persona lleva muerta más de 3 meses y la descomposición suele ser avanzada. Se deben de notar los insectos que están presentes y los ausentes, así como las variaciones de clima, la temporada y la locación geográfica. Si hay presencia de predadores puede que causen la disminución o extinción de una o más especies.

Otra de las aplicaciones que se le ha dado a la entomología forense es la entomotoxicología.^{(7) (8)} Se han realizado experimentos en cuanto al aislamiento y cuantificación de diferentes sustancias de abuso a partir de larvas encontradas en cadáveres. Se ha logrado identificar diferentes sustancias a partir de un macerado de las larvas; a pesar de esto no se ha logrado relacionar la cantidad encontrada con la que pudo haber tenido el cuerpo. Las metodologías analíticas son cada vez más avanzadas y nos permiten realizar este tipo de determinaciones, aunque no se puede llegar a decir si el sujeto estaba intoxicado hasta cierto punto y si pudiera haber sido la causa de muerte. Esto sólo se logra con otro tipo de análisis que corresponde a la autopsia u opinión del patólogo.

Una de los estudios más recientes en el área de la entomología forense es la detección de residuo de disparo a partir de larvas encontradas en cadáveres. Esta

área es relativamente nueva y se tiene poca investigación al respecto. Se ha hecho a nivel experimental sobre carne porcina o de res a la cual se le dispara con un arma de calibre conocido y a una determinada distancia ⁽⁹⁾ ⁽¹⁰⁾. La técnica de análisis ha sido Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS por sus siglas en inglés). Se hace énfasis en detectar y cuantificar plomo, bario y antimonio. El tratamiento de las larvas para tener a los metales en solución y que su detección y cuantificación sea posible ha sido variada. Se realizaron experimentos en donde sólo se hizo una extracción de los metales sin llevar a completa disolución las larvas ⁽⁹⁾. En este experimento llevado a cabo en carne de res se encontraron concentraciones altas de los tres metales en las larvas alimentándose de carne disparada en comparación con las muestras control. Se encontró que conforme la larva se alimentaba más de la carne con residuos debido al disparo, los niveles de plomo y antimonio disminuían, pero el bario se mantenía constante. Se analizaron diferentes etapas del insecto de elección, encontrándose que en las muestras que se habían alimentado de la carne a la cual se le había disparado mostraban más altas concentraciones de plomo y bario. En otro experimento utilizando carne porcina, se digirieron por completo las larvas por medio de un horno de microondas ⁽¹⁰⁾. En este caso si se lograron detectar residuos de disparo en las larvas y al compararse con resultados de microscopia electrónica de barrido, se probó que el análisis por ICP-MS ayudaba en la detección de estos residuos cuando la descomposición era avanzada.

1.2 Insectos

Los artrópodos son animales invertebrados que como características generales poseen un exoesqueleto y patas articuladas, incluye a los insectos, arácnidos, centrípetos, miriápodos y crustáceos. Los insectos se diferencian por tener 3 pares de patas, alas y un cuerpo que se divide en tres. Este grupo de artrópodos son los más numerosos y se encuentran en casi todos los hábitats terrestres y acuáticos.

1.2.1 Ciclo de vida

Los insectos pasan por un proceso denominado metamorfosis el cual consiste en cambios físico de una etapa a la siguiente. No todos los insectos sufren una

homeostasis completa, aquéllos que si lo hacen se denominan insectos holometábolos como es el caso de las moscas. El ciclo de vida de un holometábolo consiste en:

Ovoposición: la hembra coloca los huevos en un lugar que brinde protección y alimento.

Eclosión: etapa en la cual la larva sale de su huevo. Las larvas pasan por tres estadios que sólo se diferencian entre sí por el tamaño de la larva.

Pupación: las larvas maduras migran para pupar en el suelo, o en un lugar obscuro y protegido, generalmente lejos de la fuente de comida.

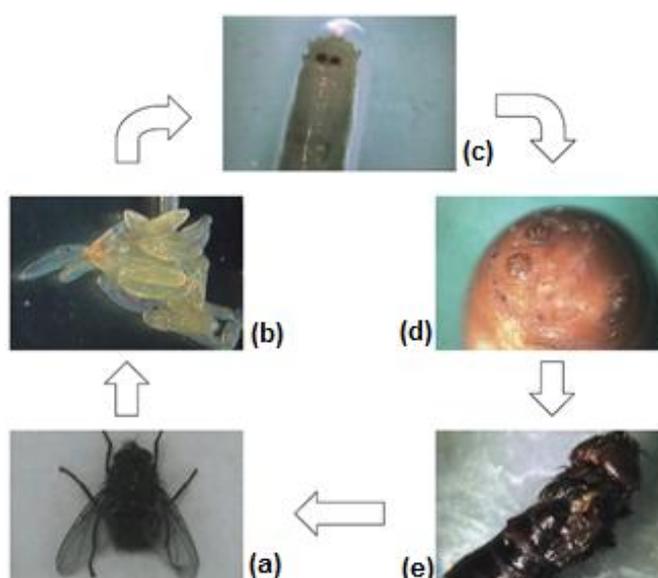


Figura 1-1. Ciclo de vida de una mosca. Las etapas por las que pasa un insecto iniciando con **(a)** la etapa adulta. Los insectos se aparean y la hembra en la mayoría de los casos coloca **(b)** huevecillos, los cuales eclosionan. **(c)** Las larvas pasan por tres etapas y posteriormente buscan un lugar para formar su **(d)** pupa. **(e)** El insecto sale de su pupa en su forma adulta. ⁽³⁾

1.2.2 Larvas

Es la etapa de los insectos que pasan por la metamorfosis completa que precede a la etapa crisálida. La larva es muy activa y come mucho, preparándose para las etapas posteriores. Tienen una cutícula pero no es tan dura como la que está presente en un adulto.

En el caso del Orden Díptera, que se refiere a los insectos más especializados, las larvas son vermiformes y no tienen patas. Las larvas tienen 12 segmentos y un extremo anterior puntiagudo con una estructura negra que comprende las mandíbulas y escleritas, la cual termina en ganchos bucales. El extremo posterior es romo y tiene dos áreas cafés circulares denominadas espiráculos posteriores. Las larvas pasan por tres estadios denominados L1, L2 y L3. La etapa de la larva puede ser identificada por el número de aperturas delgadas que se encuentran en cada espiráculo. En el primer estadio sólo está presente una apertura y la larva tiene un tamaño menor a 2mm de longitud. En el segundo estadio se tienen dos aperturas y el tamaño de la larva va de 2 a 9 mm de longitud, mientras que para el tercer estadio hay tres aperturas y el tamaño es de 3 a 22mm. Debe tomarse en cuenta que el tamaño no es una medida certera de la edad de la larva ya que dependerá de la cantidad y calidad de la comida disponible. Las larvas tienen tubérculos, que son proyecciones que rodean la orilla del segmento posterior. La distancia que hay entre los tubérculos se utiliza como característica de identificación de la especie. En la Figura 1-2 se muestran las diferentes partes características de una larva, algunas de las cuales pueden servir para identificar la especie del insecto en cuestión.

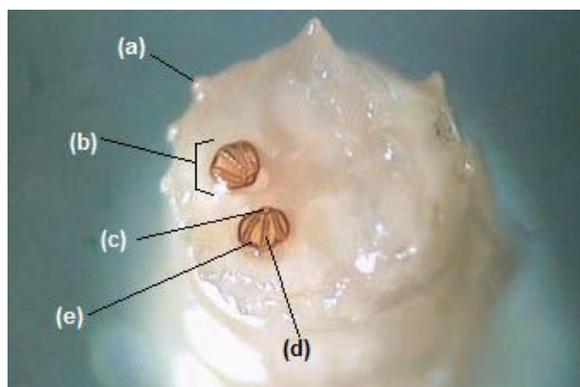


Figura 1-2 Estructura de una larva L3. (a) Tubérculo. (b) Espiráculo posterior. (c) Botón del espiráculo (d) Aperturas delgadas del espiráculo. (e) Peritrema, el borde externo del espiráculo. ⁽³⁾

Aproximadamente a la mitad del tercer estadio las larvas dejan de alimentarse y se vuelven migratorias buscando un lugar para pupar. A esta etapa se le denomina post-alimentaria. Las larvas buscan lugares oscuros y fríos, muchas veces se entierran en el suelo 2-3 cm.

1.2.3 Anatomía Externa del Insecto Adulto

La pared externa es un exoesqueleto que tiene dos funciones: provee de puntos de unión para los músculos y una cutícula como capa externa protectora. La piel de los insectos está compuesta por platos llamados escleritas unidos por áreas membranosas, lo que proporciona protección y a su vez flexibilidad. La biología y comportamiento de una especie afectará su morfología, así como las diferencias entre cada etapa de vida. El cuerpo se divide en tres regiones (Figura 1-3):

- Cabeza: contiene los órganos sensoriales, de la percepción y es su punto de ingestión.
- Tórax: porción que sigue a la cabeza, se encarga de la locomoción y está esclerotizado. Se divide en tres segmentos: protórax, mesotórax, y metatórax. A cada segmento está unido un par de patas. Las alas también están unidos a esta parte del cuerpo.
- Abdomen: es la última región en donde se encuentran los órganos genitales y otras estructuras externas especializadas algunas de las cuales son esenciales de los sistemas del cuerpo. Es en donde se lleva a cabo la reproducción, digestión, circulación y respiración.

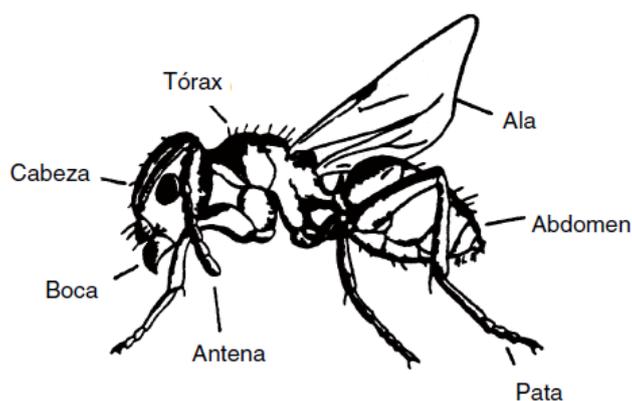


Figura 1-3: Estructura externa de un insecto. ⁽¹¹⁾

1.2.4 Insectos de importancia forense

Hay dos grupos mayoritarios de insectos que son atraídos a los cadáveres y proveen la mayoría de la información durante una investigación. Los escarabajos

(Orden Coleóptera) con un total de 300 000 especies y las moscas (Orden Díptera) con 86000 especies descritas. Otros insectos que pueden ser encontrados en un cadáver o sus alrededores son oportunistas.

A partir de investigación se ha logrado identificar a los insectos que suelen estar presentes en un cuerpo en descomposición. Al conjunto de insectos encontrados en estas situaciones se le suele denominar microfauna cadavérica, la cual incluye:

- Insectos necrófagos: son aquellos que se alimentan de tejido en descomposición. En esta denominación se encuentran los insectos del orden Díptera y Coleóptera
- Predadores o parásitos de las especies necrófagas: aquí se pueden presentar insectos del orden Coleóptera, Díptera e Himenóptera. Son parásitos de las larvas y pupas de Díptera
- Especies omnívoras: avispas, hormigas y escarabajos.
- Especies oportunistas: ácaros, arañas, y lepidópteros. El cadáver es sólo una extensión de su hábitat y provienen del ambiente alrededor de la escena. Pueden llegar a convertirse en predadores de necrófagos.

1.2.4.1 Moscas (Orden Díptera)

Hay 86000 especies identificadas en el mundo. Tienen un par de alas para volar, y un segundo par para estabilización. Sus ojos son compuestos y su boca es del tipo esponjoso. Las larvas no tienen patas, son de color blanco/crema, de un cuerpo suave. Suelen ser depredadores y parásitos.

Calliphoridae

Son de color metálico azul y verde. Hay más de 1000 especies. Los adultos tienen una antena de 3 segmentos con una arista al final, un par de ojos compuestos. Las larvas tienen unos espiráculos característicos para su identificación. Son las primeras en detectar y colonizar los restos humanos y animales.

Sarcophagidae

Hay más de 2000 especies. Algunas son parásitos de otros insectos como abejas y avispas. Los adultos no tienen color metálico y su antena tiene la arista en la base de la antena. Las larvas tienen espiráculos posteriores en una depresión. Son la familia más común en espacios cerrados. No depositan huevos, sino las larvas en su primer estadio. Llegan con las moscas o después. Suelen ser las primeras en condiciones adversas.

Muscidae

Son la familia más ubicua y sinantrópica (en estrecha asociación con el hombre) su biología y hábitat son variados. Las alas y la cabeza sirven para su identificación, son la última familia de moscas que llega y se encuentra en orificios o ropa húmeda.

También se pueden encontrar moscas de las familias *Piophilidae*, *Scathopagidae*, *Sepsidae*, *Sphaeroceridae*, *Stratiomyidae*, *Psychididae* y *Phoridae*.

1.2.4.1.1 *Musca domestica* (Linnaeus)

Distribuida alrededor del mundo, tiene 6-7mm de largo en su etapa adulta. Son generalmente grises con rayas negras longitudinales que van del tórax al abdomen. Son usualmente un vector para diversas enfermedades ya que generalmente se encuentran en material en descomposición y conviven con el hombre. Los adultos y larvas prefieren el excremento y materia vegetal en descomposición. Sin embargo, los adultos son atraídos a comidas dulces y carne, medio en los cuales las larvas pueden desarrollarse. Son de las primeras especies atraídas a un cadáver y al excremento. Son más comunes durante el verano, y se encuentran a lo largo del proceso de descomposición.

La larva de *Musca Doméstica* tiene un cuerpo cilíndrico cónico, ya que la parte posterior está truncada oblicuamente. El integumento está dividido por una serie de anillos en 13 segmentos con una longitud total de 12mm. El primer segmento está definido por una constricción posterior y contiene unas espinas diminutas. El tercer segmento tiene unos procesos espiculares. Los segmentos del 6 al 12 tienen unas

almohadillas con minutas espinas que permiten a las larvas moverse. Hay almohadillas similares a éstas en el segmento 12 en su parte ventral y también en la parte posterior al ano. El último segmento tiene en su centro dos espiráculos y en la parte ventral hay dos lóbulos anales que son para la locomoción. La parte externa de una larva está compuesta por dos capas de quitina, una externa y otra interna más gruesa. La quitina está sobre una capa de células hipodermales bien innervadas.

La larva en su primer estadio mide aproximadamente 2mm, contiene los mismos segmentos que una larva madura, la parte posterior está truncada oblicuamente y contiene las aperturas de la tráquea. El integumento cuticular es delgado y transparente y se pueden llegar a ver los órganos internos. La primera etapa puede durar entre 24 y 36 horas, posterior a eso mudan de piel en un proceso que se denomina ecdisis. El segundo estadio entra en ecdisis después de 24 horas para pasar al tercer estadio. Durante esta última etapa la larva crece rápidamente. Al segundo día en esta etapa, la larva deja de comer y adquiere un color crema debido a la grasa acumulada y los cambios histológicos. Posteriormente se va encogiendo hasta formar la pupa al día 3 o 4.



Figura 1-4. Esquema de una larva de *Musca domestica* (Linn)⁽¹²⁾

1.3 Colonización

La colonización de un cuerpo dependerá de varios factores:

- **Intrínsecos:** son los relacionados al cuerpo como la edad, constitución, causa de muerte e integridad.

- Extrínsecos: se refieren al ambiente e incluye la temperatura, ventilación y humedad del aire. Deben presentarse las condiciones óptimas tanto para los insectos como para que las bacterias actúen y así suceda la colonización.

Uno de los aspectos más importantes y estudiados en cuanto al desarrollo de los insectos en un cuerpo es la temperatura ^{(1) (2) (3) (6)}. En climas cálidos el tipo y número de insectos carroñeros y su actividad aumentan. Mientras que temperaturas cercanas a 0° C mata a las larvas de primer y segundo estadio. La temperatura suele ser una fuente de error en la estimación del IPM, y sobre todo la temperatura que puede alcanzar la masa de larvas. Cuando se tienen agregaciones de larvas de una especie, éstas producen una cierta cantidad de calor que puede ser más alta a la temperatura ambiente y esto debe tomarse en cuenta pues esta temperatura es la que regirá la velocidad de desarrollo de dichas larvas. El microambiente creado por las larvas es muy determinante en su supervivencia sobre todo en climas extremos. En el caso de las pupas, se debe tomar en cuenta la temperatura del suelo a diferentes profundidades, la cual determinaría el momento en el que emergen ya las moscas adultas. Otra fuente de error relativa a las temperaturas es la diferencia que pueda haber entre las registradas en el lugar de hallazgo y las que se tienen de la información del sistema meteorológico. Muchas veces se hacen curvas de las temperaturas medidas en relación a las proporcionadas por la estación meteorológica y se hace una corrección gráfica con una regresión lineal. Cuando la diferencia entre los dos registros de las temperaturas es muy grande, no se realiza la regresión lineal y sólo se toman las temperaturas que se han medido directamente de la escena del crimen.

La colonización de un cuerpo se da debido a que los insectos son atraídos por los gases liberados debido a la descomposición. Si existe algún tipo de barrera que impida la liberación de estos gases de manera efectiva o el acceso de los insectos al cuerpo, la colonización será menor y más lenta.

Los lugares de colonización para los órdenes de Díptera y Coleóptera son los orificios naturales del cuerpo como son ojos, fosas nasales, boca, oídos y genitales.

Si hay heridas en el cuerpo, éstas también serán lugar de colonización por parte de los insectos.

1.4 Etapas de descomposición del cuerpo humano

La descomposición se define como la destrucción del tejido por diferentes factores. A continuación se presenta una clasificación del proceso de descomposición, el cual se divide en pre esqueletonización, esqueletonización y post esqueletonización, cada una con sus propias etapas y procesos^{(5) (13)}.

- Pre-esqueletonización
 - Etapa fresca: ocurre la autólisis de las células metabólicamente más activas. El pH disminuye así como la cantidad de oxígeno disponible, y se forman ampollas llenas de fluido.
 - Etapa de hinchamiento: comienza la putrefacción y hay destrucción de tejido suave por parte de los microorganismos anaerobios. Se puede observar una descoloración azul-morada debido a pigmentos liberados por células pancreáticas. Hay catabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos. Estos procesos producen gases y fluidos que quedan atrapados en el cuerpo y por tanto se observa el hinchamiento del mismo.
 - Etapa de decaimiento activo: ocurre la descomposición de músculo (produciendo ácidos grasos volátiles), descomposición de proteínas y grasas (compuestos fenólicos y glicerol). En esta etapa se tiene una mayor actividad de insectos
 - Etapa seca: el resto de piel y tejido está adheridos al hueso y están secos.
- Esqueletonización: hay exposición de los huesos en un porcentaje mayor al 50%. No se observa erosión de los huesos.
- Post esqueletonización: termina la destrucción del tejido, lo que conlleva a la exposición completa del esqueleto. Hay una destrucción química de los huesos, la cual es más lenta. Hay un intercambio de especies iónicas entre los huesos y el ambiente, a este proceso se le denomina diagénesis.

La nomenclatura y división de etapas de este proceso de descomposición pueden variar de acuerdo al lugar o grupo de investigación. Sin embargo, debe considerarse que los procesos que se llevan a cabo son los mismos y en el mismo orden.

1.5 Preparación de muestra

Las muestras generalmente se presentan de dos maneras, sólidas o líquidas. A pesar de que para la aplicación de técnicas espectrométricas se pueden trabajar las muestras sólidas, se prefiere trabajarlas líquidas. La preparación de la muestra dependerá del tipo de muestra que se tiene y de la técnica de análisis que se utilizará. Se han desarrollado distintos métodos para el tratamiento de las muestras previo al análisis.

1.5.1 Digestión húmeda

Para tener las muestras listas para el análisis, se puede llevar a cabo una extracción que consiste en utilizar un solvente adecuado para liberar los analitos de interés. Sin embargo, el uso del solvente no es suficiente en algunas ocasiones y es necesario destruir la matriz por completo. A este proceso se le denomina digestión y para el cual se utilizan ácidos. Las maneras en las que se puede hacer este proceso son variadas, aunque el desarrollo de nueva tecnología ha sido lento. Durante la digestión deben de cuidarse diversos aspectos para evitar la contaminación de la muestra o incluso la pérdida de elementos.

La descomposición de la muestra para liberar al analito de una matriz interferente se puede realizar con el uso de un ácido y/o la aplicación de calor. El ácido o combinación de ácidos a utilizar dependerá de la naturaleza de la matriz que se quiere destruir. Comúnmente la digestión se lleva a cabo en recipientes de vidrio abiertos, en donde se coloca la muestra y se le agrega el ácido de elección. El recipiente, en caso de ser necesario, se coloca en una parrilla de calentamiento.

1.5.2 Digestión con microondas.

Una alternativa de digestión es el uso de microondas. Las ventajas de esta técnica de digestión es que los vasos pueden operar a presiones de 100kPa y temperaturas

de 300° C, además de poderse colocar varios vasos simultáneamente, lo que permite tener las muestras en las mismas condiciones, completamente digeridas en poco tiempo y con poca cantidad de reactivos ⁽¹⁴⁾ ⁽¹⁵⁾. El primer reporte del uso de un horno de microondas para la digestión de muestras para el análisis elemental fue en 1974 y actualmente se tienen dos tipos de sistemas comerciales: sistemas abiertos y cerrados. En el sistema abierto, se coloca la muestra con el ácido de elección en un tubo que se coloca ya en el sistema de microondas. La desventaja es la probable pérdida de elementos volátiles, y para evitar esto se recurre a un sistema cerrado además de que en éste se reduce la evaporación y por tanto se requiere menos volumen de ácido.

De manera general un horno de microondas para la digestión (Figura 1-5) consiste en un carrusel rotatorio que contiene varios vasos de digestión, y un sistema de ventilación controlado. Dependiendo del equipo, puede tener sistemas que monitorean y guardan los datos de temperatura y presión de los contenedores. Los vasos usualmente están fabricados de polímeros o cuarzo resistentes a altas temperaturas y a las sustancias químicas. El material debe ser transparente a las microondas y químicamente inerte. Cada vaso tiene una válvula de liberación de presión y está puesta de tal manera que la muestra sea calentada a alta presión permitiendo altas temperaturas. Es posible programar el tiempo de digestión y la potencia del horno y así permitir la reproducibilidad del procedimiento.

Las microondas son radiación electromagnética cuya frecuencia es de 0.3 a 300 GHz, aunque para evitar interferencias con radiocomunicaciones los hornos se operan a una frecuencia de 2.45 o 0.9 GHz, siendo la primera más común. Cuando las microondas, producidas por un magnetrón, se hacen incidir sobre la muestra la energía electromagnética se transforma en calor por medio de conducción iónica y rotación de dipolos ⁽¹⁴⁾.

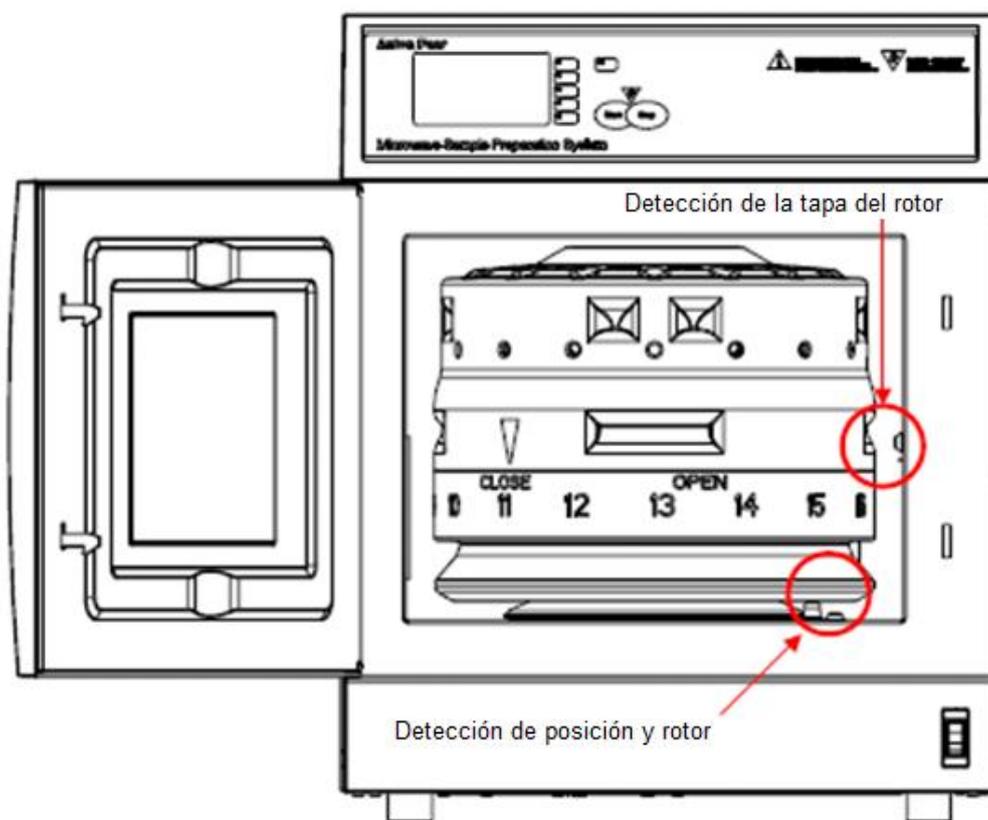


Figura 1-5. Esquema de un equipo para digestión con microondas ⁽¹⁶⁾

En algunos casos es difícil determinar la cantidad de muestra, los ácidos a utilizar y la temperatura y presión ideal para la completa digestión de una muestra. Cuando esta situación se presenta, los proveedores del equipo proporcionan bibliotecas con la información necesaria y que puede servir como guía.

Debido a la variedad de muestras que pueden ser digeridas por medio de esta técnica, los equipos cuentan con una variedad de opciones que permiten mejorar la eficiencia del proceso. Entre las opciones están diferentes rotores para las variadas condiciones de presión, temperatura y volumen. El material del que están fabricados los vasos determinará su uso. Puede haber rotores para 8, 16 y 48 vasos. La presión con la que se puede trabajar es desde 20 bar hasta 80 bar, siendo estos últimos vasos hechos de cuarzo. En la Figura 5 se muestra una gráfica que indica los vasos que se deben utilizar de acuerdo al tipo de muestra, presión y temperatura en el caso de un equipo de la marca AntonPaar. En la nomenclatura de los rotores, la primera letra indica la presión de trabajo: M (media 20/70 bar), H (alta 40/70 bar) y X (extremadamente alta 60 u 80/120 bar). La segunda letra indica el material del

recipiente: F (fluoroplástico) y Q (cuarzo) y finalmente el número indica el volumen en mL.

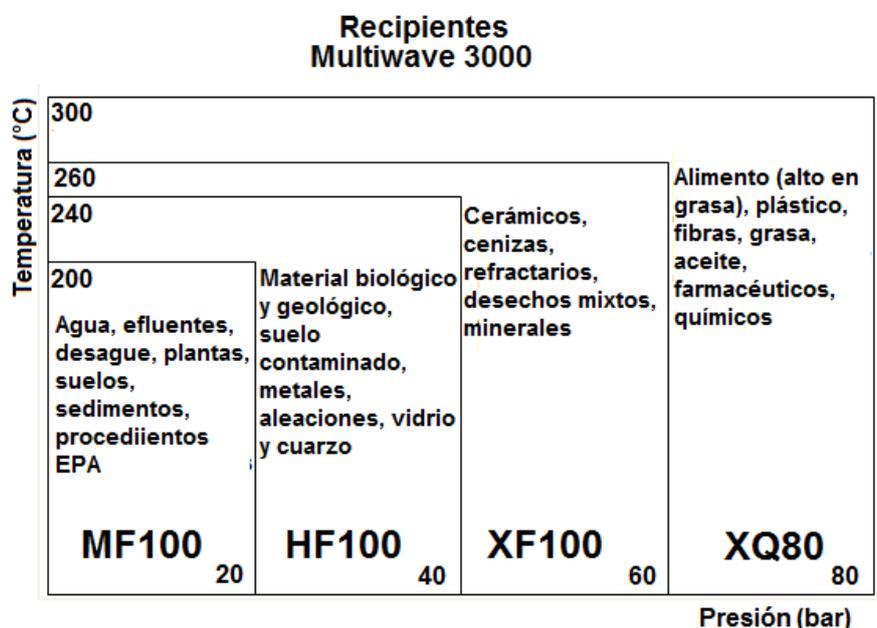


Figura 1-6. Esquema de los Rotores Disponibles para el sistema Multiwave 3000 de la marca AntonPaar⁽¹⁶⁾

1.6 Espectroscopía de Emisión Atómica con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-OES)

Es una técnica que permite el análisis simultáneo de más de 70 elementos en un periodo corto de tiempo y, a pesar de ser una técnica destructiva, tan sólo se necesita poca cantidad de muestra. Las longitudes de onda que pueden ser detectadas van de 160 a 900nm, que incluye los espectros ultravioleta, visible y el cercano infrarrojo. Éstas y más cualidades permiten su aplicación en una variedad de campos.

El desarrollo del plasma se debe a los trabajos de Reed en los años 60's, sin embargo para los 70's fue introducido en el análisis espectroscópico por Fassel y Greenfield⁽¹⁷⁾ de manera independiente. Desde entonces la técnica ha sido mejorada con el paso del tiempo hasta los equipos actuales que permiten obtener resultados con alta sensibilidad, un rango linear amplio y menor interferencia a otras técnicas de emisión.

1.6.1 Principio de la Espectroscopía de Emisión Atómica

La espectroscopía estudia la interacción de la radiación electromagnética con la materia, interacción que dependerá de la energía y de la estructura de la materia. En cuanto a la estructura de la materia, se toma el modelo del átomo de Bohr. Niehls Bohr en 1913 propuso un modelo en donde los electrones se pueden encontrar en orbitales alrededor del núcleo estático. Los orbitales o niveles energéticos discretos tienen una energía, radio y momento angular definidos, es decir están cuantizados. Los electrones al encontrarse en estos niveles se dice que están en estado estacionario sin emitir radiación. Al primer estado estacionario se le conoce como estado basal y es el que tiene menor energía y el radio más pequeño. Sin embargo, transiciones entre niveles pueden ocurrir dándose la absorción o la emisión de radiación electromagnética correspondiente a la diferencia de energía entre niveles. El electrón se queda en el estado basal a menos que se le proporcione energía ocasionando que el electrón se excite, lo que quiere decir que hay una transición hacia un nivel energético mayor. A este fenómeno se le denomina absorción. El tiempo de vida de las especies excitadas es de 10^{-5} a 10^{-9} segundos, posterior a este tiempo el electrón regresará a su estado basal emitiendo radiación electromagnética.

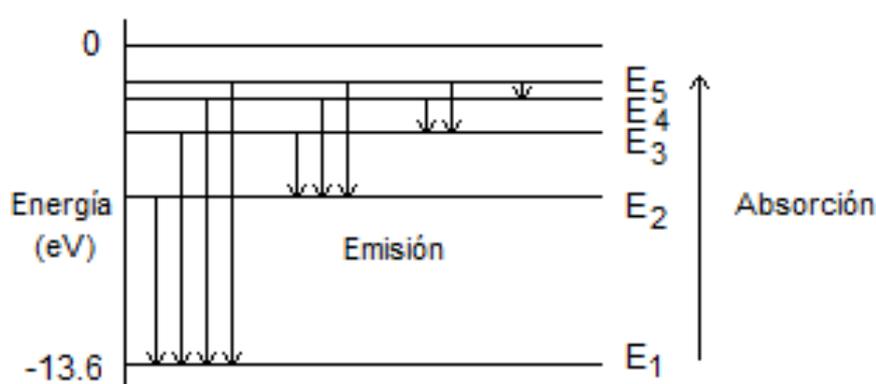


Figura 1-7 Esquema de Absorción y Emisión. Donde E_n son los niveles energéticos de un átomo.

La energía de la radiación electromagnética, absorbida o emitida, corresponde a la diferencia entre niveles energéticos del átomo y está dada por la siguiente ecuación:

$$E = h\nu = E_{final} - E_{inicial} \quad \text{Ecuación (1.1)}$$

En donde la h es la constante de Planck ($6.626 \times 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$) y ν es la frecuencia de la onda, la energía final se refiere a la energía del nivel excitado y la inicial al estado basal. Debido a que:

$$\nu = \frac{c}{\lambda} \quad \text{Ecuación (1.2)}$$

Entonces podemos relacionar la energía de la radiación con su longitud de onda

$$E = \frac{hc}{\lambda} \quad \text{Ecuación (1.3)}$$

Siendo que c es la velocidad de la luz en el vacío corresponde a $3 \times 10^8 \text{ ms}^{-1}$ aproximadamente. Si consideramos que el inverso de la longitud de onda ($1/\lambda$) se denomina número de onda en cm^{-1} ($\bar{\nu}$) entonces otra expresión de la energía de la radiación electromagnética sería

$$E = hc\bar{\nu} \quad \text{Ecuación (1.4)}$$

A partir de esta expresión podemos decir que la energía emitida por un átomo excitado ocurre en determinadas longitudes de onda están relacionadas con la energía de los orbitales. Ya los orbitales son característicos de los elementos, un espectro de emisión tendrá longitudes de onda características del elemento en cuestión. Bohr propuso así un modelo capaz de predecir las longitudes de onda del espectro de líneas discretas a partir del átomo de hidrógeno.

Las líneas de resonancia observadas en un espectro de emisión son las más intensas debido a que se producen por la transición de los electrones a partir de estados basales.

Si se proporciona suficiente energía a un átomo, éste puede ser ionizado. Un ion también puede ser excitado, teniendo de nuevo una gama de transiciones diferentes

a las del átomo y creando así un espectro de emisión. Esta etapa dependerá de la temperatura de la fuente de energía así como de la energía de ionización de los elementos.

1.6.2 Equipo de ICP-OES

Los componentes básicos de un equipo de ICP-OES son el sistema de introducción de muestra que incluye nebulizador, cámara de rocío, inyector y antorcha; y por otro lado se tiene el espectrómetro formado por los dispositivos dispersores de la luz, espejos y detector. Sin embargo, el diseño del equipo puede variar. A continuación se muestra un esquema de un equipo de ICP-OES con todos sus componentes.

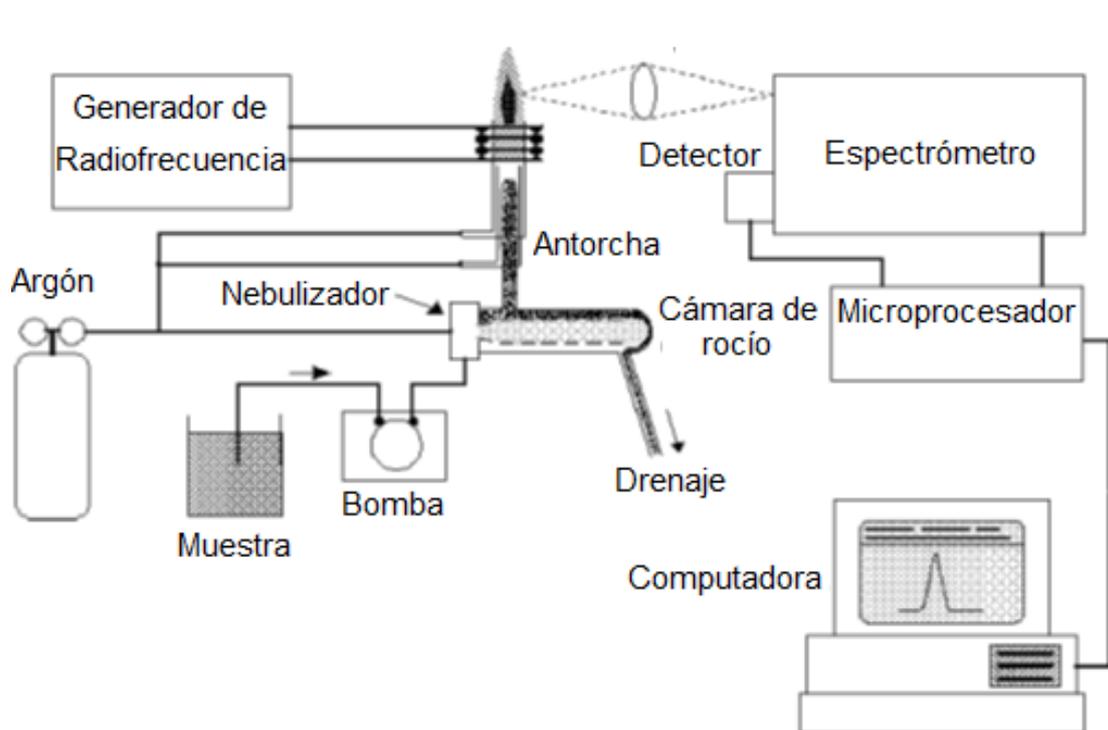


Figura 1-8. Diagrama de un equipo de ICP-OES ⁽¹⁷⁾

La muestra líquida se transporta al instrumento por medio de una bomba peristáltica con un flujo aproximado de 1 mL/min. La bomba consta de rodillos que giran y al estar en contacto con los tubos que llevan a la muestra, la van empujando por un mecanismo que se denomina peristalsis. Así la muestra llega al nebulizador en donde se convierte en un aerosol primario utilizando un flujo de argón, formando

gotas que varían de tamaño hasta más de 100 μ m en diámetro. Posteriormente, el aerosol primario pasa por una cámara de rocío en donde las gotas se seleccionan y sólo pasan las que tienen un diámetro de 10 μ m aproximadamente. El resto del líquido va hacia los desechos. El aerosol, ahora más homogéneo, es arrastrado por argón al inyector el cual lo conducirá a la antorcha. Así, la muestra llega al plasma el cual es la fuente de excitación. Ya en el plasma, primeramente la muestra es desolvatada y se convierte en un aerosol seco. Las partículas entonces son vaporizadas, atomizadas y en la mayoría de los elementos ionizadas. Los iones y los átomos se excitan y sus electrones van hacia niveles superiores de energía. Conforme la muestra sigue su camino, los átomos regresan a estados energéticos menores hasta llegar a su estado basal emitiendo energía en forma de fotones en el proceso. La luz es captada por un espejo convexo y dirigida al espectrómetro. Aquí la luz es dirigida hacia una rejilla difractora, una rejilla Echelle o cualquier otro dispositivo dispersivo similar. Una vez que la luz se separó en sus diferentes longitudes de onda, llega al detector. En este paso los fotones se transforman en señales eléctricas y posteriormente a una medida de concentración.

1.6.2.1 Sistema de introducción de muestra

El diseño y los dispositivos utilizados en cada paso pueden variar de equipo a equipo. La introducción de la muestra es un paso crítico ya que el plasma sólo tolera gotas pequeñas. A pesar de las diferencias existentes en el sistema, la función es la misma: generar un aerosol fino para que logre llegar al plasma y pueda ser ionizado sin que el plasma se extinga. Los dispositivos utilizados para la introducción de la muestra actualmente tienen una eficiencia del 1-5% la cual dependerá de la muestra en sí y de la elección del sistema.

1.6.2.1.1 Nebulizador

El nebulizador es el encargado de convertir la muestra líquida en un aerosol para que pueda ser transportado al plasma. Para lograr el rompimiento del líquido en gotas pequeñas, proceso denominado nebulización, se han utilizado dos mecanismos en la técnica de ICP OES: por medio de fuerzas neumáticas y ultrasónicas. Los nebulizadores más comunes son los neumáticos y utilizan una

corriente de gas a alta velocidad que es la generadora del aerosol. El flujo utilizado en estos nebulizadores es de 1 L/min aproximadamente y los más comunes son los siguientes:

Nebulizador concéntrico: la muestra pasa por un capilar que está contenido en un tubo más grande. La nebulización ocurre debido al gas que fluye a alta velocidad alrededor del capilar y a la baja presión que se genera. A pesar de que brinda sensibilidad y estabilidad, suele taparse debido al diámetro del capilar. El nebulizador microconcéntrico funciona bajo el mismo principio, pero muestra ventajas como lo es la resistencia a HF y menores gastos volumétricos de muestra (0.1 mL/min a comparación de 1-3 mL/min de nebulizador concéntrico)

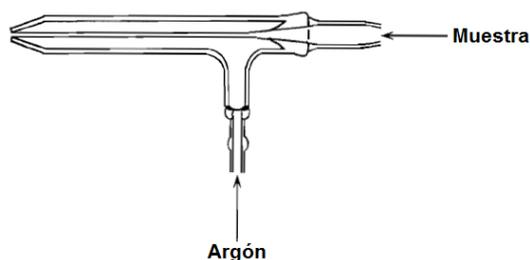


Figura 1-9. Nebulizador concéntrico (Meinhard) ⁽¹⁷⁾

Nebulizador de flujo cruzado: el gas fluye por un capilar con punta de rubí el cual está colocado perpendicularmente al capilar con punta de zafiro por el que fluye la muestra. Debido a que el capilar es de mayor diámetro tiene menos sensibilidad que el nebulizador concéntrico, sin embargo no se tapa tan fácilmente. La distancia a la cual se encuentran los capilares uno del otro suele ser crítica para la eficiencia de nebulización.

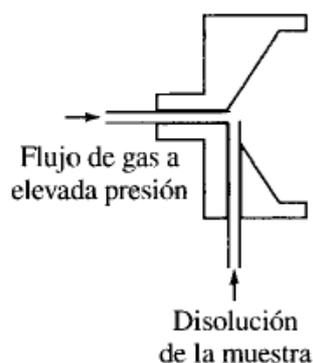


Figura 1-10. Nebulizador de flujo cruzado ⁽¹⁸⁾

Nebulizador Babington: la muestra líquida fluye por una superficie lisa con un agujero por el cual sale el gas a alta velocidad y de manera perpendicular al líquido. El impacto del gas con la muestra forma el aerosol. Existen diversos diseños que utilizan este mismo principio de nebulización como lo son el nebulizador Babington modificado y el de cono.

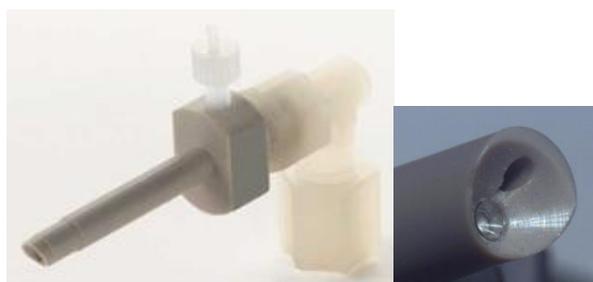


Figura 1-11. Nebulizador de cono (GemCone) ⁽¹⁹⁾

Los nebulizadores ultrasónicos operan bajo otro principio ⁽²⁰⁾. El aerosol se genera por las oscilaciones de un transductor piezoeléctrico por el cual pasa la muestra. La eficiencia es del 10-20% y debido a que mayor cantidad de muestra llega al plasma (ICP), los límites de detección suelen ser más bajos.

1.6.2.1.2 Cámara de rocío

Una vez que la muestra es nebulizada, debe pasar al inyector y posteriormente al plasma. El plasma es sensible al tamaño de las gotas, las cuales si son muy grandes pueden apagarlo. La función de una cámara de rocío es seleccionar las gotas del aerosol producido por el nebulizador de tal manera que sólo las más pequeñas lleguen al plasma así como suavizar los pulsos ocasionados por la bomba

persitáltica (si es utilizada). Así se tiene una introducción de muestra constante y uniforme. Es importante mencionar que sólo pasan las gotas menores a 10 μm de diámetro, lo que representa del 1 al 5% de la muestra. Una cámara de rocío debe tener las siguientes características para que cumpla su función de manera eficiente: debe tener una superficie grande que permita la colisión y fragmentación del aerosol, fácil remoción de la muestra condensada y mínimo volumen muerto para evitar la dilución de la muestra. Suelen ser de dos tipos, de doble paso y cámara ciclónica.



Figura 1.12 Cámara de rocío ciclónica. ⁽¹⁹⁾

1.6.2.1.3 Antorcha

La antorcha está diseñada con tres tubos concéntricos por los que pasan tres flujos de argón. Entre el tubo exterior y el intermedio hay un espacio estrecho por el cual el argón circula a una alta velocidad y de manera tangencial alrededor de la antorcha. Este flujo tiene como función mantener las paredes de la antorcha frías y se le conoce como flujo del plasma o flujo externo. Los flujos más comunes para ICP OES son de 7-15 L/min.

En el espacio intermedio, alrededor del inyector, el argón fluye por debajo del toroide del plasma y mantiene la descarga del plasma lejos de los tubos intermedio y del inyector. A este flujo se le conoce como auxiliar o intermedio y por lo general es de 1 L/min. Cuando se trabaja con muestras orgánicas, el flujo auxiliar ayuda a reducir la formación de carbono en la punta del inyector.

Finalmente se tiene el flujo interno o nebulizador el cual es aproximadamente de 1 L/min y que transporta la muestra a través del inyector. El diámetro de salida del inyector es tan pequeño que el gas sale a una velocidad capaz de ocasionar un hoyo en el plasma. De esta manera, en la base del plasma se tiene una forma toroidal (como una dona). La capacidad de introducir la muestra en el centro del plasma, es lo que le da al plasma ICP sus capacidades analíticas.

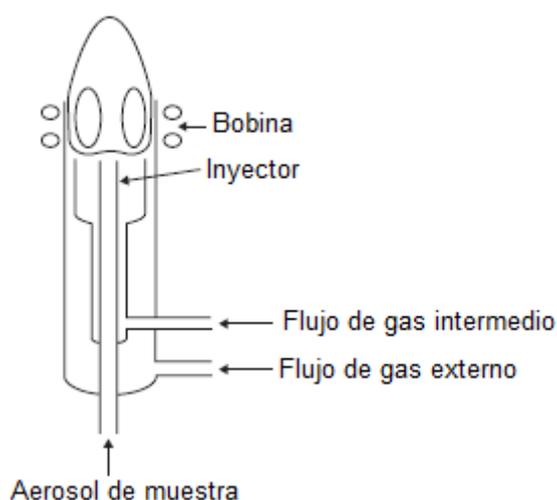


Figura 1-13. Esquema de una antorcha para ICP⁽²¹⁾

1.6.2.2 Formación del plasma

El plasma es la coexistencia de iones positivos, electrones y especies neutrales de un gas inerte, usualmente helio o argón. El plasma no está en equilibrio termodinámico y por tanto se tienen diferentes zonas con una temperatura característica cada una. El rango de temperaturas de un plasma generalmente va de 6000-10000K⁽¹⁷⁾. Existen diversos mecanismos para formar un plasma como lo son el plasma acoplado inductivamente (ICP), de corriente directa (DCP) e inducido por microondas (MIP); la diferencia radica en la manera de administrar la potencia. A continuación se describe el proceso de formación del ICP:

La antorcha está rodeada por una bobina de cobre que está conectada al generador de radiofrecuencia que está encargado de proveer la potencia para la generación y mantenimiento del plasma. Cuando la potencia se aplica a la bobina, una corriente alterna oscila dependiendo de la frecuencia del generador. La potencia va de 700 a

1500 kW, mientras que la frecuencia es de 27 o 40 MHz. Al aplicar la potencia se tiene un campo electromagnético en la parte superior de la antorcha cuyas líneas de fuerza están orientadas axialmente a la antorcha y siguen un patrón elíptico afuera de la bobina. Con el flujo de argón circulando en la antorcha como un remolino, se aplica una chispa momentáneamente con una bobina de Tesla que está en contacto con la antorcha por medio de una pieza de cobre. La chispa le quita electrones a los átomos de argón, dichos electrones son acelerados por el campo magnético y ganan energía por medio de la bobina de cobre (acoplamiento inductivo). Los electrones de alta energía chocan con otros átomos de argón quitándoles electrones continuando la ionización del argón en una reacción en cadena. El gas se convierte en plasma con átomos de argón, iones de argón y electrones. La descarga del ICP se sostiene en la antorcha y la bobina debido a que la energía del generador de radiofrecuencia es continuamente transferida. Lo que observamos es una bala luminosa blanca muy brillante y en la base tiene una forma de dona (toroidal) debido a que el flujo del nebulizador hace un hoyo en el plasma para llevar a la muestra a su centro. En la Figura 1.13 se esquematiza el proceso de formación del plasma.

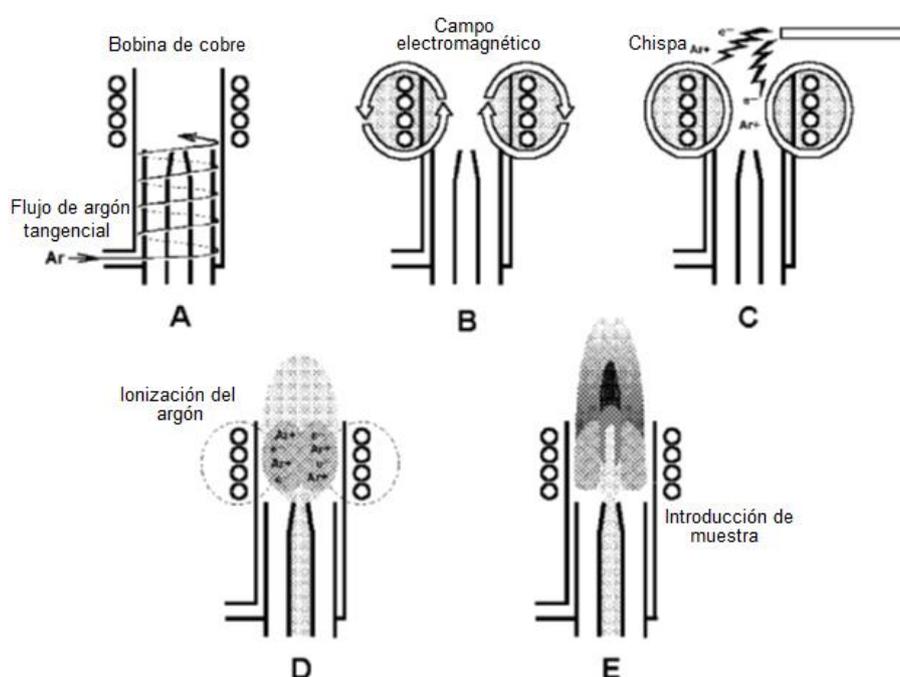


Figura 1-14. Esquema de la secuencia de ignición del plasma acoplado inductivamente. **A.** Un flujo de argón tangencial pasa entre el tubo externo y central de la antorcha. **B.** La potencia es aplicada a la bobina de cobre. **C.** Una chispa produce electrones libres. **D.** Los electrones libres son acelerados por el campo magnético causando ionización del gas, formando el plasma. **E.** El plasma está formado y la muestra es introducida en el centro del plasma. ⁽¹⁷⁾

En el plasma se han denominado diferentes zonas a las cuales se les ha nombrado dependiendo de los fenómenos que se llevan a cabo. La base de la dona se le denomina la zona de inducción pues es donde se transfiere la energía inductiva. En esta zona se emite la mayor cantidad de luz blanca. En la siguiente figura se observa las diferentes temperaturas que se tienen en el plasma así como la nomenclatura de las diferentes zonas.

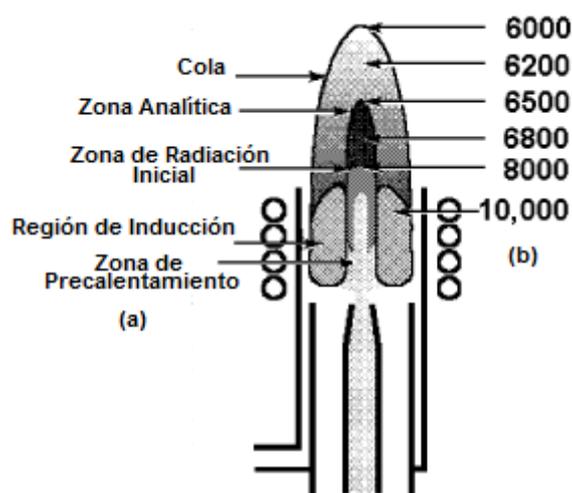


Figura 1-15. Esquema de las zonas del ICP (a) y de las temperaturas (K) (b) ⁽¹⁷⁾

1.6.2.2.1 La muestra en el plasma

La potencia que se aplica al plasma dependerá de la solución que vaya a ser analizada, para muestras acuosas se puede manejar una potencia de 1.1 a 1.3 kW mientras que para muestras orgánicas se incrementa debido a que la mayoría de disolventes orgánicos absorben más energía. El aerosol llega al centro del plasma lo que permite que esté expuesto a altas temperaturas por aproximadamente 2ms, además que no interfiere con la transferencia de energía entre la bobina y el plasma. Como primer paso hay un proceso de desolvatación en el cual el aerosol se seca y se tienen partículas microscópicas de sal. Posteriormente viene la descomposición de las partículas en un gas de partículas individuales, lo que se denomina vaporización. Después las moléculas se disocian en átomos durante la atomización. Estos tres procesos suceden en la zona de pre calentamiento. En la zona de radiación inicial sucede la excitación y la ionización, es decir, los electrones de los átomos absorben energía y son promovidos a niveles energéticos mayores y

en algunos casos se forman iones y éstos también se excitan. La ionización suele ser necesaria para muchos elementos ya que tienen sus líneas de emisión más marcadas a partir de iones excitados. Conforme la muestra se sigue desplazando y se dirige a la zona fría del plasma, las especies excitadas regresan a sus estados de menor energía y hasta su estado basal. Resultado de este proceso se emiten fotones y esta radiación es usualmente medida en la zona analítica normal.

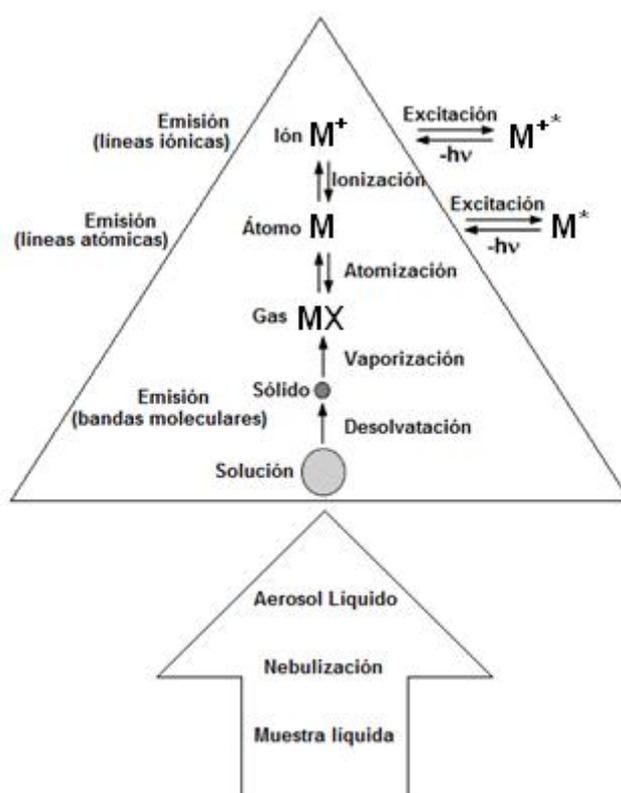


Figura 1-16. Pasos de la muestra líquida hacia el plasma.

1.6.2.3 Espectrómetro

La luz emitida debido a la excitación de los átomos presentes en la muestra se debe separar para su identificación y cuantificación. Al inicio del desarrollo de la técnica, la radiación era recolectada del lado del plasma a lo que se denomina vista radial. Posteriormente se desarrolló la vista axial en la cual la luz se recolecta directamente del centro del plasma, para minimizar el ruido de fondo y disminuir los límites de detección. La radiación emitida por los átomos, ya sea radial o axial, es recolectada por un espejo convexo y enfocada a una rendija de entrada hacia el espectrómetro. Una vez que la luz entra, pasa por una rejilla de difracción cuya función es separar

la luz en las diferentes longitudes de onda que la componen. Utilizar una rejilla de difracción es lo más común, sin embargo, también se han utilizado otros sistemas dispersivos como prismas, filtros o interferómetros. Una rejilla de difracción es un espejo con líneas grabadas en su superficie, para equipos de ICP-OES la rejilla suele tener de 600-4200 líneas por mm ⁽¹⁷⁾. La luz será difractada en un ángulo que dependerá de la longitud de onda y de la densidad de líneas de la rejilla. La radiación pasa de ser policromática a monocromática y así por medio de espejos es dirigida a la rendija de salida hacia el detector o detectores, dependiendo del caso. Cuando hay diversas salidas que permiten la detección de varias longitudes de onda se le llama policromador.

Actualmente, algunos equipos utilizan dos sistemas dispersivos colocados perpendicularmente para permitir una mejor separación de la luz ⁽¹⁷⁾ ⁽²⁰⁾ ⁽²²⁾. Por lo general, el primer dispositivo es una rejilla Echelle que suele tener menor densidad de líneas por mm que las rejillas comunes. Esta rejilla produce órdenes espectrales múltiples superpuestos. El segundo dispositivo dispersor puede ser un prisma o una rejilla y así se crea un patrón bidimensional que se denomina Echellograma. Estas características proporcionan ventajas al equipo como lo es la reducción del tamaño del mismo y una mejor resolución.

1.6.2.4 Detectores

La luz, una vez separada, se dirige al detector. Existen diferentes tipos de detectores los cuales han ido evolucionando. Uno de los primeros tipos de detectores utilizados fue el tubo fotomultiplicador; sin embargo, actualmente su uso se ha limitado a los equipos de absorción atómica y algunos equipos secuenciales de emisión atómica. De manera más reciente los detectores de estado sólido son utilizados en instrumento simultáneos. Los detectores que son de alta sensibilidad y resolución para aplicaciones espectroscópicas son el de arreglo de fotodiodo (PDA), el dispositivo de inyección de carga (CID) y el dispositivo de carga acoplada (CCD). EL CID y CCD están basados en las propiedades de fotosensibilidad del silicio en estado sólido y pertenecen a la familia de los dispositivos de transferencia de carga (CTD). ⁽¹⁷⁾

Una manera de ilustrar el principio de funcionamiento de los CTDs es con un bloque de silicio cristalino que tiene una capa aislante de dióxido de silicio. En el sustrato cada átomo de silicio está unido a otro en una red tridimensional y dicho enlace puede romperse cuando se suministra suficiente energía, como lo es la energía proveniente de fotones en la longitud de onda visible y ultravioleta. Cuando el enlace se rompe, un electrón se libera y queda un hueco en la estructura cristalina. Si se aplica voltaje a lo largo del bloque de silicio, los electrones se moverán en la dirección opuesta del campo eléctrico hacia la interfase silicio-dióxido de silicio mientras que los huecos se moverán en dirección opuesta a los electrones. El movimiento crea una corriente proporcional a los fotones que lleguen a la estructura. Los elementos CTDs son llamado pixeles cuyo tamaño va de 6 a 30 μm y cada pixel es capaz de almacenar una carga generada por los fotones. Los tipos de detectores se diferencian en la manera de obtener, interrogar y almacenar la carga.

Para un instrumento con una gradilla Echelle, se ha introducido un nuevo tipo de detector tipo CCD llamado dispositivo de cargas acopladas en arreglo segmentado (SCD). En este tipo de detectores se tienen colecciones individuales de pequeños subarreglos de 20 a 80 pixeles cada uno, con dimensiones 12.5 μm de ancho y 80 a 170 μm de altura la cual dependerá de la longitud de onda y el orden espectral de la línea espectral. Se tienen más de 200 de estos subarreglos en una base de silicio en un patrón bidimensional asociado con el echellograma.

1.6.3 Interferencias

Una interferencia es aquella que causa que la señal del analito en la muestra sea diferente a la señal del analito en la misma concentración en una solución de calibración. Debido a que éstas son un problema, las técnicas analíticas han ido evolucionando para minimizar las interferencias, aunque ninguna técnica está completamente libre de interferencias. Las interferencias pueden ser de distintos tipos.

1.6.3.1 Interferencias Espectrales

Las interferencias espectrales son las más estudiadas y suelen darse debido a los efectos de matriz. La solución suele ser incrementar la resolución del espectrómetro o seleccionar una línea de emisión alterna en donde no se observe alguna interferencia. Las interferencias espectrales pueden ser de tres tipos ⁽²⁰⁾

1. Coincidencia directa de la longitud de onda con otra línea espectral
2. Superposición parcial con una línea próxima
3. Variación lineal o no lineal en la emisión continua de fondo.

Los primeros dos tipos de interferencias pueden darse por otro elemento presente en la matriz, por la línea del argón o por especies moleculares como OH o N₂. En el caso del segundo tipo de interferencia, se suelen utilizar algoritmos matemáticos para resolverla. Si es posible identificar y cuantificar la interferencia, se deducen factores de corrección. Para corregir el tipo 3 se registra la emisión de fondo a ambos lados de la línea espectral y se le asigna una función matemática.

1.6.3.2 Interferencias Químicas

Debido a las altas temperaturas del ICP, los tiempos de residencia y la atmósfera inerte, las interferencias químicas por compuestos o radicales son escasas.

1.6.3.3 Efectos de Matriz

Las interferencias por efectos de matriz son usuales ya que las características de ésta afectarán cada paso del proceso por el que pasa la muestra. Los efectos de matriz incluyen interferencia por nebulización, por transferencia y desolvatación, química o de ionización y por atomización y volatilización. Sin importar la razón, cuando este tipo de interferencias está presente se detecta un cambio en la intensidad de la emisión. Uno de los aspectos importantes a considerar es la viscosidad de la muestra, la cual se puede deber a la naturaleza del solvente y de su concentración. Los diferentes constituyentes de la matriz alteran su viscosidad, tensión superficial o densidad lo que afecta la cantidad de muestra nebulizada. También se pueden presentar efectos de memoria generalmente asociados a los

capilares largos que se utilizan, así como la superficie de los materiales utilizados en el sistema de introducción de muestra.

1.7 Validación de Método Analítico

La validación es el proceso de establecer las características de desempeño y limitaciones de un método y la identificación de influencias que pueden cambiar dichas características y a qué grado. Dicho de otra manera es la verificación que un método es adecuado para su propósito. Los parámetros que generalmente se evalúan son: selectividad, linealidad, sensibilidad, exactitud, precisión, robustez y límite de detección.

1.7.1 Selectividad

Se refiere al grado en el que un método es capaz de identificar o cuantificar el analito en presencia de interferencias que usualmente se encuentran en la matriz. La prueba de selectividad se diseña de acuerdo al método a evaluar concentrándose en las interferencias que podrían ser encontradas. Esta prueba involucra usualmente el análisis de blancos de matriz ya que el método debe evaluarse en la presencia de otros analitos o de la matriz que pueden ser la fuente de la interferencia al momento de analizar las muestras.

1.7.2 Linealidad

Es la capacidad de un método de dar una respuesta proporcional a la cantidad de analito a determinar dentro de un intervalo. La linealidad se puede evaluar a partir de una gráfica de residuales producida por una regresión lineal de la respuesta contra la concentración de los estándares de calibración. Para establecer la curva de calibración se recomienda lo siguiente:

- Utilizar al menos 6 estándares de calibración
- Los estándares deben estar igualmente espaciados a lo largo del rango de interés

- El rango debe comprender del 0-150% o 50-150% del valor esperado en las muestras
- Los estándares de calibración deben ser evaluados por duplicado mínimo, y de preferencia por triplicado.

El criterio de aceptación para determinar la linealidad es el coeficiente de correlación (r). Este coeficiente indica el grado de relación entre la variable concentración (x) y la variable respuesta (y). En la práctica se busca que r sea cercano a uno siendo los valores aceptados $r \geq 0.99$ o $r \geq 0.999$.

1.7.3 Sensibilidad

Es el cociente entre el cambio de la respuesta y el cambio correspondiente en la concentración del analito. La sensibilidad corresponde a la pendiente en una regresión lineal de la curva de calibración.

1.7.4 Exactitud

Se define como la cercanía del resultado de prueba y el valor de referencia aceptado. Para evaluar este aspecto se puede recurrir a diferentes técnicas, una de las más recomendadas es el uso de materiales de referencia certificados; los cuales son trazables a un estándar internacional con una incertidumbre conocida. Para que sea aplicable el uso de estos materiales la matriz debe ser igual a los materiales a analizar. Cuando no se encuentran materiales de referencia certificados se puede utilizar un método de adiciones y recuperación. En este caso se le adiciona al material de prueba antes del análisis una masa conocida del analito. Se analiza el material en su estado original y también adicionado, la diferencia entre los resultados como una proporción de la masa adicionada se llama recuperación. Cuando el valor de recuperación es significativamente distinto a la unidad, hay alguna interferencia o error que afecta el método.

1.7.5 Precisión

Es la cercanía entre resultados independientes obtenidos bajo determinadas condiciones. Las medidas de precisión más comunes son la repetibilidad y reproducibilidad. La repetibilidad es la variabilidad cuando un método es llevado a cabo por un mismo analista y un mismo equipo en un periodo corto de tiempo. La reproducibilidad se mide cuando el método se ejecuta por diferentes laboratorios. La precisión se especifica en términos de la desviación estándar (DS) o desviación estándar relativa (DER).

1.7.6 Robustez

Es la medida de la capacidad de un procedimiento analítico de no ser afectado por variaciones pequeñas de los parámetros del método. El objetivo de esta prueba es optimizar el método desarrollado y establecer las condiciones bajo las cuales se pueden obtener resultados confiables.

1.7.7 Límite de detección

Es la cantidad o concentración más pequeña del analito en la muestra que puede ser confiablemente distinguida del cero. El límite de detección no necesita ser parte de la validación si en el sistema analítico no lo incluye o aproxima. El límite de detección se expresa como la concentración c_L derivada de la medida más pequeña x_L que puede ser detectada para un procedimiento analítico. El valor de x_L está dado por la Ecuación 1.5

$$x_L = \bar{x}_{bi} + kS_{bi} \quad \text{Ecuación 1.5}$$

En donde \bar{x}_{bi} es el promedio de mediciones del blanco, S_{bi} es la desviación estándar de las mediciones y k es un factor numérico escogido de acuerdo al nivel de confianza deseado.

2. Desarrollo Experimental

En esta sección se describen los diferentes pasos del desarrollo de la metodología, comenzando por la preparación de las muestras. Se trabajó con dos tipos de muestras, las larvas de campo provenientes de diferentes cadáveres y las larvas blanco obtenidas de un banco de moscas de la especie *Musca domestica* (Linn). En total se obtuvieron muestras de 3 cadáveres humanos distintos y 1 muestra de un cadáver de pollo. Las muestras del cadáver 1 y del pollo provenían del Estado de México, mientras que las muestras de los otros cadáveres eran del Distrito Federal. Debido a que nosotros no realizamos el muestreo y sólo recibimos las muestras, el número de larvas fue limitado. La disponibilidad en las muestras fue la determinante en cuanto al número de réplicas de cada muestra que se lograron digerir. Para la preparación de las muestras se eligió un horno de microondas pues es una matriz complicada. Posterior a la digestión de las muestras, se prosiguió con la selección y preparación de los estándares. El análisis se realizó con un equipo de Espectroscopía de Emisión Atómica con Plasma Acoplada Inductivamente (ICP-OES). Se inició con la calibración del equipo a partir de dos estándares múltiples preparados para realizar un estudio exploratorio. A partir de los primeros resultados obtenidos se propuso el intervalo de trabajo para los distintos elementos. Ya con la curva de calibración preparada se prosiguió con el análisis decisivo. Una vez que se obtuvieron los resultados de las muestras se hizo el análisis estadístico. A continuación se muestra el diagrama de flujo que contiene los pasos del desarrollo experimental.

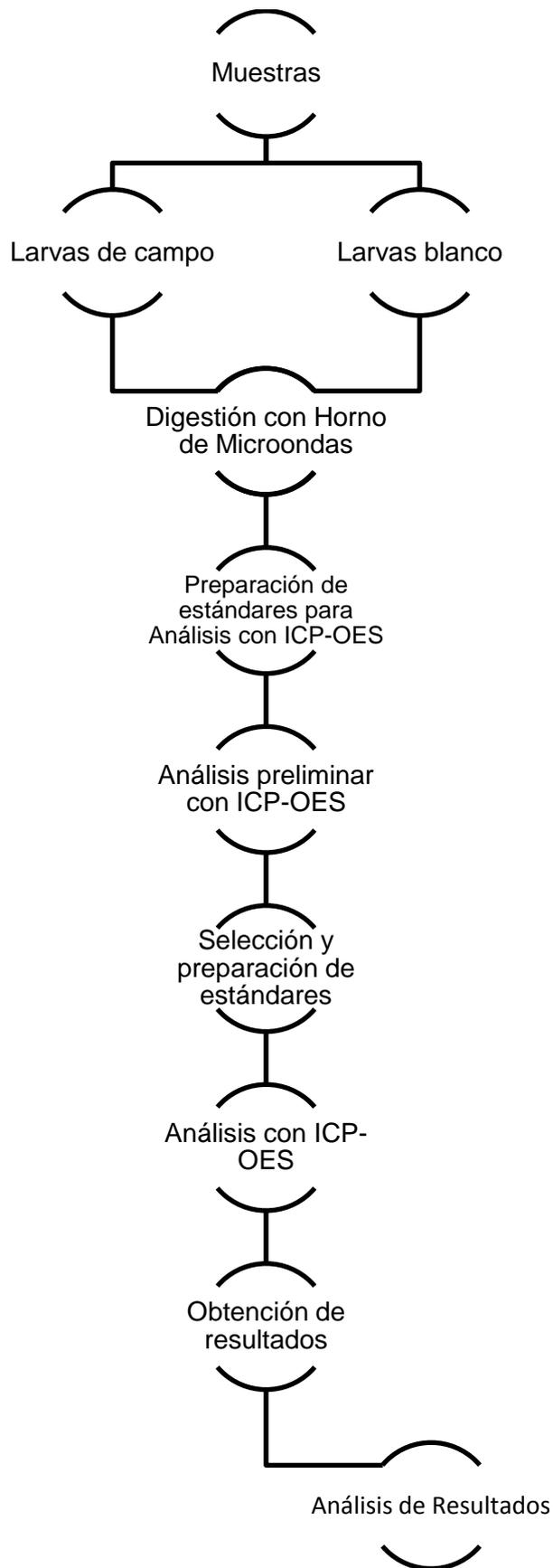


Figura 2-1. Diagrama de Flujo del Desarrollo Experimental

2.1 Digestión

Para la digestión se utilizó el siguiente material y reactivos:

- Agua desionizada
- HNO₃ ultrapuro marca J.T.Baker
- H₂O₂ al 30% marca RQF
- Horno de microondas AntonPaar Microwave3000
- Balanza Analítica marca Sartorius
- Pinzas quirúrgicas
- Vaso de plástico
- Matraces volumétricos 50mL
- Embudos
- Frascos

La muestra debe estar en disolución para que sea posible su análisis; sin embargo, las larvas son una matriz biológica complicada y por tanto se optó por utilizar un sistema de digestión con microondas. El equipo que se utilizó es de la marca AntonPaar el cual cuenta con dos tipos de carruseles, uno para 16 recipientes y otro para 48. También cuenta con una biblioteca que contiene las condiciones de digestión (tiempo, potencia, temperatura máxima, presión máxima y mezcla de ácidos) para diversas muestras. En esta ocasión se ocupó el carrusel para 16 recipientes debido a que son muestras biológicas y se requiere de una alta presión para su digestión. Se buscó en la biblioteca del equipo si había un método para la digestión de larvas, pero al no encontrarse se eligió el de ostión debido a la similitud de la muestra. Se hicieron correcciones en el volumen de los reactivos utilizados, en la ocasión en la que se utilizaron sólo 8 recipientes, y se guardó el programa con el nombre de Larvas. Las condiciones de digestión se muestran en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Condiciones del programa de digestión del horno de microondas.

Parámetro	Valor
Potencia	800W* 1600W
Incremento de presión	0.3 bar/seg
Temperatura máxima	170°C
Presión Máxima	8.0 bar
Rampa	10 min
Mantenimiento	10 min
Peso muestra	0.3000-0.4500g
Mezcla de reacción	4 mL HNO ₃ y 1mL H ₂ O ₂

*Cuando se utilizaron 8 recipientes, la potencia aplicada fue de 800W, mientras que cuando se utilizaron los 16 recipientes se aplicaron 1600W.

Se pesó de 0.3000 a 0.4500 g de las larvas en los tubos reactores con una balanza analítica. Posteriormente se llevaron los tubos a una campana de extracción y se agregó la mezcla de reacción. Dos de los tubos fueron los blancos reactivo, es decir, sólo se agregó la mezcla de reacción sin muestra. Se prosiguió a cerrar el sistema, se introdujo el carrusel en el horno y se inició el programa. El procedimiento se llevó a cabo en tres ocasiones diferentes. Cuando finalizó el programa de digestión, el carrusel se puso a enfriar en el horno con la puerta abierta y el extractor prendido. Posteriormente se pasó el carrusel a la campana de extracción en donde se trasvasó el contenido de los tubos cuantitativamente a matraces aforados de 50mL con la ayuda de embudos. Se aforó con agua desionizada y se trasvasó la solución a frascos nuevos. Las muestras se identificaron de acuerdo al tipo de muestra: blanco (B), pollo (P) y Cadáver (C1-C3), y los duplicados de las muestras se denotaron con letras minúsculas.

2.2 Selección y preparación de estándares

Para llevar a cabo la preparación de estándares se utilizó el siguiente material y reactivos:

- Agua desionizada
- Estándares Multielementales de Calibración PerkinElmer
- Estándar S-21 PerkinElmer
- Matraces volumétricos 50mL y 25mL
- Pipeta
- Micropipeta 50, 100, 500 y 1000 μ L
- Frascos

Al inicio se propuso la preparación de dos estándares de 0.1 ppm y de 1.0 ppm a fin de detectar qué elementos podrían estar presentes en las muestras. Se prepararon 25mL de cada estándar en matraces volumétricos a partir de estándares multielementales de concentración de 10ppm. Posteriormente, de acuerdo a los primeros resultados, se realizó una curva de calibración con estándares de 0.05, 0.1, 0.5 y 1.0 ppm a partir de los estándares multielementales de 10 ppm. Para poder continuar la curva de calibración para los elementos presentes en mayor concentración, se prepararon estándares de 5.0, 10.0 y 20.0 ppm a partir del estándar S21 y se les agregó sodio y silicio a los estándares. Debido a que en la primera prueba se observó interferencia espectral con el fósforo, se realizaron dos estándares individuales de fósforo de concentraciones de 1.0 y 10.0 ppm. Los estándares se prepararon en matraces volumétricos de 50mL y de 25mL.

Para preparar los estándares, primero se realizó el cálculo para conocer la alícuota de los estándares madre que se debía agregar en cada caso. La fórmula que se utilizó fue la siguiente:

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad \text{Ecuación (2.1)}$$

Donde:

$$C_1 = 10 \text{ ppm} \quad C_2 = 0.05 \text{ ppm} \quad V_2 = 50 \text{ mL}$$

Entonces

$$V_1 = \frac{(0.05 \text{ ppm}) * (50 \text{ mL})}{10 \text{ ppm}} = 0.250 \text{ mL} \left(\frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} \right) = 250 \mu\text{L}$$

Para cada uno de los estándares se realizó el cálculo.

2.2.1 Validación

Debido a que no se cuenta con material de referencia certificado, se consideró adicionar algunas muestras. Se agregaron 500 μ L de los estándares múltiples de 10ppm a las muestras previas a su digestión. Al momento del aforo final se tuvo una concentración nominal de 0.1ppm del estándar adicionado en la muestra. En el caso del mercurio se adicionaron 50 μ L de un estándar de 1000 ppm para obtener una concentración final de 1 ppm en las muestras. Esto permitirá identificar las posibles interferencias de matriz y verificar la exactitud al momento del análisis.

Una vez realizado un análisis previo, se observó que en el caso de algunos elementos mayoritarios la concentración adicionada fue muy pequeña e impidió obtener un porcentaje de recuperación adecuado. Por tanto se añadió una concentración final de 100ppm de sodio, potasio, fósforo y calcio.

Los otros parámetros relacionados a la validación del método se determinaron a partir de las curvas de calibración, así como de la pendiente, de la desviación estándar (DE) y de la desviación estándar relativa (DER)

2.3 Análisis

Para el análisis se utilizó un equipo de ICP-OES PerkinElmer Optima 4300 DV. Es un equipo de detección simultánea que cuenta con visión axial y radial y es posible ajustar la visión en el plano vertical y horizontal. Cuenta con una rejilla Echelle y un detector tipo SCD el cual opera a -40° C. Se armó el sistema de introducción de

muestra con un nebulizador GemCone, una cámara de rocío ciclónica y un inyector para muestras inorgánicas. El inyector para muestras inorgánicas es de alúmina con un diámetro de 2.0mm. El equipo se opera por medio del software en una computadora.

Primero se encendió el recirculador, posteriormente se abrió el tanque de gas argón de alta pureza, se encendió el equipo y se abrió el software WinLab32 en la computadora. El equipo necesitó aproximadamente 4 horas para que el espectrómetro estuviera listo y el detector estuviera a la temperatura de operación.

En el software se creó un método para el análisis de las muestras a partir de las condiciones para muestras inorgánicas. Posteriormente se dio de alta cada uno de los elementos a detectar con sus longitudes de onda recomendadas. Una vez realizado el primer análisis exploratorio, se identificaron los elementos mayoritarios y se modificó el método agregando todas las longitudes de onda detectables para dichos elementos. Se introdujo la información de los estándares preparados, con la concentración para cada uno de los elementos. También se introdujo la información referente a las muestras: identificación, peso y volumen de preparación. Cada 10 muestras se leyó el blanco y el estándar intermedio para verificar la calibración. Se realizaron 7 réplicas para cada muestra. Una vez que toda la información estaba ya en el software se guardó el método con el nombre de Larvas. En el Anexo 1 se describe detalladamente el procedimiento para la elaboración del método.

Una vez que se introdujeron los parámetros se prosiguió a encender el plasma, Se enjuagó el sistema con agua desionizada por 5 minutos aproximadamente. Se generó un archivo de resultados. Después de realizó la alineación X-Y con una solución de manganeso de 1 ppm. El equipo automáticamente ajusta la posición a la cual la lectura es máxima. Esta prueba permitió confirmar que las condiciones de operación fueron las óptimas, dichas condiciones se muestran en la Tabla 2.2. Se registró el resultado final de la prueba de alineación y se prosiguió a realizar la calibración. Ya que se verificó que la curva de calibración tenía un coeficiente de correlación mayor o igual a 0.99, se analizaron las muestras.

Tabla 2.2. Condiciones de operación del equipo ICP-OES

Parámetro	Valor
Flujo de plasma	15 L/min
Flujo Auxiliar	0.2 L/min
Flujo del Nebulizador	0.50 L/min
Potencia	1300 W
Bomba Peristáltica	1.5 mL/min

3. Resultados

3.1 Resultados de Elementos Mayoritarios y Minoritarios de las Muestras

Los resultados se presentan divididos en tres grupos dependiendo de la concentración de los elementos en las muestras. A continuación en las Tablas 3.1 a 3.5 se muestran los elementos mayoritarios y en las Tablas 3.6-3.10 los elementos minoritarios para cada una de las muestras. Debido a que se analizaron todos los elementos que permite el equipo, los elementos que se detectaron a nivel traza se presentan en el Anexo 2 con sus respectivos límites de cuantificación. Los resultados se seleccionaron a partir de su desviación estándar relativa (DER) resultante de la concentración calculada por el equipo, siendo seleccionados aquéllos con una DER menor a 10%. El valor de DER fue seleccionado de acuerdo a las recomendaciones de la IUPAC. En las tablas se presentan las concentraciones de cada elemento para cada muestra, así como el intervalo de concentraciones obtenido. Al final se muestran gráficas en donde se compara la concentración de cada tipo de muestra para los elementos mayoritarios (Gráfica 3.1) y los elementos minoritarios (Gráfica 3.2). Para cada caso se tomó el mayor valor del intervalo de concentraciones presentado en las Tablas 3.1-3.10

Elemento	Longitud de onda (nm)	Concentración Muestra (mg/kg)					
		a	b	c	d	e	Intervalo
P	213.617	2455.0	2766.0	1204.0	2896.0	3737.0	1204.0-3737.0
K	766.490	2311.2	2685.9	883.7	1855.0	2033.0	883.7-2685.9
Na	589.592	1319.0	1431.0	332.3	740.9	739.4	332.3-1431.0
Ca	317.933	926.8	1271.0	633.9	2480.0	3676.0	633.9-3676.0
Mg	285.213	605.6	632.5	118.5	323.1	485.0	118.5-632.5

Tabla 3.1 Elementos Mayoritarios de las Muestras consideradas como Blanco.

Elemento	Longitud de onda (nm)	Concentración Muestra (mg/kg)			
		a	b	c	Intervalo
Na	589.592	2390.0	2502.0	2212.0	2212.0-2502.0
K	766.490	2336.0	2399.0	2290.0	2290.0-2399.0
P	213.617	2288.0	2395.0	2373.0	2288.0-2395.0
Ca	317.933	463.1	383.3	372.5	372.5-463.1
Fe	238.204	293.3	115.5	72.1	72.1-293.3
Mg	285.213	251.2	257.0	253.2	251.2-257.0
Si	251.611	155.1	47.8	25.7	25.7-155.1

Tabla 3.2 Elementos Mayoritarios de las Muestras de Pollo

Elemento	Longitud de onda (nm)	Concentración Muestra (mg/kg)		
		a	b	Intervalo
K	766.490	2698.0	3202.0	2698.0-3202.0
Na	589.592	2651.0	2988.0	2651.0-2988.0
P	213.617	2452.0	2719.0	2452.0-2719.0
Ca	317.933	1150.0	1149.0	1149.0-1150.0
Mg	285.213	419.1	422.4	419.1-422.4
Si	251.611	371.8	294.5	294.5-371.8
Fe	238.204	317.8	332.8	317.8-332.8

Tabla 3.3 Elementos Mayoritarios de las Muestras del Cadáver 1

Elemento	Longitud de onda (nm)	Concentración Muestra (mg/kg)
P	213.617	2716.0
K	766.490	2275.6
Na	589.592	1559.0
Ca	317.933	781.0
Mg	285.213	479.7
Fe	238.204	137.0

Tabla 3.4 Elementos Mayoritarios de la Muestra del Cadáver 2. (Para esta muestra sólo se presenta un resultado debido a que la cantidad de muestra fue pequeña)

Elemento	Longitud de onda (nm)	Concentración Muestra (mg/kg)					
		a	b	c	d	e	Intervalo
P	213.617	2454.0	2347.0	2193.0	2435.0	2180.0	2180.0-2454.0
K	766.490	2135.0	1991.0	1881.0	2093.0	2018.0	1881.0-2135.0
Na	589.592	1824.0	1746.0	1597.0	1756.0	1683.0	1597.0-1824.0
Ca	317.933	318.1	280.6	386.2	366.1	276.7	276.7-386.2
Mg	285.213	294.2	246.1	303.6	318.6	247.4	246.1-318.6
Fe	238.204	59.2	48.7	36.6	33.0	54.1	33.0-59.2

Tabla 3.5 Elementos Mayoritarios de la Muestras del Cadáver 3

Elemento	Longitud de onda (nm)	Concentración Muestra (mg/kg)					
		a	b	c	d	e	Intervalo
Fe	238.204	57.1	54.4	<LOD*	<LOD	<LOD	<LOD-57.1
Si	251.609	32.2	21.5	14.6	14.4	44.3	14.4-44.3
Zn	206.02	34.5	40.1	2.7	12.1	8.9	2.7-40.1
Cr	267.706	6.3	4.8	0.5	1.8	8.3	0.5-6.3
Al	396.153	3.7	3.8	22.0	10.7	29.2	3.7-29.2

Tabla 3.6 Elementos Minoritarios de las Muestras consideradas como Blanco.

*<LOD significa por debajo del límite de detección el cual es 0.0019 mg/Kg

Elemento	Longitud de onda (nm)	Concentración Muestra (mg/kg)			
		a	b	c	Intervalo
Al	396.153	59.2	26.0	26.3	26.3-59.2
B	249.677	59.4	8.1	0.3	0.1-59.4
Zn	206.02	24.3	22.5	20.6	20.6-24.3
Rb	780.023	5.9	6.4	5.8	5.8-6.4
Ba	233.527	2.2	1.8	1.7	1.7-2.2
Sr	407.771	1.8	1.4	1.3	1.3-1.8

Tabla 3.7 Elementos Minoritarios de las Muestras de Pollo.

Elemento	Longitud de onda (nm)	Concentración Muestra (mg/kg)		
		a	b	Intervalo
Al	396.153	446.4	428.1	428.1-446.4
Zn	206.02	37.0	50.7	37.0-50.7
B	249.677	29.9	18.6	18.6-29.9
Rb	780.023	7.6	7.9	7.6-7.9
Ba	233.527	3.4	3.2	3.2-3.4
Sr	407.771	3.1	2.7	2.7-3.1

Tabla 3.8 Elementos Minoritarios de las Muestras del Cadáver 1

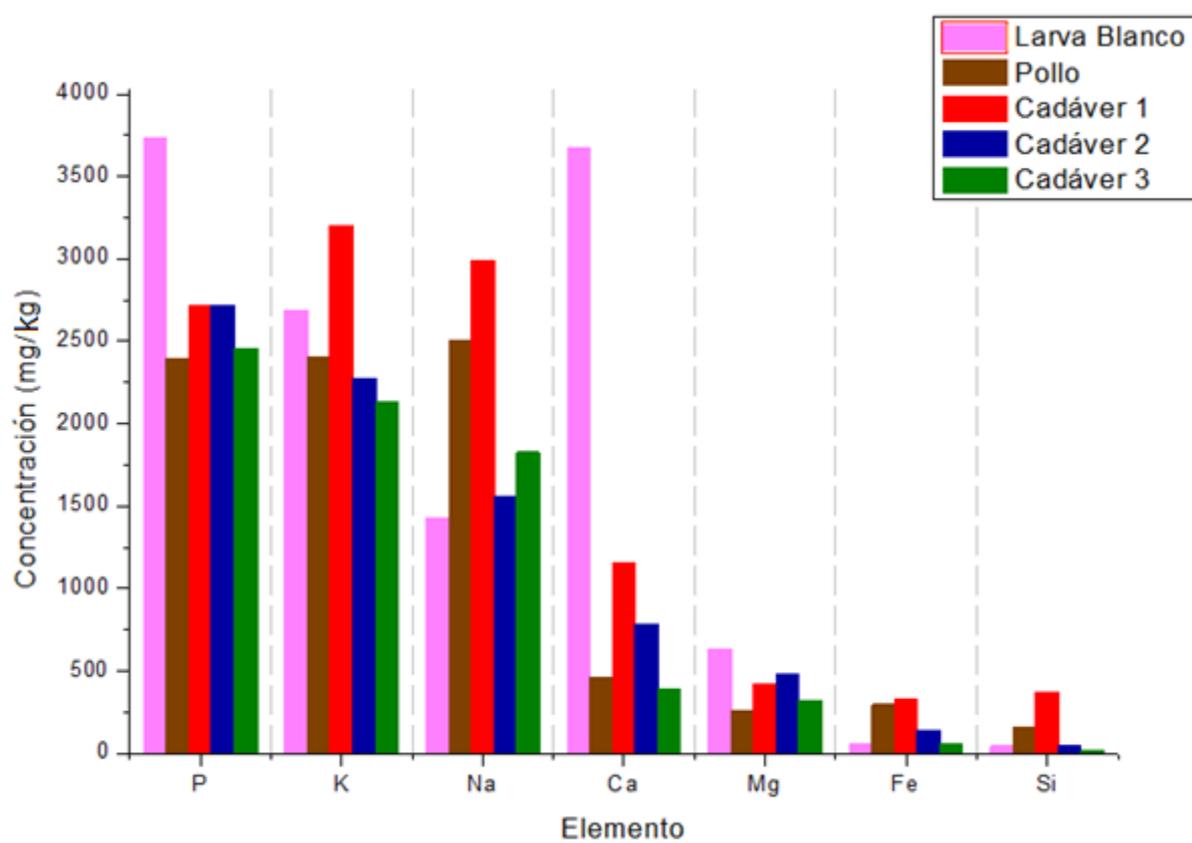
Elemento	Longitud de onda (nm)	Concentración Muestra (mg/kg)
B	249.677	37.2
Al	396.153	18.8
Cr	267.706	4.5
Sr	407.771	0.6
Si	251.609	48.2
Zn	206.02	43.9

Tabla 3.9. Elementos Minoritarios de la Muestra del Cadáver 2

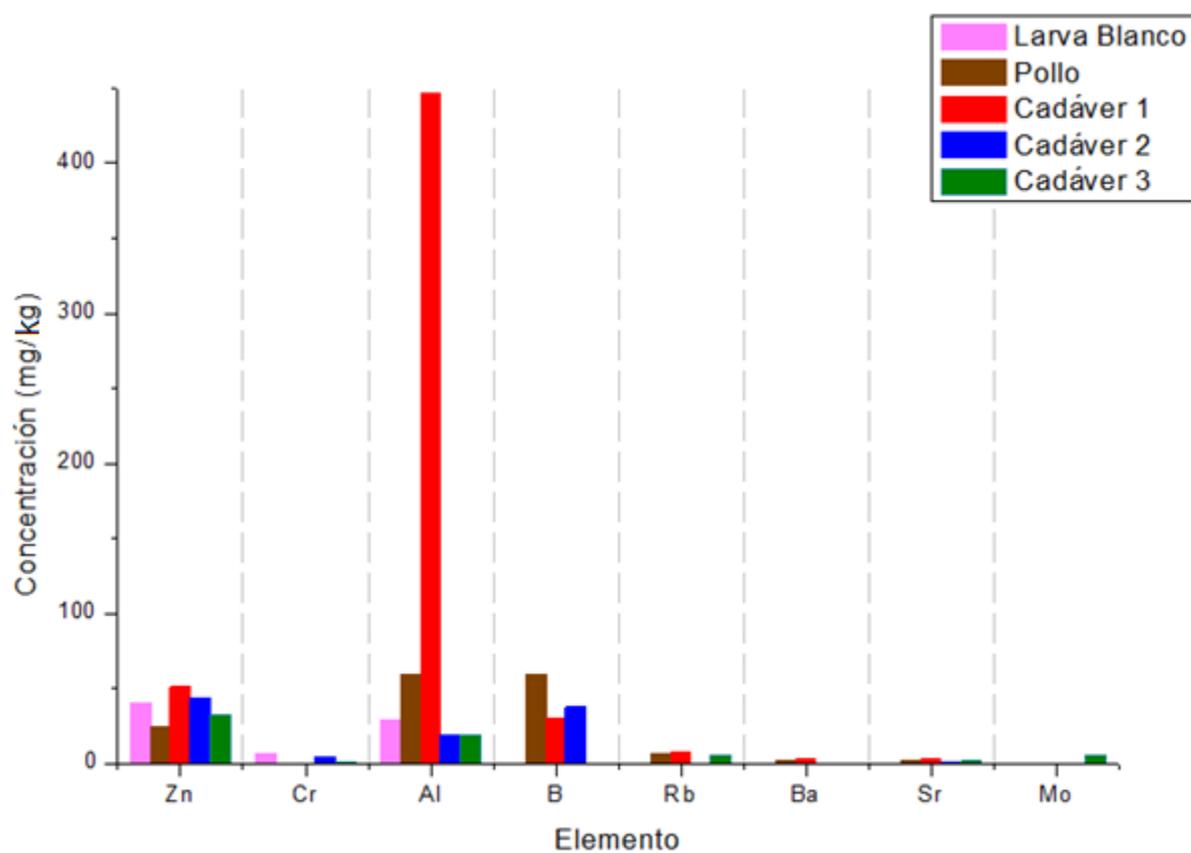
Elemento	Longitud de onda (nm)	Concentración Muestra (mg/kg)					Intervalo
		a	b	c	d	e	
Zn	206.02	32.2	27.3	27.5	25.3	29.4	27.3-32.2
Al	396.153	12.8	18.6	13.8	12.2	9.2	9.2-18.6
Si	251.609	9.7	15.2	10.2	9.9	12.2	9.7-15.2
Mo	202.033	<LOD*	<LOD	<LOD	5.5	<LOD	<LOD -5.5
Rb	780.023	<LOD	5.1	LOD	5.5	<LOD	<LOD -5.5
Sr	407.771	0.7	0.7	0.6	1.3	0.7	0.6-1.3
Cr	267.706	0.9	0.9	0.6	0.4	0.4	0.4-0.9

Tabla 3.10 Elementos Minoritarios de las Muestras del Cadáver 3.

*<LOD significa por debajo del límite de detección el cual es 0.0125 mg/Kg en el caso del molibdeno y 0.0147 mg/Kg para el rubidio.



Gráfica 3.1 Elementos Mayoritarios de cada Muestra



Gráfica 3.2 Elementos Minoritarios de cada Muestra

3.2 Validación parcial

En esta sección se muestran los diferentes parámetros relacionados a la validación del método como lo son la linealidad, repetibilidad, reproducibilidad y robustez. Debido a que es un desarrollo no fue posible evaluar todos.

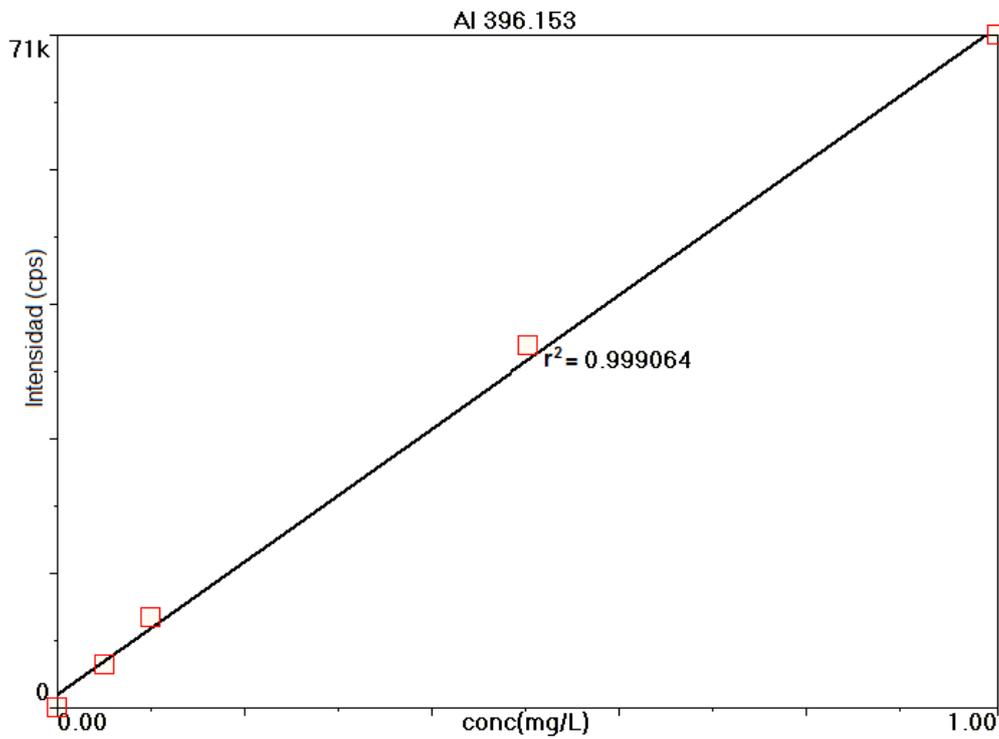
3.2.1 Linealidad y Sensibilidad

En la Tabla 3.11 se presenta el resumen de las curvas de calibración para los elementos mayoritarios y minoritarios contenidos en las muestras. La linealidad se evalúa a partir del coeficiente de correlación (r^2) que se busca sea cercano a 1. La sensibilidad está dada por la pendiente de la curva de calibración, pues es el cociente del cambio de la intensidad entre el cambio correspondiente de concentración.

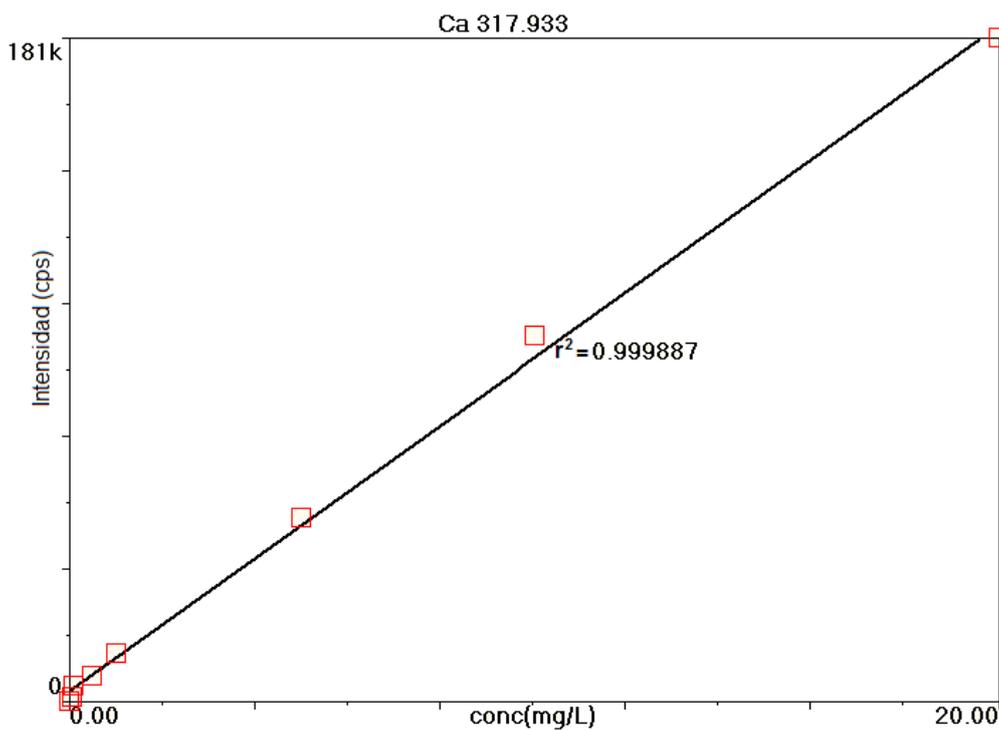
Elemento	Concentración de Estándares (ppm)							r^2	Pendiente (cps/ppm)
	0.05	0.1	0.5	1.0					
Al	0.05	0.1	0.5	1.0				0.999	70110
B	0.05	0.1	0.5	1.0				0.999	4890
Ba	0.05	0.1	0.5	1.0				0.999	15830
Ca	0.05	0.1	0.5	1.0	5.0	10.0	20.0	0.998	9069
Cr	0.05	0.1	0.5	1.0	5.0	10.0	20.0	0.999	4569
Fe	0.05	0.1	0.5	1.0	5.0	10.0	20.0	0.999	7850
K	0.05	0.1	0.5	1.0				0.999	105800
Mg	0.05	0.1	0.5	1.0	5.0	10.0	20.0	0.999	42700
Na	0.05	0.1	0.5	1.0	5.0	10.0		0.999	181400
P	1.0	10.0						0.999	66.79
Rb	0.05	0.1	0.5	1.0				0.999	14280
Si	0.05	0.1	0.5	1.0	5.0	10.0	20.0	0.996	3799
Sr	0.05	0.1	0.5					0.999	7811000
Zn	0.05	0.1	0.5	1.0	5.0	10.0		0.999	2631

Tabla 3.11 Parámetros de Linealidad y Sensibilidad

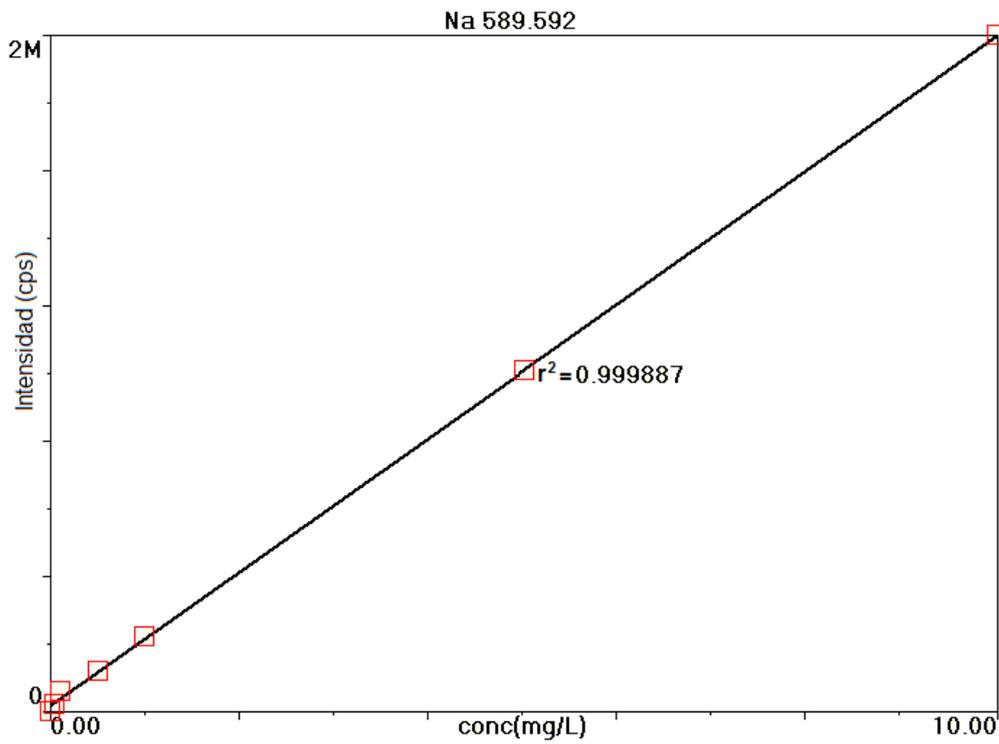
A continuación se muestran las curvas de calibración para algunos elementos a manera de ejemplo. Los puntos de calibración tomados para realizar la regresión lineal fueron los indicados en la Tabla 3.11.



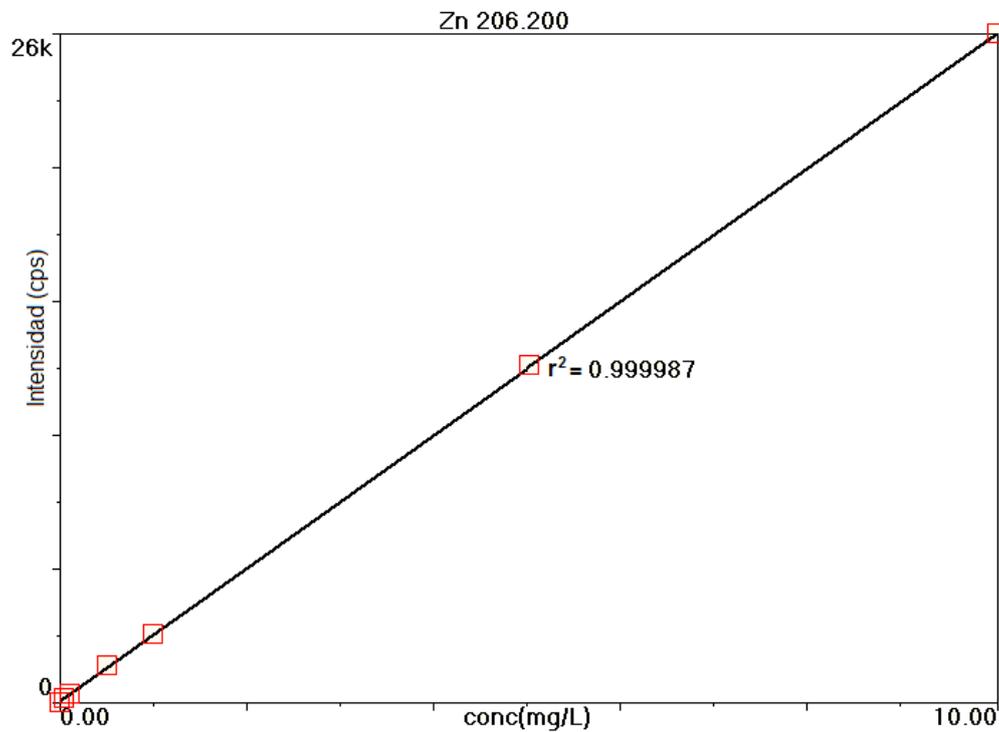
Gráfica 3.3 Curva de calibración del aluminio a 396.153nm.



Gráfica 3.4 Curva de calibración del calcio a 317.933nm.



Gráfica 3.5 Curva de calibración del sodio a 589.592nm.



Gráfica 3.6 Curva de calibración del zinc a 206.200nm.

3.2.2 Exactitud

La Tabla 3.12 contiene los resultados de los porcentajes de recuperación (% Rec.) de los elementos mayoritarios y minoritarios analizados para las muestras blanco. Se incluyen elementos que podrían ser considerados para otras aplicaciones en el área forense en el caso de intoxicación por metales pesados o residuos de disparo. Este parámetro de validación se evaluó con el método de adiciones debido a la falta de material de referencia certificado.

Elemento	C _a (mg/L)	C _{na} (mg/L)	% Rec	Elemento	C _a (mg/L)	C _{na} (mg/L)	% Rec
Al	0.178	0.090	88	Mg	1.095	0.976	119
As	0.091	0.008	83	Na	96.3	7.2	89
B	0.094	<LOD	94	P	107	15.09	92
Ba	0.101	<LOD	101	Pb	0.099	<LOD	99
Ca	87.4	6.4	81	Rb	0.113	0.015	98
Cr	0.185	0.077	108	Sb	0.145	0.044	101
Fe	0.436	0.324	112	Si	0.322	0.207	115
Hg	0.932	1.28*10 ⁻⁵	93	Sr	0.116	0.015	101
K	100.1	19.3	81	Zn	0.150	0.049	101

Tabla 3.12 Porcentajes de Recuperación de Elementos Mayoritarios, Minoritarios y de Posible Importancia Forense en las Muestras Blanco. <LOD significa que el elemento se encuentra por debajo del límite de detección el cual se muestra en el Anexo 2

La fórmula utilizada para el cálculo de recuperación fue la siguiente:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{C_a - C_{na}}{C_0} * 100 \quad \text{Ecuación (3.1)}$$

En donde:

C_a: Concentración de la muestra adicionada

C_{na}: Concentración de la muestra no adicionada

C₀: Concentración adicionada del estándar, la cual es 100 ppm para calcio, fósforo, sodio y potasio, 1 ppm para el mercurio, y para el resto de los elementos 0.1 ppm

3.2.3 Repetibilidad

Para evaluar la repetibilidad se utilizan los resultados de la concentración del estándar de 1.0 ppm los cuales se leyeron cada 10 muestras durante el análisis. En la Tabla 3.13 se muestran los resultados del estándar en las diferentes ocasiones que se leyó (a-d) para los elementos mayoritarios y minoritarios. Se calculó el promedio de cada resultado, así como su desviación estándar (DE) y su desviación estándar relativa (DER). El criterio de aceptación para este parámetro es una DER del 10%.⁽²³⁾

Elemento	Estándar 1.0 ppm				Promedio (ppm)	DE (ppm)	DER (%)
	a	b	c	d			
Al	1.0	0.94	0.934	0.903	0.944	0.041	4.294
B	1.0	0.981	0.977	0.924	0.971	0.033	3.357
Ba	1.0	1.003	1.012	0.994	1.002	0.008	0.748
Ca	1.0	1.134	1.158	1.08	1.093	0.070	6.410
Cr	1.0	1.107	1.106	1.111	1.081	0.054	4.999
Fe	1.0	1.023	1.032	0.995	1.013	0.018	1.760
K	1.0	0.959	0.938	0.921	0.955	0.034	3.571
Mg	1.0	0.99	0.998	0.964	0.988	0.017	1.677
Na	1.0	1.182	1.105	0.997	1.071	0.089	8.350
P	1.0	0.97	0.968	0.957	0.974	0.018	1.891
Rb	1.0	1.025	1.074	1.105	1.051	0.047	4.504
Si	1.0	1.035	1.032	1.001	1.017	0.019	1.878
Sr	1.0	0.94	0.934	0.903	0.944	0.041	4.294
Zn	1.0	0.981	0.977	0.924	0.971	0.033	3.357

Tabla 3.13 Concentración del Estándar de 1.0 ppm para Evaluar la Repetibilidad

3.2.4 Interferencias de Matriz, Robustez y Selectividad

Con el fin de identificar posibles interferencias espectrales y evaluar la selectividad del método, se obtuvieron los resultados para algunos de los elementos mayoritarios en las diferentes longitudes de onda detectables por el equipo. Se eligieron dichos elementos (Ca, Fe, Mg, Na y Si) ya que, al ser los que se encuentran en mayor cantidad en las muestras, son más susceptibles de presentar interferencias espectrales. En las Tablas 3.14, 3.15 y 3.16 se muestran los resultados de los elementos en las diversas longitudes de onda para las muestras blanco, de pollo y de los cadáveres respectivamente. Sólo se muestran los resultados de una réplica de cada tipo de muestra a manera de ejemplo.

DETERMINACIÓN DE METALES EN LARVAS CON ESPECTROSCOPIA DE EMISIÓN ATÓMICA CON
PLASMA ACOPLADO INDUCTIVAMENTE

Elemento	Longitud de onda (nm)	Concentración Muestra (mg/Kg)
Ca	317.937	926.8
	315.884	898.6
	393.365	Saturado
	396.852	949.5
	422.689	849.5
Promedio (mg/Kg)		906.1
DE (mg/Kg)		43.1
DER (%)		4.8
Fe	238.204	57.1
	239.571	64.6
	259.942	40.0
	234.351	61.4
	234.828	33.3
	238.868	64.4
	273.953	65.1
Promedio (mg/Kg)		55.1
DE (mg/Kg)		13.0
DER (%)		23.7
Mg	285.213	605.6
	279.076	638.7
	280.273	647.6
	279.551	671.5
Promedio (mg/Kg)		640.9
DE (mg/Kg)		27.3
DER (%)		4.3
Na	589.62	1319.0
	330.242	19.6
	589.022	834.2
Promedio (mg/Kg)		724.3
DE (mg/Kg)		656.6
DER (%)		90.7
Si	251.609	32.2
	212.411	33.0
	288.156	31.1
	252.852	29.3
	221.667	45.3
Promedio (mg/Kg)		34.2
DE (mg/Kg)		6.3
DER (%)		18.5

Tabla 3.14 Resultados de los Elementos Mayoritarios de la Muestra Blanco

DETERMINACIÓN DE METALES EN LARVAS CON ESPECTROSCOPIA DE EMISIÓN ATÓMICA CON
PLASMA ACOPLADO INDUCTIVAMENTE

Elemento	Longitud de onda (nm)	Concentración Muestra (mg/Kg)
Ca	317.937	463.1
	315.884	427.2
	393.365	418.6
	396.852	476.6
	422.689	436.5
Promedio (mg/Kg)		444.4
DE (mg/Kg)		24.5
DER (%)		5.5
Fe	238.204	293.3
	239.571	291.2
	259.942	301.8
	234.351	292.4
	234.828	169.7
	238.868	302.6
	273.953	294.8
Promedio (mg/Kg)		278.0
DE (mg/Kg)		48.0
DER (%)		17.3
Mg	285.213	251.2
	279.076	262.4
	280.273	261.4
	279.551	268.9
Promedio (mg/Kg)		261.0
DE (mg/Kg)		7.3
DER (%)		2.8
Na	589.62	2390.0
	330.242	33.3
	589.022	1482
Promedio (mg/Kg)		1302.8
DE (mg/Kg)		1188.6
DER (%)		91.3
Si	251.609	155.1
	212.411	159.9
	288.156	151.7
	252.852	144.1
	221.667	225.7
Promedio (mg/Kg)		167.3
DE (mg/Kg)		33.2
DER (%)		19.8

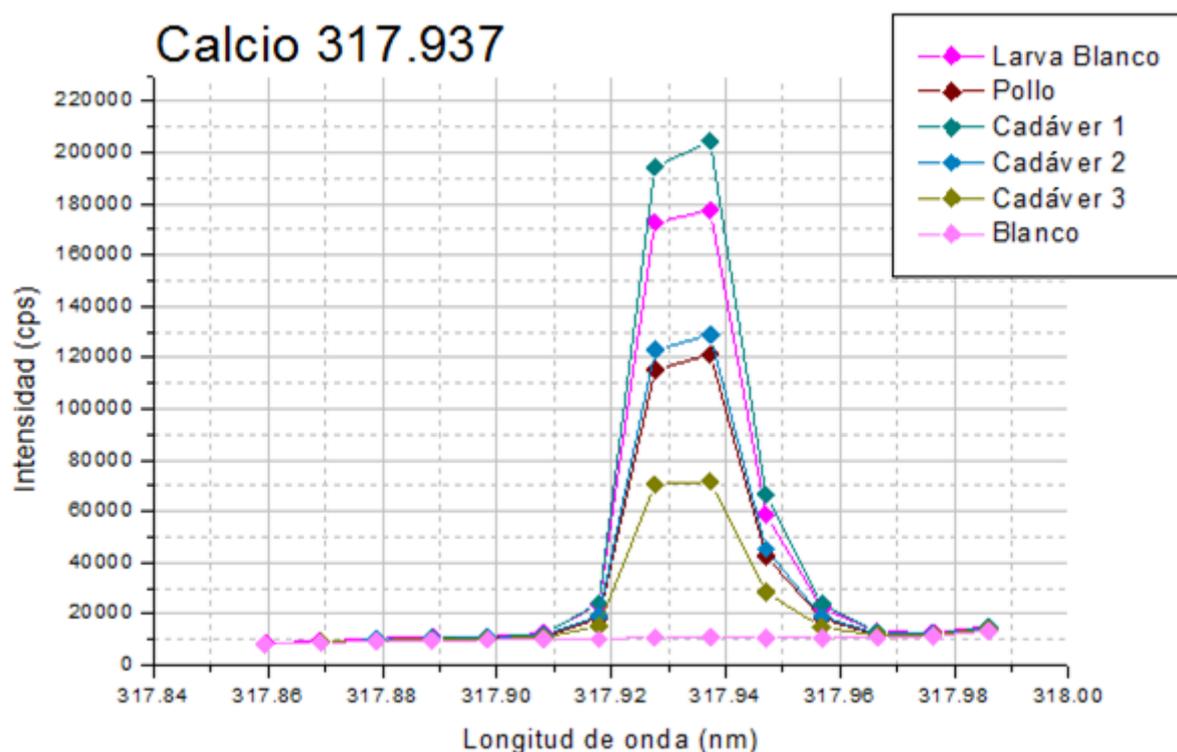
Tabla 3.15 Resultados de los Elementos Mayoritarios de la Muestra de Pollo

DETERMINACIÓN DE METALES EN LARVAS CON ESPECTROSCOPÍA DE EMISIÓN ATÓMICA CON PLASMA ACOPLADO INDUCTIVAMENTE

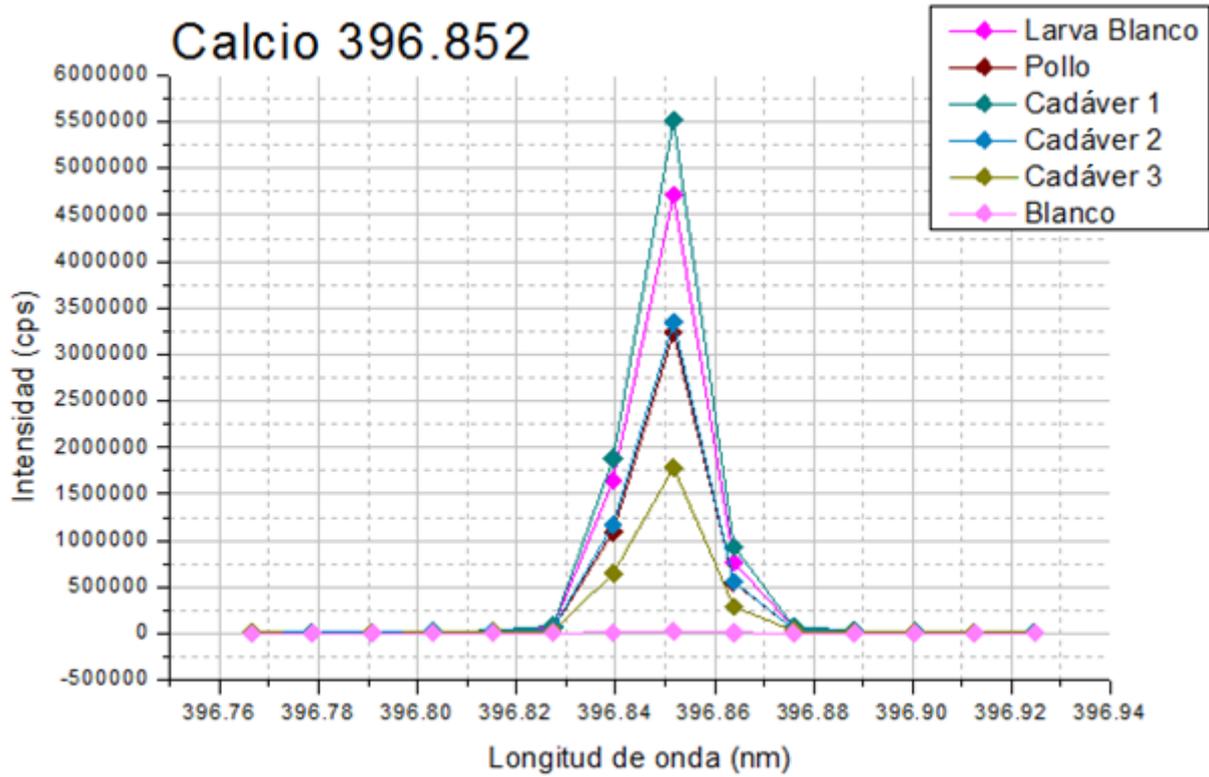
Elemento	Longitud de onda (nm)	1	2	3
Ca	317.937	1149.0	781.0	318.1
	315.884	1033.0	739.8	354.8
	393.365	Saturado	Saturado	300.1
	396.852	1131.0	780.2	349.5
	422.689	1041.0	698.9	305.3
Promedio (mg/Kg)		1088.5	750.0	325.6
DE (mg/Kg)		60.0	39.1	25.2
DER (%)		5.5	5.2	7.7
Fe	238.204	332.8	137.0	59.2
	239.571	329.3	143.8	67.8
	259.942	336.6	122.6	39.4
	234.351	331.1	144.0	63.9
	234.828	190.9	79.4	34.5
	238.868	343.9	147.9	66.9
	273.953	333.8	148.1	68.5
Promedio (mg/Kg)		314.1	131.8	57.2
DE (mg/Kg)		54.5	24.7	14.2
DER (%)		17.4	18.8	24.9
Mg	285.213	422.4	479.7	294.2
	279.076	426.0	490.7	311.0
	280.273	437.7	505.1	319.3
	279.551	441.5	523.7	315.5
Promedio (mg/Kg)		431.9	499.8	310.0
DE (mg/Kg)		9.1	19.0	11.1
DER (%)		2.1	3.8	3.6
Na	589.62	2988.0	1559.0	1824.0
	330.242	40.8	23.3	28.6
	589.022		985.9	1117.0
Promedio (mg/Kg)		1514.4	856.1	989.9
DE (mg/Kg)		2084.0	776.0	904.4
DER (%)		137.6	90.6	91.4
Si	251.609	294.5	48.2	9.7
	212.411	295.3	48.7	10.4
	288.156	287.5	47.0	9.6
	252.852	262.1	42.9	9.3
	221.667	413.7	70.3	14.4
Promedio (mg/Kg)		310.6	51.4	10.7
DE (mg/Kg)		59.2	10.8	2.1
DER (%)		19.1	21.1	19.8

Tabla 3.16 Resultados de los Elementos Mayoritarios de las Muestras de Cadáveres

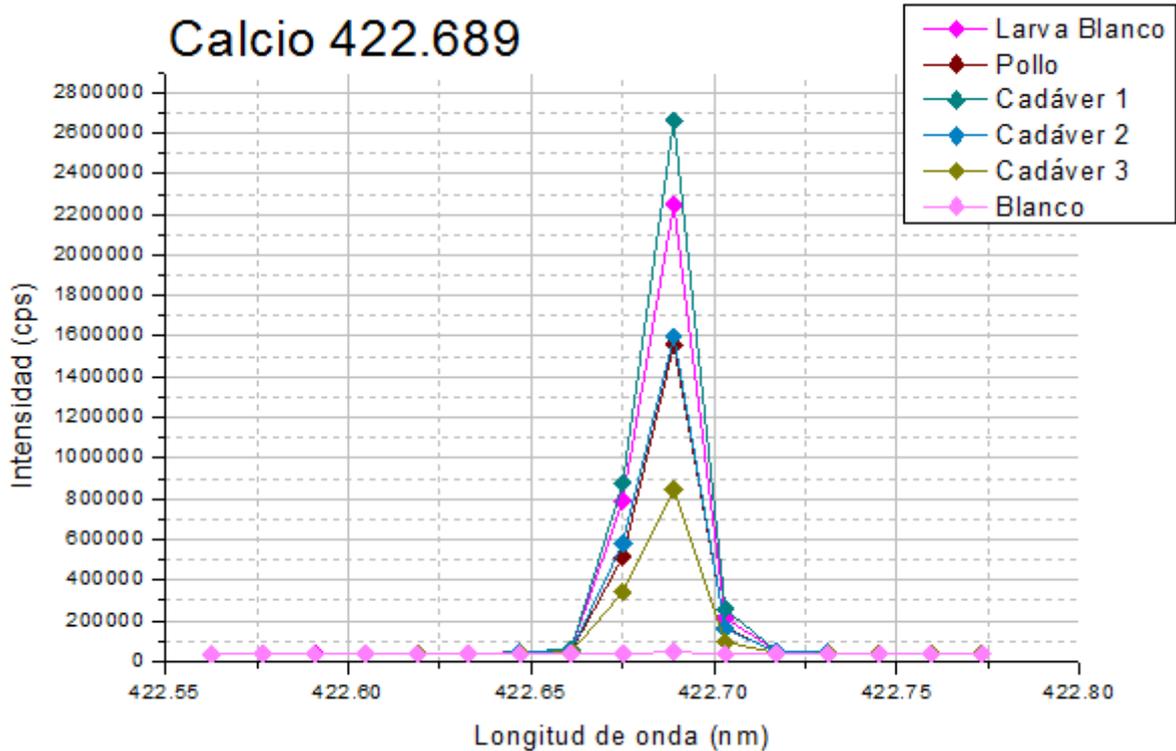
A continuación se presentan los espectros de emisión de tres longitudes de onda del calcio (Gráficas 3.7-3.9) y del hierro (Gráficas 3.10-3.12), como un ejemplo. También se muestra el espectro de emisión del fósforo por ser un caso especial. El análisis de los espectros se realizó para todos los elementos y no se encontró interferencia a excepción del fósforo en la longitud de onda de 213.617nm como lo muestra la Gráfica 3.13. En el caso del fósforo se observa una interferencia espectral con el cobre; sin embargo, como las muestras contienen cobre por debajo del límite de detección la interferencia sólo se observa en los estándares. Esto se resolvió con la preparación de estándares sólo de fósforo para así calcular las concentraciones de las muestras. No fue necesaria una corrección adicional.



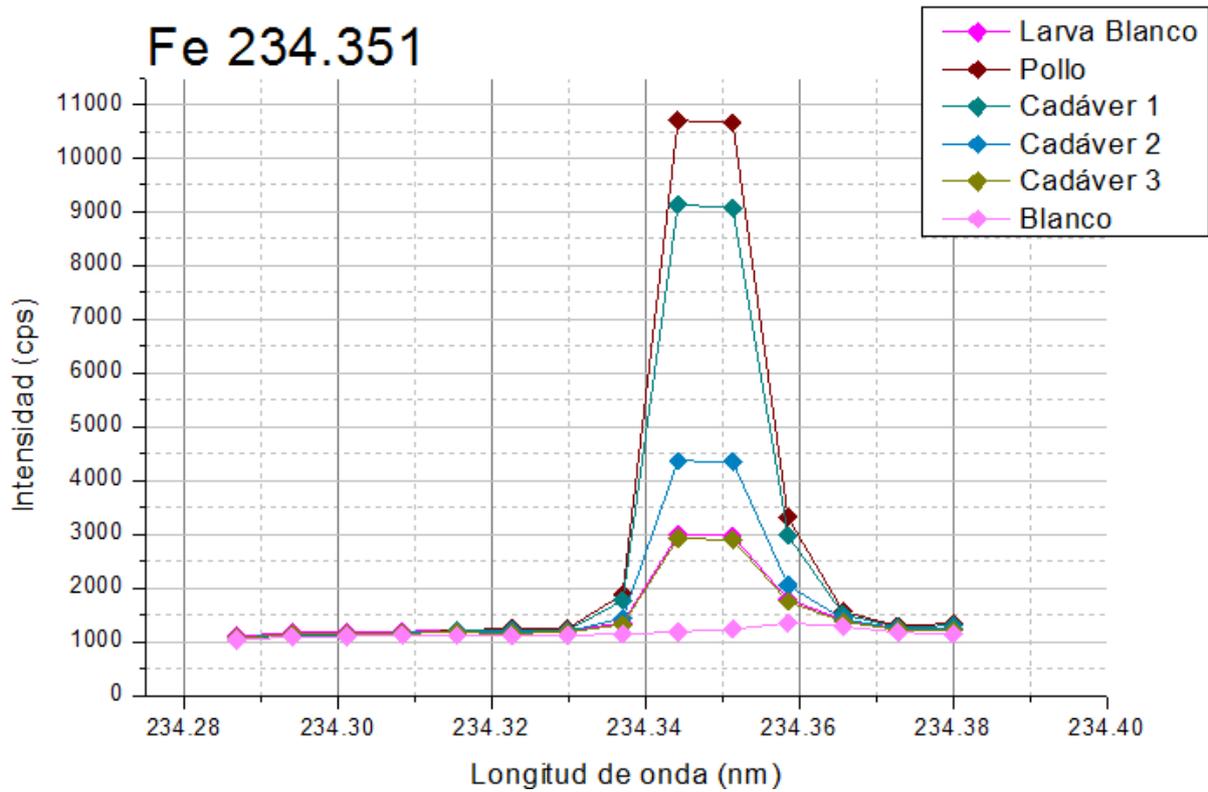
Gráfica 3.7. Espectro de Emisión de Calcio a 317.937 nm



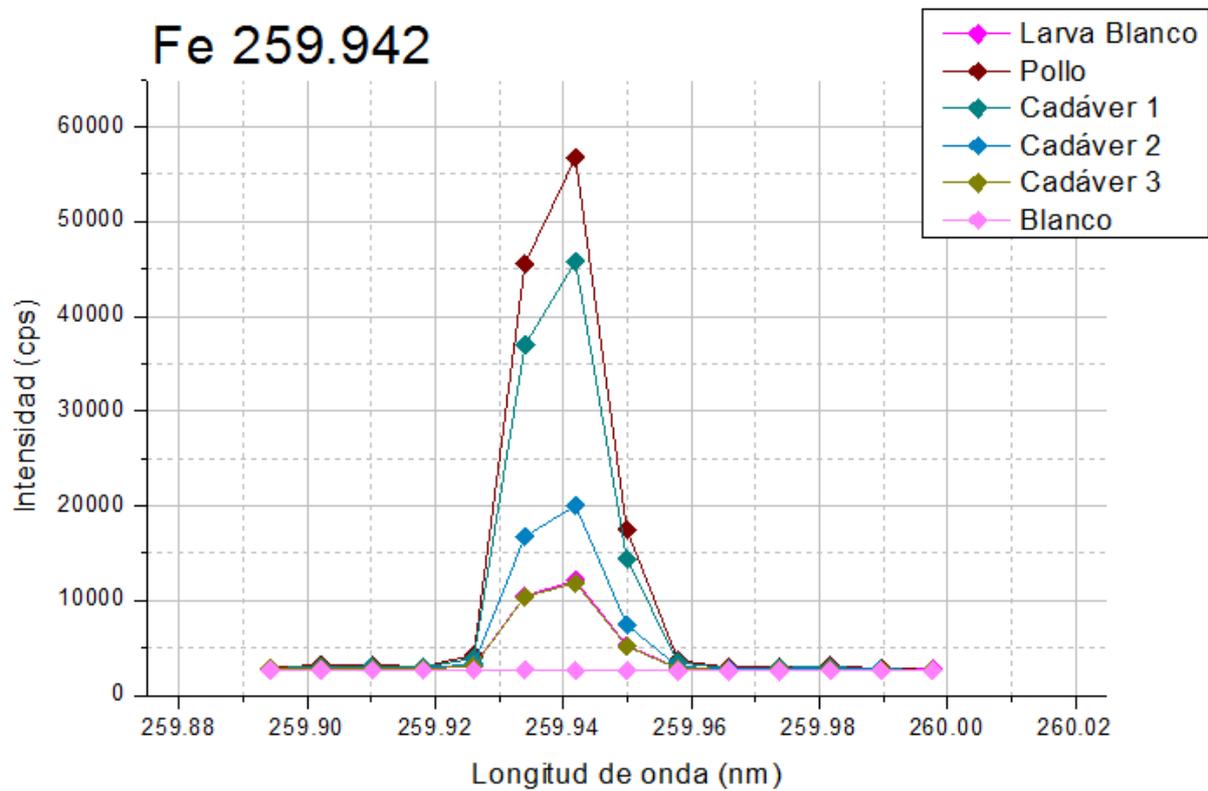
Gráfica 3.8 Espectro de Emisión de Calcio a 396.852 nm



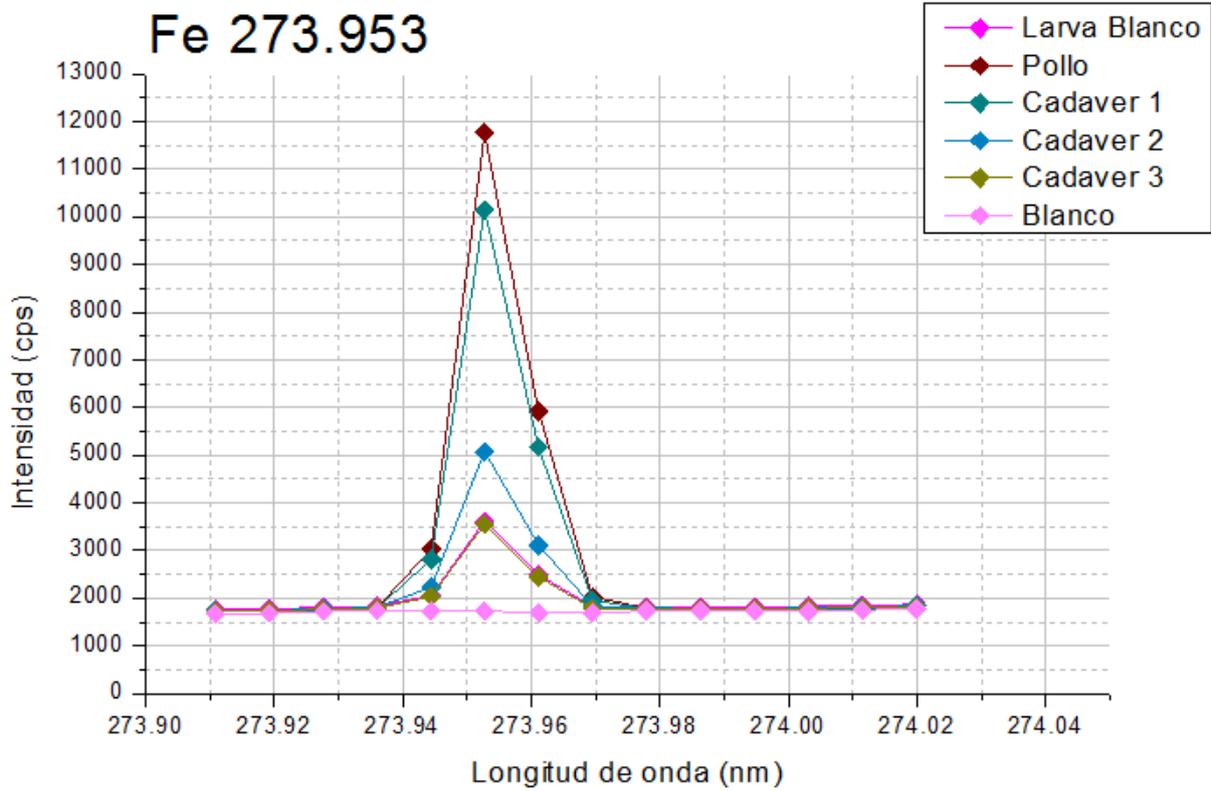
Gráfica 3.9. Espectro de Emisión de Calcio a 422.689 nm



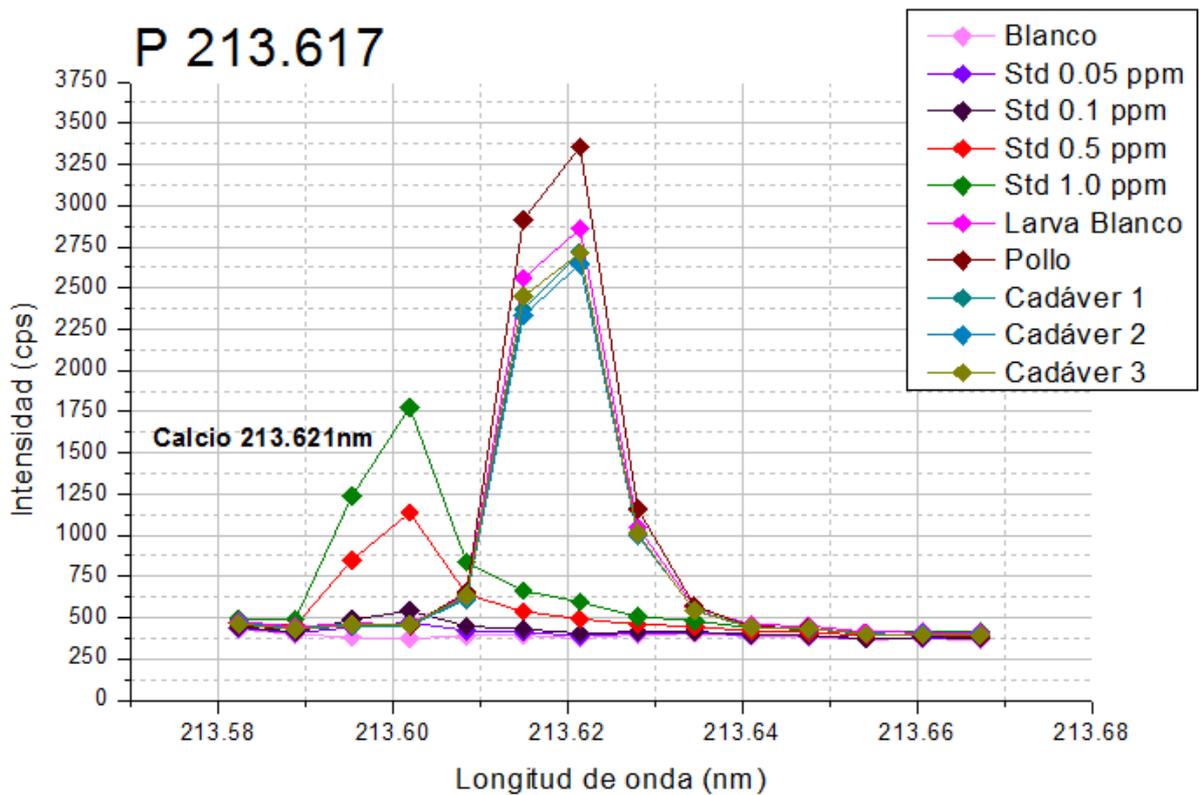
Gráfica 3.10. Espectro de Emisión de Hierro a 234.351 nm



Gráfica 3.11 Espectro de Emisión de Hierro a 259.942 nm



Gráfica 3.12 Espectro de Emisión de Hierro a 273.953 nm



Gráfica 3.13 Espectro de Emisión de Fósforo a 213.617 nm

4. Análisis y Discusión

Al analizar de manera general los datos, se observa que hay similitudes en la composición de las muestras del mismo tipo y que los elementos que se encontrarán son constantes entre muestras. Sin embargo, para algunos elementos se encuentra una variación entre los duplicados. Esta diferencia en la concentración de los elementos encontrados es más marcada en las muestras de cadáver; esto se puede deber a que se pesaron las larvas completas y siendo un sistema biológico, su comportamiento y composición resulta único. Debido a que no se puede garantizar que la composición de unas larvas del mismo origen sea igual entre sí, se podría hacer una muestra única homogénea a partir de un número representativo de larvas. A partir de esta muestra representativa se procede con el proceso de digestión descrito anteriormente para así obtener resultados con una menor dispersión.

4.1 Elementos Mayoritarios

Como se observa en las Tablas 3.1 a 3.5 las muestras contienen los mismos elementos mayoritarios que son sodio, potasio, fósforo, calcio y magnesio, a pesar de encontrarse en diferentes concentraciones y proporciones. Esto podría indicar que estos elementos son los componentes básicos de una larva sin importar su origen.

El hierro es un elemento común entre las muestras de cadáver (Tabla 3.3-3.5) y la de pollo (Tabla 3.2), lo que se podría deber a que las larvas se alimentaron de un animal ya que éstos contienen sangre en la cual el hierro es un elemento mayoritario. Las muestras blanco, al ser criadas en un laboratorio, tienen una alimentación libre de carne posiblemente explicando que el hierro no sea un elemento mayoritario.

La muestra del cadáver 1 (Tabla 3.3) y la muestra de pollo tienen la misma composición de elementos sólo que en diferente proporción. Debido a que ambas muestras provienen de la misma zona geográfica, se explica que tengan los mismos elementos. Esto nos podría indicar que el ambiente juega un papel importante en la

composición del sustrato (cadáver) y por tanto en la composición de las larvas que se alimentan del mismo. El factor que ayudaría a diferenciar los dos tipos de larva sería la proporción y concentración en la que se encuentra cada elemento.

Los elementos encontrados en los cadáveres 2 y 3, Tabla 3.4 y 3.5 respectivamente, son los mismos y en similar proporción. Estos resultados indicarían que las larvas que provienen de un cadáver si tienen similitudes en su composición, tanto en los elementos presentes como en las concentraciones en las que se encuentran. Estos cadáveres fueron encontrados en la misma zona geográfica, otro aspecto que explicaría su similitud. Por tanto, si observamos estas muestras en comparación con las de pollo y el cadáver 1, se diferencian en que estas últimas tienen silicio. Una vez más probando que el área en el que se encuentren los cuerpos influyen en la composición elemental de las larvas.

4.2 Elementos Minoritarios

En los elementos que se encuentran en menores concentraciones es en donde se observan mayores diferencias entre las muestras. Al observar los resultados de todas las muestras (Tabla 3.6-3.10) se nota que contienen zinc y aluminio aunque en diferentes proporciones. Se podría decir que estos elementos son aquellos que se espera se encontrarán en una larva en concentraciones pequeñas de manera regular. En este caso las muestras blanco contienen hierro como un elemento en poca proporción, e incluso bajo el límite de detección.

Entre las muestras blanco (Tabla 3.6) y las muestras de pollo (Tabla 3.7) se observa que todos sus elementos difieren excepto por zinc y aluminio. Las muestras blanco contienen hierro, silicio y cromo; mientras que las de pollo contienen boro, rubidio y bario. Esta diferencia es la misma entre las muestras blanco y las del cadáver 1 (Tabla 3.8). De nuevo se observa la misma composición para las muestras de pollo y las del cadáver 1 indicando marcadores por zona geográfica. Por otro lado, entre las larvas blanco y las del cadáver 2 y 3 (Tabla 3.9 y 3.10) se tienen al cromo y silicio como elementos en común, pero en las muestras del cadáver 2 se tiene el boro mientras que en el cadáver 3 se tiene rubidio, molibdeno y estroncio.

A pesar de que se pueden encontrar los mismos elementos, se observa que la proporción en la que se encuentran es diferente. Las diferencias observadas entre muestras nos indican los posibles elementos que podrían ser de utilidad como indicadores para diferenciar el origen de las larvas.

4.3 Toxicología

La toxicología forense es el área que considera los aspectos médico forenses de la acción de los tóxicos sobre seres vivos. Un tóxico se define como la sustancia que produce alteraciones funcionales y anatómicas en un organismo. En el caso de la intoxicación por metales pesados se consideran el arsénico, antimonio, bario, cadmio, cromo, mercurio, plomo y vanadio. Sin embargo, cualquier metal puede ser tóxico a altas concentraciones pues altera el equilibrio de un ser vivo. Se observa en el Anexo 2 que las muestras blanco contienen los metales pesados por debajo del límite de detección a excepción del cromo, el cual está considerado como elemento minoritario (Tabla 3.6). Esto nos indica que si llegáramos a encontrar dichos metales en alguna muestra de campo proveniente de un cadáver podría indicar que el cuerpo lo contenía. Es necesario señalar que para que sea considerado como una intoxicación, el metal debe encontrarse en un intervalo de concentración que dependerá del elemento en cuestión. En el caso de las muestras de pollo (Tabla 3.7) y del cadáver 1 (Tabla 3.8) encontramos que contienen bario, aunque en una cantidad pequeña. De ahí en fuera no se detectan metales pesados en ninguna muestra. En la Tabla 3.12 podemos observar que el porcentaje de recuperación de dichos metales pesados es aceptable lo que nos indica que en caso de encontrarse en alguna muestra se lograría cuantificar con confiabilidad.

En el caso de residuo de disparo se espera encontrar plomo, bario y antimonio. La cantidad podría depender del tiempo de alimentación del insecto así como del tipo de arma utilizada. Para las muestras analizadas en este trabajo sólo en algunas se encontró bario, pero al estar en ausencia de plomo y antimonio es probable que no provenga de un residuo de disparo.

Para la mayoría de elementos, la toxicidad dependerá también de la forma en la que se presente el metal. De tal manera que no es suficiente con detectar y cuantificar el

metal que podría ser la causa de intoxicación, también es conveniente llevar a cabo la especiación por otra técnica.

4.4 Validación

El primer parámetro a evaluar fue la linealidad y a partir de los resultados en la Tabla 3.11 se observa que el coeficiente de correlación es para todos los elementos mayor o igual a 0.99. Este valor nos indica que los datos siguen un comportamiento lineal y es posible trabajar en el rango propuesto esperando una respuesta directamente proporcional entre la intensidad (cps, cuentas por segundo) y la concentración. En este apartado también se evaluó la sensibilidad a partir de la pendiente de cada curva. Se observa que en la mayoría de los elementos se tiene una alta sensibilidad lo que nos permite distinguir un cambio relativamente pequeño en la concentración. Los elementos que son fácilmente ionizables (potasio, sodio y estroncio) son los que tienen una mayor sensibilidad, es decir, una pendiente mayor. En el caso del fósforo es donde se observa una menor pendiente, pero ya que es un elemento mayoritario en las muestras no se requiere de una alta sensibilidad.

Para evaluar la exactitud se calculó el porcentaje de recuperación para los elementos mayoritarios y minoritarios de los diferentes tipos de muestras analizadas. El porcentaje fue calculado a partir de las concentraciones de las muestras adicionadas con los estándares y las no adicionadas. En los resultados en la Tabla 3.12 se observa que todos los elementos mayoritarios y minoritarios se recuperan entre el 80-120% ⁽²³⁾. Este porcentaje se considera aceptable comprobando que no se tienen interferencias de matriz, que la digestión se lleva a cabo de manera correcta y que las concentraciones de los elementos encontrados en las muestras son confiables.

En el caso de la repetibilidad, se evaluó la variación del estándar de 1.0ppm a lo largo del análisis. Se utilizó este estándar debido a que contenía a todos los elementos. En los resultados de esta prueba en la Tabla 3.13 se observa que el estándar se mantiene cerca de su valor nominal durante el tiempo de análisis. Al momento de calcular la desviación estándar relativa del promedio de las concentraciones para cada elemento, se observa que en todos los casos es menor

a 10% ⁽²³⁾ Esto nos indica que el método desarrollado nos permite obtener resultados similares entre sí en un periodo dado de tiempo.

Finalmente se realizaron pruebas para determinar las interferencias de matriz, la robustez y selectividad. En este caso se analizaron los espectros de emisión de cada elemento para todas las muestras. De manera especial se estudiaron los elementos que se encontraron en mayor cantidad en las muestras. Al observar los espectros de emisión, no se encontraron interferencias de matriz y también se observa un solo pico de emisión para cada elemento. Esto nos indica que durante el análisis sólo se detecta el elemento seleccionado en cada longitud de onda, asegurando selectividad del método desarrollado. En el caso de los elementos mayoritarios, también se obtuvieron resultados en las diferentes longitudes de onda detectables. Los resultados nos permiten confirmar la concentración hallada en cada muestra, así como determinar las longitudes de onda útiles para el análisis. En las Tablas 3.14 a 3.16, observamos que en la longitud de onda de 393.365 nm correspondiente al calcio no se logran cuantificar concentraciones mayores a 500mg/Kg. Este valor es aproximado basándose en los resultados de la concentración de calcio a otras longitudes de onda. Ya que en todas las muestras trabajadas, se encontró una alta concentración de calcio no se recomienda el uso de esta longitud de onda. Al ver los resultados de sodio, en la longitud de onda de 330.242 las concentraciones son muy bajas en comparación a las obtenidas en las otras dos longitudes de onda. La diferencia podía deberse a que la calibración en esta longitud de onda tiene un coeficiente de correlación menor a 0.99. En este caso la longitud de onda no se podría utilizar ya que los resultados obtenidos tienen un mayor error. Además de las excepciones mencionadas anteriormente, los resultados obtenidos para los elementos en sus diferentes longitudes de onda son similares entre sí. Esto nos indica que el método es robusto, siendo que el cambio en las longitudes de onda no afecta el resultado final.

5. Conclusiones

- ❖ Se desarrolló una metodología para la determinación de metales en larvas con espectroscopía de emisión atómica
- ❖ Se lograron digerir las muestras de manera completa utilizando un horno de microondas y se obtuvieron soluciones ideales para el análisis
- ❖ Se logró determinar la composición de las larvas contempladas en el estudio. Se identificaron los elementos mayoritarios comunes a todas las larvas, así como los elementos minoritarios característicos de cada tipo de muestra y que las hace únicas.
- ❖ Se encontraron variaciones entre los duplicados de las mismas larvas lo cual sugiere que cada larva tiene una composición propia, por lo que no es posible obtener un valor promedio sino un intervalo de concentraciones.
- ❖ Se llevó a cabo la validación parcial del método a partir de la linealidad, sensibilidad, exactitud, repetibilidad, robustez y selectividad. Obteniendo resultados satisfactorios en cada uno de los parámetros evaluados
- ❖ A partir de los resultados obtenidos, se puede decir que las muestras contienen elementos que las hacen diferentes entre sí. De tal manera que es posible distinguir las larvas blanco de las larvas provenientes de pollo y, a su vez, de las larvas de cadáveres.
- ❖ Es posible identificar larvas que se han alojado en diferentes cadáveres con base en los elementos minoritarios encontrados y su concentración. Este puede ser el inicio de la identificación de elementos marcadores para indicar una zona geográfica de la cual provenga el cadáver.
- ❖ Debido a la detección y cuantificación de los diferentes metales, la metodología desarrollada permite identificar elementos que podrían ayudar a emitir conclusiones acerca de la causa de muerte como lo es toxicidad por metales pesados o por disparo. En cada caso se esperaría detectar y cuantificar diferentes metales característicos de cada situación. En el caso de residuo de disparo los metales presentes podrían ser plomo, bario y antimonio, mientras que para poder considerar intoxicación podrían ser arsénico, cadmio, plomo, mercurio y cromo, entre otros.

6. Bibliografía

1. **Byrd, Jason H. and Castner, James L.** *Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations*. Florida : CRC Press, 2010. pp. 1-85.
2. **Al-Mesbah, Hanadi A.** *A Study of Forensically Important Necrophagous Diptera in Kuwait*. Reino Unido : UCLAN, 2010.
3. **Gennard, Dorohy E.** *Forensic Entomology. An Introduction*. West Sussex : John Wiley & Sons, 2007.
4. **Wang, Jiangfeng, Li, Zhigang and Chen, Yuchuan.** *The succession and development of insects on pig carcasses and their significances in estimating PMI in South China*. s.l. : Forensic Science International, 2008. pp. 11-18. Vol. 179.
5. **Valdes Perezgasga, Ma. Teresa, et al., et al.** *Arthropods of Forensic Importance on Pig Carrion in the Coahuilan Semidesert, Mexico*. 2010. Vol. 55.
6. **Campobasso, Carlo Pietro, Di Vella, Giancarlo and Introna, Francesco.** *Factors affecting decomposition and Diptera colonization*. 2001. pp. 18-27. Vol. 120.
7. **Introna, Francesco, Campobasso, Carlo Pietro and Goff, Madison Lee.** *Entomotoxicology*. 2001. pp. 42-47. Vol. 120.
8. **Gosselin, Matthias, et al., et al.** *Entomotoxicology, experimental set-up and interpretation for forensic toxicologists*. 2011. pp. 1-9. Vol. 208.
9. **Roeterdink, Evan M, Dadour, Ian R and Watlin, R John.** *Extraction of gunshot residues from the larvae of the forensically important blowfly *Calliphora dubia**. 2004. pp. 63-70. Vol. 118.
10. **LaGoo, Lisa, et al., et al.** *Detection of Gunshot Residue in Blowfly Larvae and Decomposin Porcine Tissue Using Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS)*. 2010. Vol. 55.
11. **Antonelli, Arthur L.** *La entomología básica para jardineros*. Oregon : The Oregon State University, 2001.
12. **Packard, Alpheus S.** *A text-book of entomology*. Nueva York : MacMillan Company, 1898.
13. **Swann, L.M., Forbes, S.L. and Lewis, S.W.** *Analytical separation of mamalian decomposition products for forensic sciencie*. s.l. : Analytica Chimica Acta, 2010. pp. 9-22. Vol. 682.
14. **Mitra, Somenath, [ed.].** *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. Nueva Jersey : Wiley Interscience, 2003.
15. **Mester, Z and Sturgeon, R.** *Comprehensive Analytical Chemistry*. s.l. : Wilson & Wilsons, 2003. Vol. Sample Preparation for Trace Ekeent Analysis.

16. **AntonPaar GmbH.** *Multiwave 3000 Instruction Manual.* Graz : s.n., 2002.
17. **Boss, Charles B. and Fredeen, Kenneth J.** *Concepts, Instrumentation, and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry.* 2. s.l. : The Perkin Elmer Corporation, 1997.
18. **Skoog, Douglas A, Holler, F. James and Nieman, Timothy A.** *Principios de Análisis Instrumental.* 5. España : McGraw Hill, 1998.
19. **PerkinElmer.** PerkinElmer. [Online] [Cited: noviembre 2, 2013.]
<http://www.perkinelmer.com/Catalog>.
20. **Lajunen, L.H.J. and Peramaki, P.** *Spectrochemical Analysis y Atomic Absorption and Emission.* 2. Cambridge : RS C, 2004.
21. **Dean, John R.** *Practical Inductively Coupled Plasma Spectroscopy.* s.l. : John Wiley & Sons, Ltd, 2005.
22. **Wiley-VCH.** *Handbook of Spectroscopy.* [ed.] Tuan Vo-Dinh and Gunther Gauglitz. Weinheim : Wiley VCH, 2003.
23. **AOAC.** *AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals.* 2012.
24. **Settle, Frank A., [ed.].** *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry.* Nueva Jersey : Prentice Hall, 1997.
25. **Eurachem.** *The Fitness for Purpose of Analytical Methods.* s.l. : LGC, 1998.
26. **Miller, James N and Miller, Jane C.** *Estadística y Quimiometría para Química Analítica.* 4. Madrid : Prentice Hall, 2002.
27. **Hewitt , Charles Gordon.** *The House Fly.* Manchester : Manchester University Press, 1910.
28. **IUPAC.** *Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis.* 2002. pp. 835-855. Vol. 74.
29. **Vargas, Alvarado Eduardo.** *Medicina forense toxicológica y labroal.* 1. s.l. : Trillas, 2008. pp. 115-141.
30. **Institució n Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo.** *Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo.* [ed.] Gunnar Nordberg. 3. Vols. Metales, propiedades químicas y toxicidad.
31. **CENAM Centro Nacional de Metrología.** *Métodos Analíticos Adecuados a su Propósito. Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados.* [ed.] Juan A. Guardado Pérez and Flora E. Mercader Trejo. Querétaro : s.n., 2005.

DETERMINACIÓN DE METALES EN LARVAS CON ESPECTROSCOPÍA DE EMISIÓN ATÓMICA CON PLASMA ACOPLADO INDUCTIVAMENTE

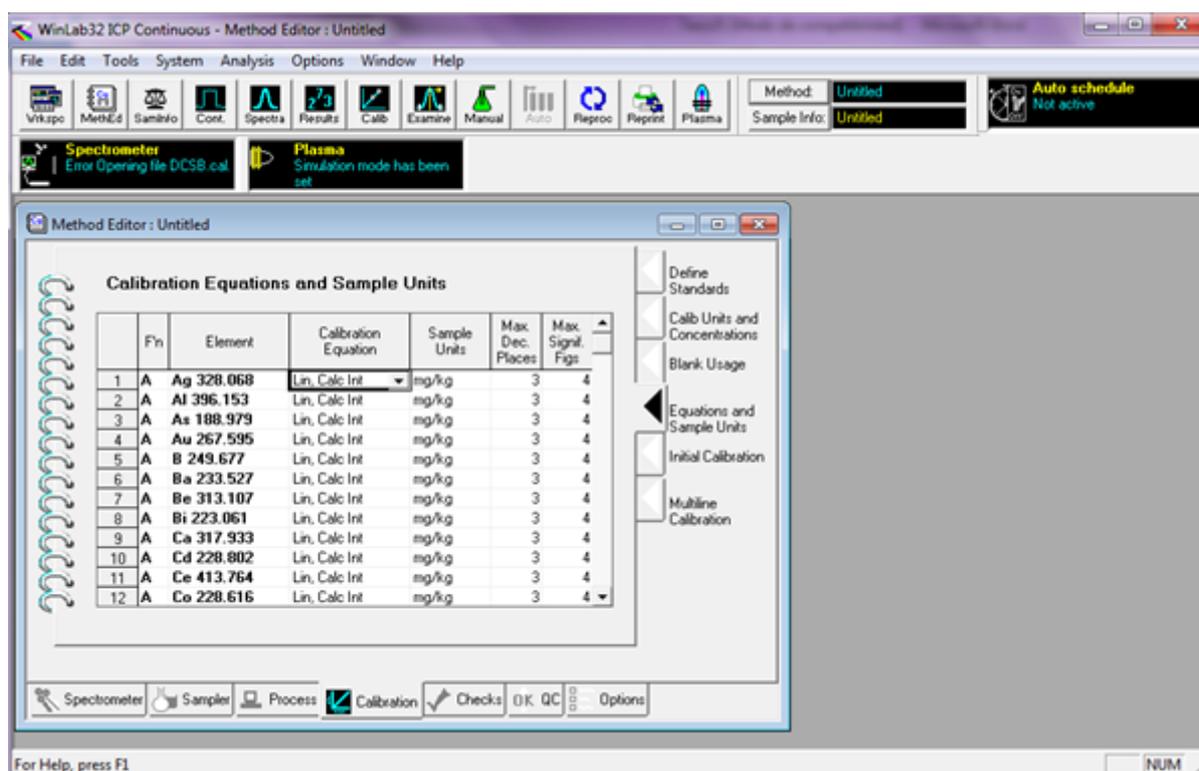


Figura 1-5 Selección de la ecuación de calibración y las unidades de concentración de la muestra.

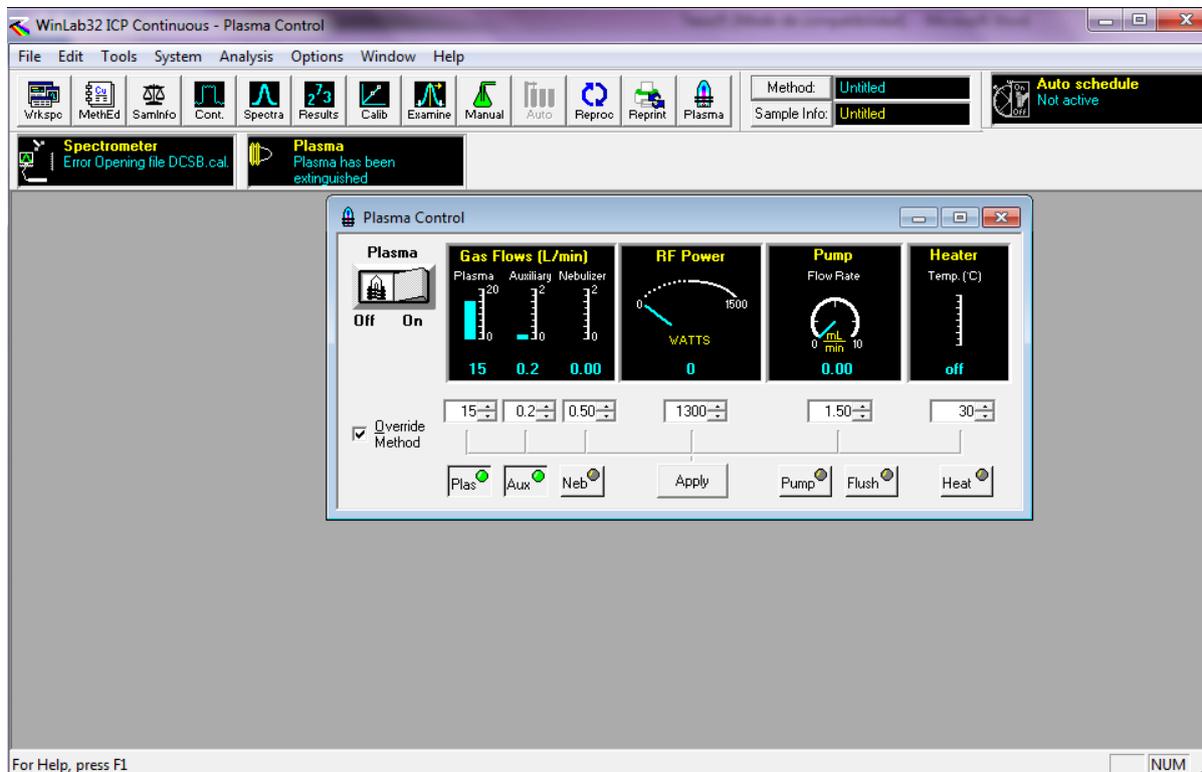


Figura 1-6. Parámetros de flujo de operación, potencia del generador de radiofrecuencia y frecuencia de la bomba peristáltica.

32. **ICH Harmonised Tripartite Guideline.** *Validation of analytical Procedures: Text and Methodology.* 2005.

33. **National Association of Testing Authorities.** *Format and Content of Test Methods and Procedures for Validation and Verification of Chemical Test Methods.* 1998.

ANEXO 1. Elaboración del Método

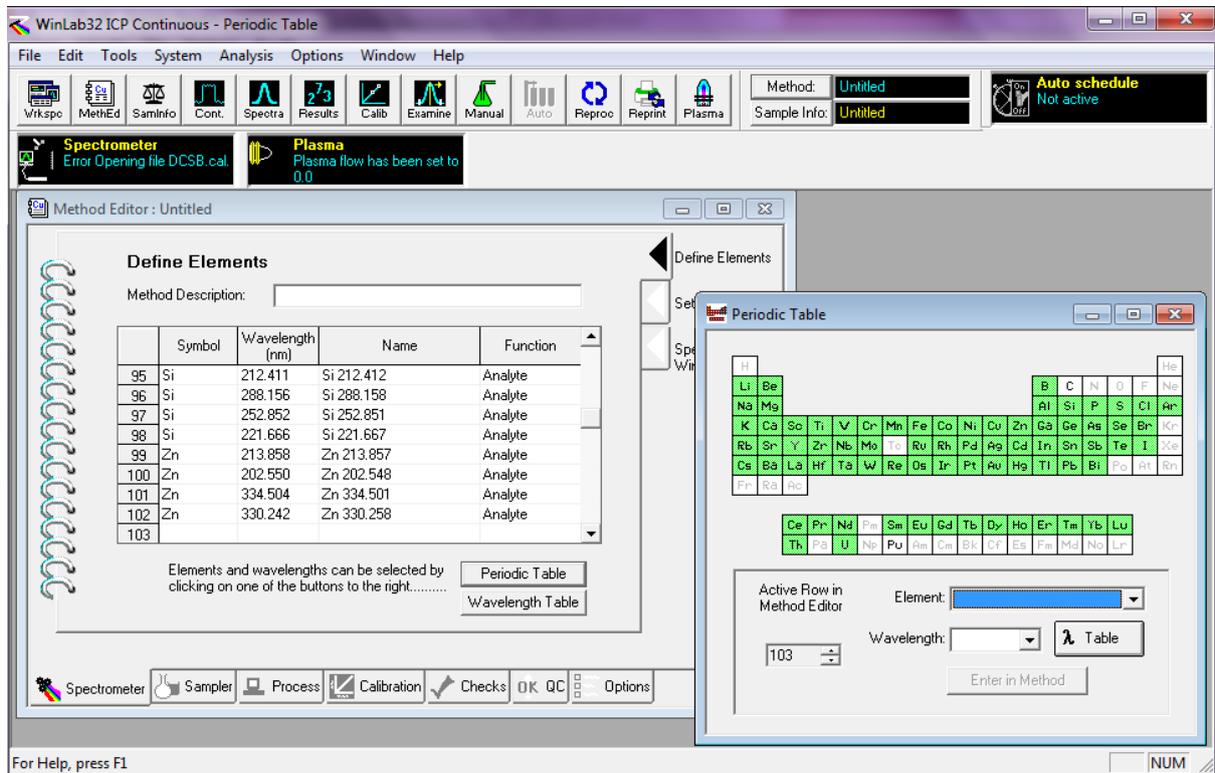


Figura 1-1. Selección de los elementos a analizar

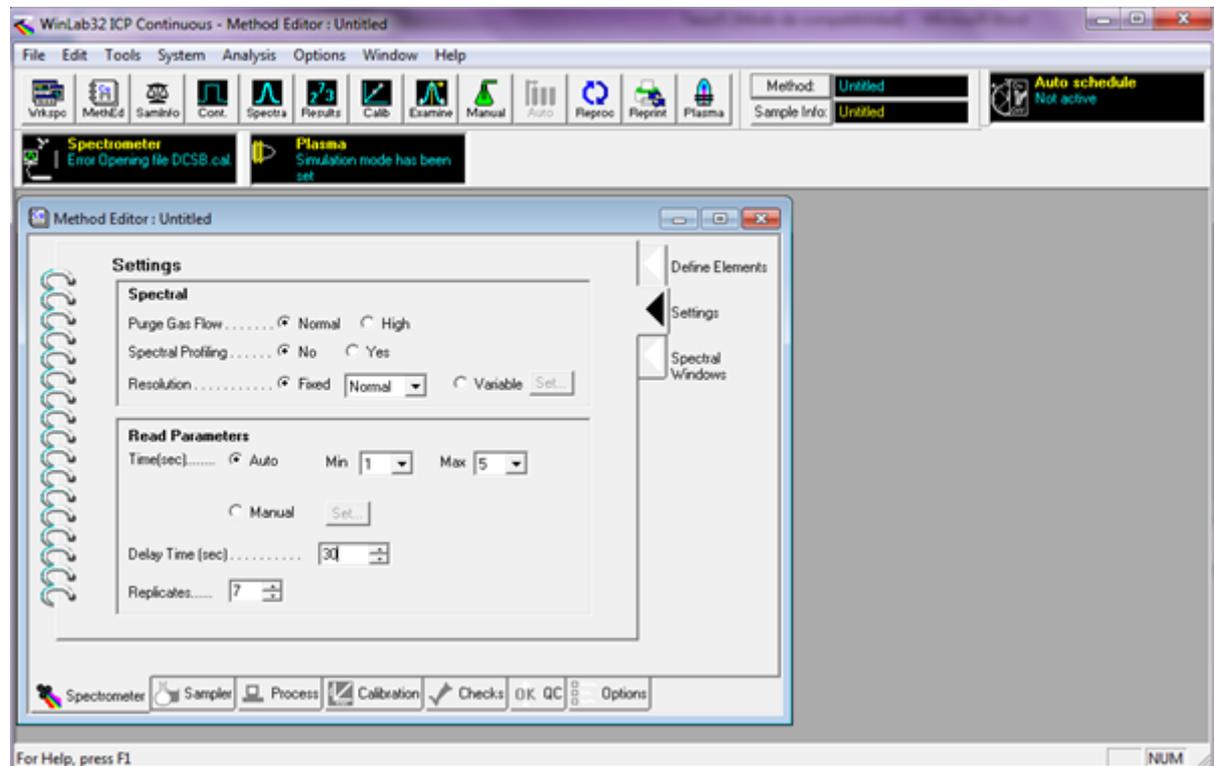


Figura 1-2 Determinación del tiempo de retraso de lectura (Read Delay: 30 segundos) y 7 réplicas

DETERMINACIÓN DE METALES EN LARVAS CON ESPECTROSCOPÍA DE EMISIÓN ATÓMICA CON PLASMA ACOPLADO INDUCTIVAMENTE

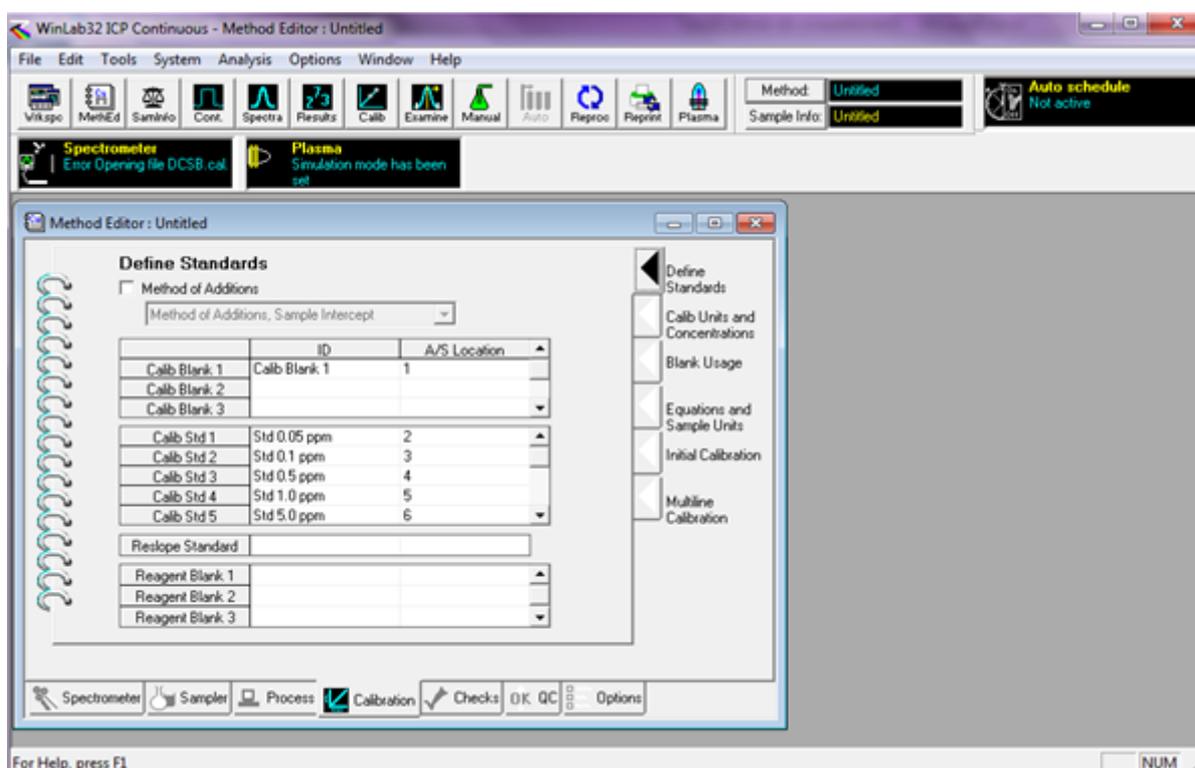


Figura 1-3 Introducción de los estándares de calibración

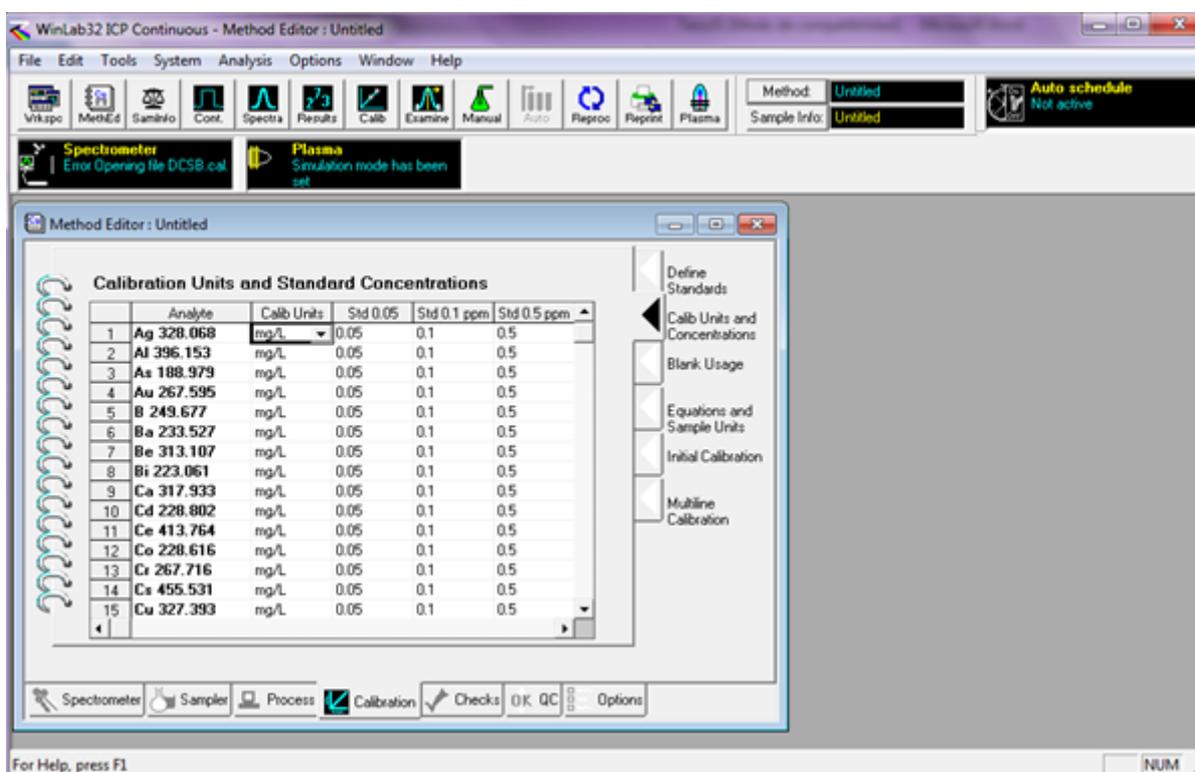


Figura 1-4 Introducción de las concentraciones de los estándares de calibración para cada elemento.

ANEXO 2. Elementos traza

En las siguientes tablas se muestran los elementos que se encontraron por debajo del límite de detección (LOD) en las muestras blanco y en las muestras de campo. El límite de detección se calculó de acuerdo a la IUPAC $LOD = 3.3\sigma$ donde σ es la desviación estándar de 10 lecturas del blanco.

Tabla 2.1. Elementos traza de las Muestras Blanco.

Elemento	Longitud de onda (nm)	LOD (mg/Kg)	Elemento	Longitud de onda (nm)	LOD (mg/Kg)
As	188.979	0.0465	Ni	231.604	0.0070
Au	267.595	0.0094	Pb	220.353	0.0104
B	249.677	0.0075	Pd	340.458	0.0116
Ba	233.527	0.0012	Pr	390.844	0.0163
Be	313.107	0.0005	Pt	265.945	0.0329
Bi	223.061	0.0299	Rb	780.023	0.0139
Cd	228.802	0.0091	Re	197.248	0.0213
Ce	413.764	0.0089	Rh	343.489	0.0388
Co	228.616	0.0106	Ru	240.272	0.0063
Cu	327.393	0.0101	Sb	206.836	0.0550
Dy	353.170	0.0026	Sc	361.383	0.0011
Er	337.271	0.0017	Se	196.026	0.0207
Eu	381.967	0.0004	Sm	359.260	0.0169
Ga	417.206	0.0111	Sn	189.927	0.0156
Gd	342.247	0.0057	Ta	226.230	0.0570
Ge	209.426	0.0858	Tb	350.917	0.0043
Hf	277.336	0.0051	Te	214.281	0.0340
Ho	345.600	0.0013	Th	283.730	0.0050
In	230.606	0.0699	Ti	334.940	0.0010
Ir	205.222	0.0250	Tl	190.801	0.0282
Li	670.784	0.0002	U	385.958	0.0402
Lu	261.542	0.0006	V	290.880	0.0029
Mn	257.610	0.0003	W	207.912	0.0647
Mo	202.031	0.0119	Y	371.029	0.0003
Nb	309.418	0.0029	Yb	328.937	0.0003
Nd	406.109	0.0068	Zr	343.823	0.0066

Tabla 2.2. Elementos traza de las muestras de campo (Cadáver 1 y Pollo)

Elemento	Longitud de onda (nm)	LOD (mg/Kg)	Elemento	Longitud de onda (nm)	LOD (mg/Kg)
Ag	328.068	0.0060	Ni	231.604	0.0070
As	188.979	0.0465	Pb	220.353	0.0104
Au	267.595	0.0094	Pd	340.458	0.0116
Be	313.107	0.0005	Pr	390.844	0.0163
Bi	223.061	0.0299	Pt	265.945	0.0139
Cd	228.802	0.0091	Re	197.248	0.0213
Ce	413.764	0.0089	Rh	343.489	0.0388
Co	228.616	0.0106	Ru	240.272	0.0063
Cr	267.716	0.0064	Sb	206.836	0.0550
Cu	327.393	0.0101	Sc	361.383	0.0011
Dy	353.170	0.0026	Se	196.026	0.0207
Eu	381.967	0.0004	Sm	359.260	0.0169
Ga	417.206	0.0111	Sn	189.927	0.0156
Gd	342.247	0.0057	Ta	226.23	0.0570
Ge	209.426	0.0858	Tb	350.917	0.0043
Hf	277.336	0.0051	Te	214.281	0.0340
Ho	345.600	0.0013	Th	283.730	0.0050
In	230.606	0.0699	Ti	334.940	0.0010
Ir	205.222	0.0250	Tl	190.801	0.0282
La	408.672	0.0009	U	385.958	0.0402
Li	670.784	0.0002	V	290.880	0.0029
Lu	261.542	0.0006	W	207.912	0.0647
Mn	257.610	0.0003	Y	371.029	0.0003
Mo	202.031	0.0119	Yb	328.937	0.0003
Nb	309.418	0.0029	Zr	343.823	0.0066
Nd	406.109	0.0068			

Tabla 2.3. Elementos traza de las muestras (Cadáver 2)

Elemento	Longitud de onda (nm)	LOD (mg/Kg)	Elemento	Longitud de onda (nm)	LOD (mg/Kg)
Ag	328.068	0.0130	Ni	231.604	0.0070
As	188.979	0.0581	Pb	220.353	0.0104
Au	267.595	0.0074	Pd	340.458	0.0116
Ba	233.527	0.0011	Pr	390.844	0.0163
Be	313.107	0.0002	Pt	265.945	0.0139
Bi	223.061	0.0153	Rb	7480.023	0.0167
Cd	228.802	0.0056	Re	197.248	0.0261
Ce	413.764	0.0097	Rh	343.489	0.0494
Co	228.616	0.0048	Ru	240.272	0.0116
Cu	327.393	0.0048	Sc	361.383	0.0007
Dy	353.170	0.0047	Se	196.026	0.0207
Eu	381.967	0.0005	Sm	359.260	0.0153
Ga	417.206	0.0121	Sn	189.927	0.0076
Gd	342.247	0.0039	Ta	226.230	0.0258
Ge	209.426	0.1196	Tb	350.917	0.0064
Hf	277.336	0.0051	Te	214.281	0.0272
Ho	345.600	0.0013	Th	283.730	0.0123
In	230.606	0.0699	Ti	334.940	0.0018
Ir	205.222	0.0250	Tl	190.801	0.0488
La	408.672	0.0009	U	385.958	0.0370
Li	670.784	0.0002	V	290.880	0.0017
Lu	261.542	0.0006	W	207.912	0.0447
Mn	257.610	0.0003	Y	371.029	0.0012
Mo	202.031	0.0119	Yb	328.937	0.0005
Nb	309.418	0.0029	Zr	343.823	0.0047
Nd	406.109	0.0068			

Tabla 2.4. Elementos traza de las muestras (Cadáver 3)

Elemento	Longitud de onda (nm)	LOD (mg/Kg)	Elemento	Longitud de onda (nm)	LOD (mg/Kg)
Ag	328.068	0.0130	Nd	406.109	0.0047
As	188.979	0.0581	Ni	231.604	0.0071
Au	267.595	0.0074	Pb	220.353	0.0258
B	249.677	0.0075	Pd	340.458	0.0130
Ba	233.527	0.0011	Pr	390.844	0.0166
Be	313.107	0.0002	Pt	265.945	0.0520
Bi	223.061	0.0153	Re	197.248	0.0261
Cd	228.802	0.0056	Rh	343.489	0.0494
Ce	413.764	0.0097	Ru	240.272	0.0116
Co	228.616	0.0048	Sc	361.383	0.0007
Cu	327.393	0.0048	Se	196.026	0.0207
Dy	353.170	0.0047	Sm	359.260	0.0153
Eu	381.967	0.0005	Sn	189.927	0.0076
Ga	417.206	0.0121	Ta	226.230	0.0258
Gd	342.247	0.0039	Tb	350.917	0.0064
Ge	209.426	0.1196	Te	214.281	0.0272
Hf	277.336	0.0074	Th	283.730	0.0123
Ho	345.600	0.0013	Ti	334.940	0.0018
In	230.606	0.0739	Tl	190.801	0.0488
Ir	205.222	0.0250	U	385.958	0.0370
La	408.672	0.0015	V	290.880	0.0017
Li	670.784	0.0001	W	207.912	0.0447
Lu	261.542	0.0008	Y	371.029	0.0012
Mn	257.610	0.0006	Yb	328.937	0.0005
Nb	309.418	0.0053	Zr	343.823	0.0047