

74
2ij



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“DESARROLLO DE METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA
DETERMINACIÓN DE METALES TRAZA (Fe, Cu y Zn) EN
TEJIDOS BIOLÓGICOS MEDIANTE ICP-AES”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

Luis Joaquín Serrano Sánchez

México DF

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA



271749
0



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“DESARROLLO DE METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA
DETERMINACIÓN DE METALES TRAZA (Fe, Cu y Zn) EN
TEJIDOS BIOLÓGICOS MEDIANTE ICP-AES”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

Luis Joaquín Serrano Sánchez

México DF

1999

Jurado asignado:

Presidente: Dra. Josefina de Gyves Marciniak.

Vocal: Dra. Luz Elena Vera Avila

Secretario: Dr. Octavio Reyes Salas

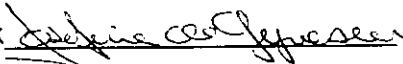
1er Suplente: Dr. José Alejandro Baeza Reyes

2do Suplente: Profa: Jacqueline Padilla Valdés.


Sitio donde se desarrollo el tema:

Laboratorio 113 de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química UNAM, y laboratorio 209 del edif. B de la Facultad de Química UNAM.

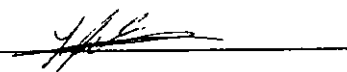
Asesor del tema:

Dra. Josefina de Gyves Marciniak 

Supervisor Técnico:

L.Q.I. María Teresa de Jesús Rodríguez
Salazar 

Sustentante:

Luis Joaquín Serrano Sánchez. 

Agradecimientos:

Con agrado y nostalgia agradezco a Dios por la culminación de la carrera de QFB, si no bien de manera exitosa como lo hubiese querido, con las bases necesarias para incursionar en el campo de la ciencia y maravillarme cada día del esplendor e intrigas que nos aguarda al ir en busca de nuevos conocimientos, además por los padres, novia y amigos que me ha concedido.

De manera especial a mis queridos padres por el apoyo incondicional que me brindaron para que pudiese terminar mis estudios con las mejores condiciones que me pudieron ofrecer aun a costa de algunos sacrificios. De ellos aprendí la mayoría de las cosas tales como; la dedicación, el coraje para realizar lo que se desea, el aprovechamiento de lo que se tiene, la superación, el cariño hacia el hogar y el trabajo, entre otras. También les agradezco el cariño con el cual me tratan y las todas esas cosas que siempre han hecho por mi, ya que si las enuncio ocuparía mucho espacio y no terminaría de agradecerles la vida que me dieron.....gracias .

También quiero hacer mención de Cori (mi manecilla), quien me ha acompañado a lo largo de un buen trayecto de la carrera y con quien he compartido momentos memorables tanto buenos como malos, además del cariño que le tengo también admiro algunas de sus cualidades y se que pase lo que pase no olvidare el tiempo que ha estado a mi lado.

A mi amigo de toda la vida Armando Antuna V. (Armang), por que su amistad a perdurado a pesar de las vicisitudes de la vida, y por los buenos momentos de chavos en el memorable CCH, los partidos, las fiestas, los reven, las amistades y no solo eso, sino también momentos críticos, en los que ha contado conmigo y Yo con él.

A la **Dra. Josefina de Gyves M**; quien gracias a su paciencia, conocimientos y apoyo académico contribuyo en gran medida a mi formación, de ella aprendí como debe ser un buen investigador.

Supe también que un investigador debe tener calidad y calidez humana, además de un espíritu de cooperación para alcanzar metas comunes en beneficio de la humanidad, siendo en algunos casos las cosas de las que más se carecen en el ámbito científico, además, el campo del conocimiento no es exclusivo de tal o cual investigador sino de la humanidad en general, claro esta que en primer instancia es del investigador quien lo estudia en beneficio social.

No me olvidaría de mis grandes amigos;

Con quien siempre me junte; Corina (manecilla), Erika, Anita, Caty, Elizabeth, Andrea, Lizette, Angelica, Karina, Carlitos, etc., quienes me acogieran en su círculo y me brindaron su amistad, sus sentimientos, sus confidencias, su comida, su afecto, su tiempo, su cariño y muchas cosas más.

Norma, Elena y Laura ; a mis sinceras amigas y compañeras, con quienes he compartido ideales y esperanzas sobre el futuro, triunfos y metas por lograr, quienes además de alguna u otra forma me han mostrado que las cosas si se pueden realizar con esfuerzo, estudio y dedicación.

Paco, Ribo, Andromaco; Quienes organizamos, asistimos y convivimos en algunos eventos, y convivimos en equipos de clase los cuales fueron los mas divertidos y provechosos de mi estancia en la Fac, Con ellos aprendí a relacionarme con toda la gente, debido a sus diferentes caracteres y gustos. No los olvidaré.

Miguel Angel (Peluso); A pesar de que convivimos poco pero conocí la determinación necesaria para emprender cosas arriesgadas, encontré a una

persona capaz de dar la vida por sus ideas, lo cual es raro en estos momentos y que en algún tiempo Yo quise hacer.

A **José Luisillo** (Meraz): Por el apoyo técnico que me brindó en la realización de este trabajo, tanto en mi casa como en la escuela, además de ser una persona de corazón noble se puede confiar en él. Espero sigamos conviviendo más y nuestra amistad crezca.

A **los habitantes del Laboratorio 113** de posgrado; Lulus, Mayte, Julio, Lalo, Germán, Armando y Juanpa de quienes aprendí muchas cosas, tanto buenas como malas, también les agradezco la paciencia que me tuvieron en muchas ocasiones.

Agradezco también a todos y cada uno de los personajes que tuve la fortuna o desdicha de conocer durante la larga jornada que emprendí en septiembre de '93, ya que de todos aprendí algo que me sirvió o servirá en su momento.

Al final, pero no menos importante, a la **Facultad de Química y a la UNAM**, por todos esos años que me albergó en su regazo y ahora abandono aunque no por mucho tiempo, ya que gracias a las oportunidades que brinda tuve la fortuna de terminar una carrera con alto nivel académico en el ámbito nacional y latinoamericano. Es mi segundo hogar durante mi juventud y estoy seguro que en un futuro recordaré los bellos momentos de estudiante.

A la **DGPA** por el apoyo financiero otorgado al proyecto dentro del cual se realizó este trabajo (IN200725), y al Dr. José Pedraza Chaverry que apoyo en la realización de la parte experimental por microondas del presente trabajo.

Tabla de contenido

Capítulo I Introducción.....	6
1. Antecedentes.....	6
1.1 Zinc.....	8
1.2 Cobre.....	9
1.3 Antagonismo biológico entre el Zinc y el Cobre.....	12
1.4 Hierro.....	13
1.5 Determinación analítica de metales traza.....	14
1.6 OBJETIVOS.....	20
II Parte Teórica.....	21
2 Introducción a la espectrometría atómica.....	21
2.1 Principio de la espectroscopia de emisión atómica (AES)	25
2.1.1 Generalidades sobre el plasma inductivamente acoplado	26
2.1.1.1 Inyección de la muestra.....	28
2.1.1.2 Atomización y ionización del analito.....	30
2.1.1.3 Efectos de Interferencias.....	31
2.2 Principios de la espectroscopia de absorción atómica electrotérmica.	33
III Diseño de experimentos.....	36
3.1 Errores sistemáticos.....	37
3.2 Diseño de experimentos.....	38
3.3 Algoritmo de Yates.....	41
IV . Metodología	44
V . Desarrollo.....	47
5.1- Equipo utilizado.....	47
5.2 - Reactivos y soluciones.....	48

5.3- Material	48
5.4. Estándares de referencia	49
5.5. Programa de cómputo utilizado.....	49
VI Resultados y discusión	50
6.1 Disección	50
6.2 Condiciones de secado.....	50
6.3 Condiciones de molido.....	52
6.4 Proceso de digestión.....	53
6.4.1 Diseño de experimentos.....	57
6.4.1.1 Datos y figuras obtenidas con el programa de cómputo Statgraphics	60
6.4.2 Diseño tradicional de una sola variable.....	76
6.5 Determinación analítica por ICP-AES.....	79
6.5.1 Linealidad.....	79
6.5.2 Efecto de la adición de sodio.....	82
6.5.3 Efecto de la adición estándar.....	83
6.6 Evaluación de las figuras de mérito de los estudios realizados por ICP.....	86
6.6.1 Precisión	86
6.7 Determinación analítica por Horno de Grafito.....	89
6.7.1 Optimización de la temperatura de calcinación.....	89
6.7.2 Optimización de la temperatura de atomización	90
6.7.3 Ensayos para determinar el volumen de modificador de matriz a agregar.....	92
6.7.4 Ensayos para determinar la influencia de la optimización de los parámetros anteriores en el análisis de la muestras biológicas.....	94
Conclusiones.....	97
Bibliografía.....	102

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1. Antecedentes

En la antigüedad existía un equilibrio biológico entre todos los organismos, plantas y animales sobre el planeta. Sin embargo, serios problemas han surgido con el desmedido y en ocasiones irracional desarrollo de tecnología.

El hombre ha provocado que el entorno inorgánico varíe de manera drástica en pocos años. La lluvia ácida, los fertilizantes químicos, las industrias que desechan metales pesados, así como las que extraen minerales, o que desechan grandes cantidades de agua de sus procesos al medio ambiente, aunado a los grandes desastres ecológicos provocan un cambio en la distribución normal de la mayoría de los nutrientes indispensables para la vida, incluyendo algunos metales traza.¹ Se tiene el conocimiento del papel vital que desempeñan los metales traza en fenómenos de tipo bioquímico, clínico, nutricional, toxicológico y ambiental, de tal forma que, en los últimos años se han realizado varios estudios, con el objeto de evaluar la concentración de metales traza en muestras biológicas², incluyendo diversos tejidos de animales, los cuales presentan un mecanismo biológico parecido al humano. En este caso, es deseable que los animales seleccionados sean relativamente fáciles de conseguir, de simple manejo, que presenten poca variabilidad biológica, y que se puedan tener en cautiverio en las mismas condiciones de luz, alimentación, higiene, etc.

Las ratas de laboratorio raza Wistar, sexo macho, se consideran especímenes ideales para este tipo de estudios, ya que tienen bastantes similitudes fisiológicas con el humano y su metabolismo es muy similar.

Por otro lado, la importancia del análisis de metales traza como Fe, Cu y Zn en muestras biológicas, se deriva del papel que estos metales tienen en el

funcionamiento normal de los seres vivos, por ejemplo, el Zn se requiere para funciones tales como, síntesis de DNA³, espermatogénesis⁴, respuesta inmune celular, división celular³, etc.; el Fe es requerido para la síntesis de las proteínas del grupo hemo⁵ y es transportado en la sangre por la proteína transferrina; el Cu está involucrado en la síntesis de citocromo oxidasa y otras enzimas de importancia similar que se comentarán posteriormente con más detalle.^{8,7,6}

Estos elementos (Fe, Cu y Zn) se encuentran en el organismo y al clasificarlos quedan dentro del grupo de los elementos traza, conocidos también como **oligoelementos**. Los oligoelementos son metales cuya concentración en los organismos vivos es de $\mu\text{g/g}$ (ppm) de tejido o $\mu\text{g/L}$ (ppb) de fluido biológico y desempeñan un papel importante en los procesos fisiológicos de los animales.⁵

Naturalmente no sólo estos elementos (Fe, Cu y Zn), son importantes en el metabolismo de los seres vivos sino que junto con los demás oligoelementos establecen el delicado equilibrio entre la vida y la muerte de los organismos. Hay 14 oligoelementos reconocidos en la actualidad como necesarios para la vida. Existen en concentraciones <0.005% del peso corporal total. Por orden de importancia demostrada son; **hierro**, yodo, **cobre**, manganeso, **zinc**, cobalto, molibdeno, selenio, cromo, estaño, vanadio, flúor, silicio y níquel. Por lo general, estos elementos son mal absorbidos y mal excretados pero pueden acumularse en cantidades tóxicas.⁵

La variación en los niveles normales de concentración de estos oligoelementos puede representar alteraciones importantes en la salud o estado homeostático de los seres vivos. De este modo, si se determina oportunamente la concentración de metales como el Fe, Zn o Cu en las muestras biológicas y se conoce el valor promedio normal, se puede asociar la diferencia de concentración, en caso de haberla, con las diversas

enfermedades que se derivan de la escasez o exceso de estos metales en la célula y que ponen en riesgo la vida del sujeto de estudio (como por ejemplo en el síndrome nefrótico), además, si estas variaciones se contemplaran en el seguimiento clínico, podría ayudarse a prevenir o tratar estas afecciones sin la necesidad de que la enfermedad prosiga hasta causar un daño que puede ser irreversible.

Se considera importante comentar el papel de cada metal en el metabolismo por ello a continuación se describe cada uno de ellos por separado, así como los trastornos metabólicos que se derivan de la escasez y exceso.

1.1 Zinc

El cuerpo contiene de 1 - 2.5 g de Zn, que se encuentra principalmente en los huesos, dientes, cabello, piel y testículos. En el plasma, una tercera parte está fijado de modo débil a las albúminas, mientras las otras dos partes restantes de modo firme a las globulinas. También se encuentra principalmente como anhidrasa carbónica en los eritrocitos, en los leucocitos y las plaquetas.⁵

Las principales metaloenzimas del Zinc son; carboxipeptidasa A, alcohol deshidrogenasa, deshidrogenasa láctica y la glutámica.

Es un metal bastante susceptible a la quelación por los componentes alimenticios como fibras y fitato de pan integral.

Geofagia y parasitosis, pueden ser factores que llevan a una absorción reducida y a problemas de carencia.⁵

La clasificación del Zinc como un componente esencial en la dieta para algunos mamíferos y aves fue establecido hace más de 60 años en estudios realizados por Todd y W.R Elvehjem (1934) quienes afirman que

una deficiencia de éste elemento provoca un efecto adverso en la síntesis de proteínas y/o metabolismo de los ácidos nucleicos, ya que el Zn puede jugar un papel importante en la configuración de la estructura tridimensional del RNA por medio de enlaces covalentes en las bases púricas y/o pirimídicas.⁹

En estudios posteriores se afirma que la disminución en el apetito es uno de los síntomas observados en la deficiencia de Zinc(Mills & Chésters).⁴⁻¹⁰

Se asocia la deficiencia aguda de este metal con anorexia, desórdenes del olfato, gusto, y disturbios cerebrales leves, además se asocia con una deficiencia de vitamina A.^{8,11,12,13}

Se conoce que también provoca un mal desarrollo en la epidermis y daños epiteliales¹⁴, en algunos casos puede originar piel vulnerable, escoriaciones crónicas, debido a que, niveles adecuados promueven la migración proliferación y maduración de la epidermis y ayuda en la reparación de tejido después de un daño severo¹⁵.

Se ha mencionado que las deficiencias de Zinc en el organismo humano son en ocasiones causadas por la dieta. La quelación del Zinc de la dieta por componentes del pan integral y de algunas fibras, juega un papel importante ya por este proceso se impide la absorción adecuada de éste metal. Esta deficiencia se puede compensar ingiriendo alimentos ricos en Zinc, como son; lentejas, huevo, guisantes, avena, etc. ó bien mediante terapia de sulfato de Zinc.

1.2 Cobre

El cuerpo adulto normal contiene de 100 a 150 mg de cobre, 90% del cual se encuentra en el músculo, el hueso y el hígado. En la sangre, más del 90% se encuentra en el plasma asociado a la ceruloplasmina (una α_2 -globulina que transporta el cobre) con el restante ligado a albúmina y en los eritrocitos.

La concentración de cobre en plasma se eleva durante el embarazo y la terapéutica de estrógenos (tratamiento con hormonas para disminuir los efectos de la menopausia), por que el aumento de los niveles de proteína en plasma producido por las hormonas incluye la ceruloplasmina.⁵

La ceruloplasmina es una proteína de peso molecular alrededor de 151000 Daltones y contiene 8 átomos de cobre por molécula, presentando una absorción a 605nm. La concentración de éste compuesto en el suero de un adulto normal es de 270-370 mg /L.⁵

Se ha demostrado que la ceruloplasmina funciona como una enzima que oxida Fe^{2+} a Fe^{+3} , ayudando al transporte de éste a través de la pared intestinal^{15,16}. Por otro lado; el cobre juega un papel importante en la formación de pigmentos en invertebrados y en los insectos, puede favorecer el endurecimiento del cascaron de los huevos de algunas especies animales, pero no obstante su presencia en exceso es tóxica.^{17,18,19}

El contenido de cobre de una dieta ordinaria, es mayor que 2mg/día, además el cobre es un componente de los sistemas enzimáticos mitocondrial (citocromo oxidasa), citoplasmático (tirosinasa) y nuclear, de tal suerte que los animales con contenido bajo de éste elemento presentan una menor actividad de tales cuproenzimas.^{5,20}

Los efectos adversos de la deficiencia de Cu en la dieta sobre el sistema cardiovascular han sido bien documentados y generalmente incluyen ensanchamiento y daño arterial.¹⁵

El cobre es esencial para la estructura y funcionalidad integral del sistema cardiovascular, en ocasiones una deficiencia de éste se asocia con una ruptura ventricular en un corazón ensanchado. Se enuncian muchas

hipertrofias cardiacas como consecuencia de una deficiencia de Cu y el mecanismo más común responsable de esta deficiencia es la anemia.

Se encuentran también anormalidades del sistema inmune asociadas con la deficiencia de cobre en la dieta, y se incluyen alteraciones en la morfología de los órganos linfoides. Además, el cobre es un cofactor esencial para la dopamina β - monooxigenasa por lo cual, al existir deficiencia en la alimentación disminuye la producción de norepinefrina(NE) y otros neuro-transmisores en el cerebro. ¹⁷

El exceso de cobre se puede originar por trastornos hereditarios del metabolismo del cobre, ingreso excesivo o en casos especiales de riesgo para ciertos sectores de la población por la exposición a soluciones de hemodiálisis contaminadas con éste metal. Entre las manifestaciones de la intoxicación aguda por cobre, se encuentran las náuseas, vómitos, dolor abdominal, diarrea, y mialgias difusas. En algunos casos, estados mentales anormales que progresan hasta el coma y la muerte, se asocian a una acidosis metabólica profunda y pancreatitis necrotizante. No obstante el rasgo más consistente es la anemia hemolítica grave.

Se ha encontrado que en concentraciones de 10^{-4} a 10^{-3} M, la acción tóxica del metal puede ser atribuida a una combinación con los grupos tiol (-SH) de ciertas enzimas.

De las enfermedades heredables asociadas con alteraciones en la concentración de cobre se tiene el **albinismo**, que se caracteriza por falta de pigmentación en la piel, los cabellos y los ojos. Puede ser generalizada, localizada en la piel, o los ojos. El defecto principal parece ser la ausencia de la cuproenzima **tirosinasa**, que es necesaria para la conversión de tirosina en melanina, en el melanocito.

El **síndrome del pelo rizado de Menke** es una anomalía ligada al sexo, causada por un defecto en la absorción intestinal de cobre. Los niños pequeños afectados tienen niveles bajos de cobre y de ceruloplasmina que dan lugar a degeneración cerebral progresiva, retraso del crecimiento, cabello anormalmente escaso y frágil, y muerte generalmente en el primer año. El cobre administrado oportunamente por vía intravenosa (IV) en la infancia puede aliviar éste trastorno.

El valor normal de Cobre reportado en suero de humanos es de 1-2 mg/L.^{5,20}

Resulta importante recordar que la cantidad de suero obtenida tras un proceso de centrifugado de sangre total, es de alrededor del 30-60% del volumen inicial.

Se ha observado también que una deficiencia de Zn y cobre en la época de preñación puede ocasionar teratogenicidad o diabetes, esto es una evidencia que soporta la teoría de que una deficiencia de Zn en la alimentación representa, durante la época de reproducción, un riesgo para los humanos.

1.3 Antagonismo biológico entre el Zinc y el Cobre.

Desde hace 60 años Smith y Larson(1946) descubrieron que existe un antagonismo biológico entre el metabolismo del Zn y el Cu, ya que encontraron que una dieta abundante en cobre puede aliviar los síntomas de una intoxicación de Zn en ratas, más tarde, Van Reen (1953) demostró que una dieta abundante en Zn disminuye la actividad enzimática de la citocromo oxidasa, que es dependiente de Cu. No sólo estos dos ejemplos se han

observado y por ello es importante estudiar el balance de estos elementos simultáneamente en los organismos vivos.

1.4 Hierro.

En el cuerpo de un adulto normal se tienen de 2 a 6 mg de hierro. Entre el 60 -70% se halla presente en forma de grupo hemo, aproximadamente un 13% se encuentra formando parte de compuesto no hemo, tales como la ferritina y hemosiderina, y alrededor de un 3% como mioglobina. El hierro también se encuentra formando parte de varias enzimas intracelulares de gran importancia y menos del 0.1% del hierro total del cuerpo circula en plasma ligado a la β_1 - globulina transferrina. Los mayores depósitos de hierro se encuentran en el hígado, en el bazo y la médula ósea.^{5,20}

En los alimentos el hierro se encuentra en su forma inorgánica y en su forma orgánica pero este debe ser reducido a su estado ferroso para ser absorbido, de éste modo el ácido ascórbico reduce el ion férrico en ferroso y favorece su absorción. El hierro entra en varios ciclos metabólicos del cuerpo y cada 120 días la masa total de los grupos heme son destruidos y sintetizados nuevamente, liberando 21-24 mg de hierro/día y la mayor parte de éste queda disponible para la síntesis de otros grupos heme²¹.

Aproximadamente de 0.6-1.0 mg del hierro corporal total, se secreta diariamente por el sudor, bilis, orina, heces, y como la cantidad absorbida de hierro en los individuos en las dietas ordinarias es de 1-1.5 mg/día, la mayoría se encuentra justo en el equilibrio positivo adecuado de hierro, y las pérdidas adicionales debidas a hemorragias o lactancia dan lugar fácilmente a deficiencias de éste metal.^{5,20}

La carencia da lugar a fatiga, palpitaciones, lengua lisa y dolorosa, estomatitis angular, disfagia, gastritis, enteropatía, así como anemia. En los

recién nacidos se produce disminución del crecimiento y alteración del desarrollo mental.

La sobrecarga de hierro se caracteriza por la deposición focal o generalizada de hierro dentro del interior de los tejidos corporales (**hemosiderosis**). Cuando esta deposición se asocia a lesión tisular, se conoce como **hemocromatosis**, y esta última puede ser, idiopática, familiar o adquirida.

El valor normal reportado en humanos en suero es de 0.5-1.5mg/L ⁵.

1.5 Determinación analítica de metales traza.

En cuanto a la determinación analítica de estos metales en muestras biológicas, se tiene que, hace algunos años para la determinación de Zinc en especies animales de experimentación se consideraba el peso corporal como el más frecuente criterio de evaluación; sin embargo, se ha demostrado que no es representativo este procedimiento. Dreosti, Tao y Hurley (1968) encontraron que el Zinc en plasma y hueso puede ser lo suficientemente sensible a alteraciones de carácter alimenticio¹³. Con esto se inicia el estudio con ratas para determinar niveles de Zinc en plasma, desarrollándose numerosas técnicas analíticas.¹³

Para poder determinar cualquier metal traza por un método analítico, usando la técnica de emisión atómica, es conveniente que el analito de interés se encuentre libre en solución acuosa no formando parte de compuestos y/o complejos bioinorgánicos²².

Como las muestras biológicas no son completamente solubles en agua o en solventes orgánicos debido a su compleja composición de carbohidratos, proteínas y constituyentes lipídicos, es necesaria una digestión para descomponer el material orgánico y liberar los metales de los demás componentes de la matriz.^{22,23}

Existen diferentes métodos de digestión reportados para las muestras biológicas^{1,12,23,24,25,26,27}, los cuales varían en factores tales como: procedimiento, el tiempo, reactivos a utilizar (en cuanto tipo y concentración de metales), y el equipo utilizado en el proceso.

Algunos ejemplos de los procesos de digestión son:

- a) Digestión convencional en medio ácido
- b) Digestión parcial en medio ácido.
- c) Digestión por microondas.
- d) Digestión por microondas a altas presiones.
- e) Secado a cenizas en horno programable.
- f) Solubilización con hidróxido de tetra metil amonio.

De todas estas alternativas es necesario elegir la más adecuada para las condiciones de trabajo.

La digestión convencional en medio ácido es la más conocida y utilizada para liberar los metales de interés de la mayoría de las matrices sólidas, ya sean, minerales u orgánicas. Consiste en atacar a la matriz con ácidos concentrados o mezclas de ellos a temperaturas de ebullición por un lapso de 12-24 h, hasta la total disolución de la muestra. Se puede utilizar ácido nítrico, mezcla de nítrico-sulfúrico, sulfúrico, perclórico, etc.²⁸. El ácido perclórico, es normalmente usado en algunos trabajos para la mineralización completa del material biológico, además se recomienda en algunos procedimientos²⁸, no obstante se pretende disminuir su uso y se está descontinuando por cuestiones de seguridad y medio ambiente.

Ultimamente se han desarrollado estudios utilizando la digestión parcial en medio ácido ^{24,29,30} la cual como su nombre lo indica consiste en atacar la muestra con ácido nítrico en un periodo de tiempo corto (20-30 min. aproximadamente) a su temperatura de ebullición, con la ventaja de que es un proceso rápido, sencillo, de bajo costo y que puede utilizarse para un gran número de muestras.

El desarrollo tecnológico ha generado la aparición de los equipos de digestión por microondas que en un principio presentan grandes ventajas, ya que requieren de un tamaño de muestra pequeño, y un tiempo de proceso relativamente corto en comparación con la digestión convencional.^{1 12,23 31,32,33} Los primeros equipos que aparecieron no eran cerrados y constaban de recipientes de vidrio que se introducían en una cavidad donde se encontraba la fuente de energía, posteriormente aparecieron las conocidas bombas Parr y los digestores de microondas. Esta técnica tiene la característica de generar grandes presiones y temperaturas durante la descomposición ácida de las muestras.

Existe otro proceso de digestión que no es muy utilizado, éste se basa en calcinar la materia orgánica y/o otros materiales presentes en la muestra por medio de un programa de temperaturas, para después solubilizar los residuos en una solución ácida. Presenta el inconveniente de que se pueden perder los analitos de interés, o bien, fragmentos de la muestra.²⁷

También se realizaron estudios solubilizando muestras biológicas en hidróxido de tetrametil amonio para determinar minerales,³⁷ pero los blancos y las muestras suelen ser inestables, y la solución resultado de esta digestión alcalina no se puede introducir directamente en muchos equipos.

Adicionalmente, para los estudios realizados en el campo de la clínica es cada día más relevante el trabajar con pequeñas cantidades de muestra, y que el proceso de análisis sea más rápido, ya que en algunos casos las muestras son de neonatos, o bien, de enfermos cuyo estado de salud es crítico y no es conveniente causar traumatismos por una toma de muestra ya sea de sangre o de cualquier otro componente del organismo, es por ello, que en los últimos años se han realizado estudios para comparar las diversas técnicas de digestión, en muchos trabajos las técnicas más

utilizadas son la digestión por microondas y la digestión parcial.

1, 23, 26, 27, 34, 35, 36

Para el análisis de rutina un procedimiento de descomposición adecuado es aquel que sea útil para los tejidos, niveles de concentración manejados, y los límites de detección de la mayoría de los equipos instrumentales²², que se realice con equipos comunes en cualquier laboratorio, que sea sencillo, rápido de realizar, y que consuma pocos reactivos de preferencia .

En la actualidad sólo poca información ha sido publicada sobre el contenido real total de los metales en tejidos biológicos específicos que nos permita realizar una comparación directa de la concentración elemental de cada metal en los diferentes tejidos. En general, en la literatura se encuentran reportados resultados globales de estudios que son realizados por diversas metodologías analíticas³⁰.

Dado el tipo y número de muestras generalmente requeridas para la mayoría de los tejidos y/o muestras biológicas, las técnicas analíticas instrumentales más empleadas son; la absorción atómica, espectroscopia de emisión y análisis por activación neutrónica¹⁴, las cuales suelen presentar interferencias de tipo espectral o de fondo. Esta situación nos indica que es necesario realizar u obtener un método que se pueda generalizar para la mayoría de los tejidos y/o muestras biológicas y que presente ventajas sobre los existentes hasta el momento.

De esta forma y tras un estudio minucioso se consideró la evaluación de los procesos de digestión por microondas y de digestión parcial con ácido nítrico concentrado, como las más adecuadas para la determinación de metales traza (Fe, Cu y Zn) en muestras biológicas por ICP-AES.

En la siguiente tabla se muestran algunos resultados de los trabajos anteriormente realizados para los diversos tejidos biológicos, así como, el tipo de digestión, los metales determinados y la técnica de lectura utilizada.

1.5.1 Tabla1 Resumen de valores obtenidos por diversos métodos de digestión y técnicas analíticas.

Tejido	Tipo de digestión	Conc. Zn	Conc. Fe	Conc. Cu	Técnica de Lectura
Higado de rata	No descrito ¹⁸	NR	57	4.6	NR $\mu\text{g/g}^*$
Higado de rata	Combinación de dig. Hum. y calci. ¹⁷	NR	NR	3.5	AAS $\mu\text{g/g}^*$
Higado de rata	NR ¹³	NR	NR	5.6	NR $\mu\text{g/g}^*$
Higado de rata	Formación de complejos ⁶	NR	NR	13.9	NR $\mu\text{g/gtotal hig}$
Higado de rata	Digestión Parr ³⁰	8	84	4.5	ICP-AES $\mu\text{g/g PH}$
Higado de rata	Digestión Parcial ³⁰	8	78	4.4	ICP-AES $\mu\text{g/g PH}$
Higado de rata	500mg+1.25mlHNO ₃ y microondas ¹	11.02	151.0	3.38	ICP-Masas $\mu\text{g/ml (25ml)}$
Músculo de rata	500mg+1.25mlHNO ₃ y microondas ¹	12.5	20.78	1.02	ICP-Masas $\mu\text{g/ml (25ml)}$
Higado certi. Bovino	0.2-0.3mg+2ml HNO ₃ 20min parcial ²⁹	142	71	184	ICP-AES $\mu\text{g/g PS}$
Higado certif. bovino	Digestión total H ₂ SO ₄ ,H ₂ O ₂ 12h ²⁹	142	74	60	AAS $\mu\text{g/g PS}$
Higado fresco bovino	0.2-0.3mg+2ml HNO ₃ 20min parcial ²⁹	110	315	134	ICP-AES $\mu\text{g/g PS}$
Higado certif. bovino	Digestión total H ₂ SO ₄ ,H ₂ O ₂ 12h ²⁹	105	51	15	AAS $\mu\text{g/g PS}$
Higado certif. bovino	Microondas (Parr) ¹⁵	17.1	60.3	150	ICP-Masas $\mu\text{g/g PS}$
Higado certif. bovino	Bombas Parr ³⁰	116	65	153	ICP-AES $\mu\text{g/g PS}$
Higado certif. bovino	Microondas ³⁰	89	159	145	ICP-AES $\mu\text{g/g PS}$
Higado certif. bovino	Digestión Parcial ³⁰	67	144	131	ICP-AES $\mu\text{g/g PS}$

En donde NR = No reportado, $\mu\text{g/g PH}$ = microgramos de metal sobre gramos de tejido en peso húmedo, $\mu\text{g/g PS}$ = microgramos de metal sobre gramos de tejido en peso seco, $\mu\text{g/g}^*$ = microgramos de metal sobre gramos de tejido pero no explica si es en peso seco o peso húmedo, $\mu\text{g/ml}$ (25ml) microgramos de metal sobre mililitros y de muestra se tienen 25 ml, $\mu\text{g/gtotal hig}$ microgramos de metal sobre gramos del peso total del hígado.

En el presente estudio se desarrollan metodologías analíticas para la determinación de metales traza en muestras biológicas, partiendo de la disección de la muestra de un organismo vivo, hasta la cuantificación mediante una técnica analítica suficientemente sensible, exacta y precisa, tomando en consideración aquellos factores que tienen una influencia notable en el proceso como son: cantidad de muestra, tipo de tejido, tiempo y tipo de digestión entre otros.

Es necesario tomar en cuenta la posible contaminación de las muestras ya que la contaminación se puede dar por impurezas de los reactivos, o un inapropiado lavado del material y/o aparatos del laboratorio, con los cuales las muestras tiene contacto directo.

Se debe considerar también la existencia de otros metales que presentan características similares y están presentes en mayor proporción en un tejido, tales como Calcio, Magnesio, Manganeso, Cobalto, Silicio y Sodio, la formación de complejos de los cationes de interés, y la necesidad de tener a los elementos en estado inorgánico.

El análisis elemental se realizó, en primera instancia por, ICP-AES debido a que el plasma de argón es una excelente fuente de vaporización, atomización, excitación,³⁶ y ionización^{15,39}, además de estar provisto de un monocromador de alta resolución programable, usado para el análisis secuencial, de metales presentes tanto a nivel de trazas y como en mayores concentraciones en las muestras de interés^{22,37}. En el caso de que los límites de detección del ICP-AES no permitieran la lectura de algunos elementos, se utilizó como técnica

alterna en el estudio la espectrometría de absorción atómica electrotrémica (ETAAS).

El trabajo realizado formó parte de un proyecto conjunto entre dos secciones del área química (Bioquímica y Química Analítica) donde el Dr. José Pedraza Chaverri es el responsable del área Bioquímica y la Dra. Josefina de Gyves M. del área Analítica. Cabe mencionar que era el inicio de una nueva línea de investigación en la cual se contribuye a la formación de recursos humanos que interactúan con distintos grupos dentro de la misma Facultad de Química y de otras facultades de la UNAM. Cabe señalar que a lo largo del proceso de planeación el área de bioquímica adquirió un horno de microondas programable con el cual se realizaron los experimentos aquí descritos.

1.6 Objetivos.

General

- Desarrollar una metodología analítica para la determinación de Fe, Cu, y Zn en tejidos biológicos, mediante ICP-AES.

Específicos

- Establecer procedimientos eficaces para el secado, molido, conservación y digestión de muestras biológicas: tales como riñón, hígado, músculo, pulmón, testículo y bazo para la posterior determinación de Fe, Cu, y Zn.
- Optimizar los parámetros experimentales de la técnica de ICP-AES para los elementos de interés en las muestras estudiadas.
- Evaluar las figuras de mérito (precisión, exactitud) con estándares certificados.

II PARTE TEORICA.

2. Introducción a la espectrometría atómica

La química analítica es parte de la química que se encarga de identificar y cuantificar las especies involucradas en un sistema químico, así como de estudiar su comportamiento dentro del él. Por otro lado, la espectroscopia se puede definir a *grosso modo* como la interacción de la radiación electromagnética con la materia y que tiene una aplicación tanto física como analítica. En algunos laboratorios los espectroscopistas utilizan la emisión, dispersión o absorción de luz para identificar componentes de un sistema químico que en ocasiones se encuentra a miles de kilómetros de distancia, mientras que otros usan el mismo principio para determinar el contenido y concentración de especies atómicas o moleculares presentes en un sistema.

El principio de la espectrometría fue descubierto desde hace ya varios años. La radiación electromagnética es un flujo de partículas discretas de energía llamadas *fonones* que se transmiten por el espacio a enormes velocidades, tiene naturaleza ondulatoria y está acompañada de un campo de fuerza magnético dispuesto perpendicularmente. Los campos eléctrico y magnético asociados con la radiación son magnitudes vectoriales que se pueden manejar con cálculos matemáticos y que además interactúan con la materia. ⁴⁰

Según Niels Bohr (Premio Nobel en 1922), los átomos poseen estados electrónicos basados en su estructura atómica característicos y únicos de cada elemento. El estado de mínima energía es el estado basal. Las transiciones de electrones entre un estado de menor energía a otro de mayor, se producen por la absorción de cuantos discretos de energía (paquete fotónico), que se encuentran relacionados con la frecuencia de la radiación electromagnética absorbida. ^{25 41}

La energía del paquete fotónico absorbida depende de la frecuencia de la radiación, y está dada por la ecuación

$$E = h \nu$$

Ecuación establecida por Max Planck (Premio Nobel en 1918), donde h es la constante de Planck, (6.63×10^{-27} ergios/s), y se puede escribir en términos de la longitud de onda como ^{25 33,41}

$$E = hc / \lambda$$

Cuando se hace incidir un haz de radiación electromagnética con la suficiente energía como para poder hacer que los electrones del elemento puedan pasar a un nivel energético más alto, se produce un cambio de estado, del estado electrónico basal al estado excitado.³³

Al contrario, cuando se pasa de un estado energético más alto a uno más bajo, se produce la emisión de cuantos de energía que corresponden a la frecuencia de la radiación emitida. Se puede decir entonces que la radiación corresponderá a la diferencia de energía entre el estado basal y el estado excitado, para los dos estados particulares de un mismo elemento la frecuencia de la radiación emitida será exactamente igual a la frecuencia de la radiación absorbida.^{33,42}

Actualmente las técnicas más empleadas para la determinación de metales son las **espectroscopias atómicas**, las cuales se basan en la medida de la absorción, emisión o fluorescencia de la radiación electromagnética por parte de los átomos o iones elementales en un medio gaseoso. Los métodos atómicos se clasifican según el procedimiento utilizado para la **atomización** de la muestra, por el cual los constituyentes de una solución se convierten en átomos o en iones elementales al estado gaseoso. Estos métodos se

consideran en la actualidad muy sensibles y pueden utilizarse para la determinación de analitos en un amplio intervalo de concentración desde % en peso hasta partes por millón (ppm) ^{22,33,36,40,43,44,45}.

La eficacia y reproducibilidad de la fase de atomización, determina en gran medida la sensibilidad, precisión, y exactitud del método; es decir, la atomización es el paso crítico de la espectroscopia atómica. En la siguiente tabla se enlistan los principales métodos de atomización, así como, su temperatura, fundamento y abreviatura.

Tabla 2

Clasificación de los métodos de espectroscopia atómica.

Método de atomización	Temperatura típica de atomización °K	Fundamento del método	Denominación del método o abreviatura
Llama	1700-2800	Absorción Emisión Fluorescencia	AAS AES AFS
Electrotérmica	1200-3000	Absorción Fluorescencia	ETAAS ETAFS
Plasma de argón inductivamente acoplado	6000-10000	Emisión	ICP-AES
Arco eléctrico	4000-5000	Emisión	DCP
Chispa eléctrica	4000?	Emisión	Arc

Puede considerarse como la **fente ideal** de atomización aquella que cumpla con las características siguientes:

- a) Atomización del elemento removiéndolo completamente de la solución original, minimizando las interferencias de la matriz.
- b) Atomización total del analito presente con un mínimo de ionización de los demás elementos.
- c) Fuente de energía controlable y que pueda proporcionar la energía necesaria para excitar eficientemente al analito.

- d) Posibilidad de tener un ambiente inerte, el cual no favorezca la formación de moléculas o especies indeseables (óxidos, complejos, etc.) que afecten la precisión de la determinación.
- e) Ausencia de radiación de fondo, o bien, no se presente radiación atómica o molecular indeseable que pueda interferir con la longitud de onda elegida.
- f) Manejo o uso de un grupo amplio de solventes, tanto orgánicos como inorgánicos.
- g) Introducción de muestras sólidas, líquidas o gaseosas³³.

Las espectroscopias atómicas dependiendo de la fuente de excitación, en general, se pueden considerar dentro de alguna de estas tres categorías: de flama, horno (electrotérmica), y plasma. En la tabla 3, se resumen algunas de sus características y se presentan sus ventajas y desventajas en cuanto funcionamiento, versatilidad, y precio. Es conveniente remarcar que algunos de los parámetros pueden variar con el modelo, año, condiciones de operación, matriz utilizada, etc.

Tabla3 Resumen espectroscopias atómicas más comúnmente usadas.

Parámetro	ICP ¹	AAS ²	ETAAS ³	MIP ⁴	Arc ⁵
Temp K	4E3-10E3	1.5E3-2.5E3	1E3-2.6E3	1-2E3	3E3-8E3
gas	argón	aire/acetileno	argón	Helio	argón
LOD(conc) ⁶	2ppb	10ppb	0.1ppb		8ppb
LOD(masa) ⁷	4ng	20ng	5ng		16ng
Sistema fuente	Inducción	Combustión	Paso de voltaje por tub. de graf.	Magnetismo	Paso de voltaje por tub. graf.
Rango de λ ⁸	120-900	190-900	190-900	190-900	190-900
Aplicación más común	ppb de numerosos metales en solución	ppm de 1 metal	elementos en poco volumen (ppb,pg)	Halógenos (Cl,Br,Etc)	Igual que ICP
Precio (Dls)	\$100,000	\$4,000	\$55,000	\$65,000	
Tamaño de muestra	Flujo (ml)	Flujo(ml)	Estática (μ l)	Flujo(ml)	Flujo(ml)
Frecuencia	27.12 - 40 MHz			2450MHz	DC
Poder	1-2kW			0.2-1kW	<100W

Tabla de THE CHEMICAL EDUCATOR 1997springer-verlag NEW York, In. ³³

- 1.-Plasma Inductivamente Acoplado o Acoplado por Inducción
- 2.-Absorción Atómica de Flama
- 3.-Espectrometría Electrotérmica de Absorción Atómica
- 4.- Plasma Inducido por Microondas
- 5.-DC Plasma arco.
- 6.-Limite de detección para Fe en concentración
- 7 -Limite de detección para Fe en masa absoluta
- 8.- Rango Dinámico de longitudes de onda (orden de Magnitud)

La **absorción atómica** consiste en hacer pasar el analito por una fuente de energía térmica para producir la disociación de los componentes químicos en átomos libres, después, se hace incidir un haz de luz de cierta longitud de onda sobre el analito, mediante una lámpara de cátodo hueco o de electrodos de descarga alineada adecuadamente, de tal forma, que se puede determinar la cantidad de radiación absorbida por el analito que será proporcional a su concentración en la muestra.^{40,44,45}

La emisión atómica se tratará con más detalle en el siguiente apartado.

2.1 Principio de la espectroscopia de emisión atómica (AES).

La espectrometría de emisión atómica se basa en la cuantificación de la emisión de radiación de una especie química cuando las partículas excitadas retornan a niveles de energía más bajos o a su estado basal. Tiene amplias aplicaciones en el análisis elemental, usándose principalmente en la determinación de sodio, potasio, litio y calcio especialmente en tejidos biológicos. Por razones de conveniencia, rapidez, y relativa falta de interferencias.

Inicialmente se consideraron dentro de las técnicas espectroscópicas de emisión a las que tenían al analito de interés dentro de una llama caliente que provocaba que el analito emitiera una línea espectral característica, y por eso se denominaba espectroscopia de llama o de emisión atómica. Posteriormente, la palabra espectroscopia de emisión comprendió a un tipo de espectroscopia atómica en la que se utilizan fuentes de excitación de mayor energía que las llamas y hornos. Hasta hace poco se utilizaban en

las técnicas de emisión, dos tipos de fuentes el arco eléctrico y la chispa eléctrica. Pero en los últimos 30 años se han desarrollado las fuentes de *plasma de argón*³⁹, que combinan muchas ventajas de las fuentes de llama, del sistema de arco y de chispa eléctrica.

2.1.1 Generalidades sobre el plasma inductivamente acoplado (Inductively Coupled Plasma, ICP).

Se considera al plasma como una mezcla gaseosa en la cual una fracción relativamente significativa de la especie atómica o molecular presente se encuentra en forma de iones, por lo general, el plasma está constituido de una mezcla de iones y átomos de argón. Una vez que los iones de argón, se constituyen en un plasma son capaces de absorber suficiente energía de una fuente externa como para mantener la temperatura en un nivel, en el que se producen nuevas ionizaciones que conserven el plasma indefinidamente.⁴³

Se han utilizado tres fuentes de poder en la espectroscopia de emisión por plasma de argón. La primera es una fuente de corriente eléctrica continua capaz de mantener una corriente de varios amperes entre los electrodos sumergidos en una corriente de argón, las otras dos son potentes generadores de radio frecuencia o microondas por las cuales fluye el argón, donde las últimas presentan mayores ventajas de sensibilidad y minimización de interferencias.^{39,40,44}

La espectroscopia de emisión atómica con plasma inductivamente acoplado (ICP-AES), es una de las muchas técnicas analíticas utilizadas en espectroscopia atómica. El ICP-AES utiliza un plasma como fuente de atomización y de excitación, el equipo como se conoce hoy en día ha pasado por décadas de desarrollo. La fuente de excitación consiste en tres tubos concéntricos de cuarzo (12-30 mm de diámetro) a través de los cuales fluyen tres corrientes de gas; una corriente tangencial exterior de argón a

una velocidad de 8-20 L/min., otra corriente auxiliar que viaja en el centro de manera tangencial a una velocidad de 0.5-3 L/min., y además el gas nebulizado viaja en un flujo laminar (0.1-1.0 L/min.) que inyecta la muestra en el plasma de argón. El diámetro del tubo mayor es de 25-30 mm aproximadamente.^{33,39}

Se genera un plasma inducido por una radio frecuencia (RF 27.12 MHz, a 40 MHz) de tal forma que en la parte superior de los tubos de cuarzo se encuentra una bobina de inducción refrigerada por agua, alimentada por un generador de radio frecuencias que produce una energía de entre 1-5 kilowatts a aproximadamente 27 Mhz. La ionización del flujo de argón se inicia por medio de una chispa que proviene de una bobina Tesla. Los iones resultantes y sus electrones asociados interaccionan entonces con el campo magnético fluctuante producido por la bobina de inducción (zona H, Fig1). Esta interacción hace que los iones y electrones fluyan en las trayectorias circulares cerradas dentro de la bobina, el calentamiento óhmico, es una de las consecuencias de la resistencia a este movimiento. El material con que esta hecha la bobina de inducción es oro, o bien, una aleación de plata-platino, que presentan una mínima resistencia al paso de la radio frecuencia.

33 39

Aproximadamente a 1cm de distancia de los tubos espirales de la bobina de inducción se encuentra una zona llamada *zona analítica*, la cual ofrece la mejor zona espectral y de mayor sensibilidad.³³

La temperatura alcanzada por el ICP (temp de 6000-10000K ^{38,43}) en la zona analítica es más elevada que las temperaturas típicas de los instrumentos de flama y horno de grafito (2000-3000K), un poco más alta que los instrumentos que utilizan arco eléctrico como fuente de ionización (4000-7000K). La temperatura alcanzada hace necesaria la *aislación térmica* del cilindro externo de cuarzo, lo cual se logra con uno de los flujos tangenciales de argón antes descritos (fig.1).³⁹ y que fue introducido por

primera vez en el equipo diseñado por Reed a inicios de los años 60's. El flujo tangencial enfría el tubo de cuarzo y centra el plasma radialmente en el tubo.

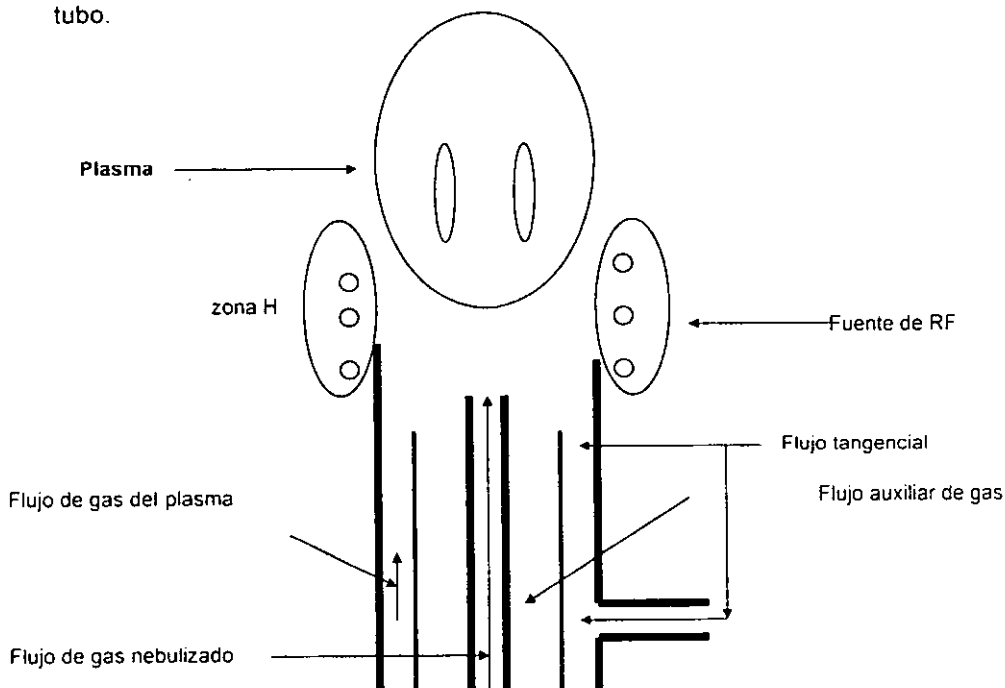


Figura 1 Esquema típico de un plasma (ICP-AES)

Figura tomada de "The Chemical Educator" 1997 Springer-Verlag NewYork,INC.¹⁴

2.1.1.1 Inyección de la muestra

La muestra se introduce dentro de un plasma caliente por medio de un flujo de argón, a través del tubo central de cuarzo, el cual puede arrastrar un aerosol, un vapor generado por calor, o bien, un polvo fino.

Generalmente se introducen las muestras en forma de aerosoles derivados de soluciones acuosas o de tipo orgánico, por medio de un nebulizador neumático o ultrasónico.

Los nebulizadores tienen la función de generar diminutas gotas o aerosoles de la solución, o bien, polvo fino en el caso de los ultrasónicos, para que las partículas así finamente divididas se introduzcan en un flujo de gas siendo transportadas hasta el sitio donde se genera la zona analítica.

La introducción de la muestra por medio de un nebulizador resulta la forma más conveniente de introducir las muestras para un análisis directo de soluciones líquidas, incluyendo, fluidos de procesos industriales, aceites comestibles, derivados de hidrocarburos, matrices minerales y fluidos biológicos.

De los nebulizadores comerciales que existen el más utilizado es el nebulizador neumático, este genera el aerosol al hacer pasar la solución por un pequeño capilar ayudándose del flujo de gas acarreador (argón), el aerosol generado en la cavidad se separa por tamaño y las gotas más pequeñas son acarreadas al plasma, mientras que las otras son desalojadas por otro conducto adecuado (fig2.a). Existe otro tipo similar de nebulizador en el que el flujo de gas se encuentra en ángulo recto con el flujo de la muestra y se genera el aerosol, el cual se emplea principalmente para soluciones con alto contenido de sales minerales (fig2.b).^{15 16 29}

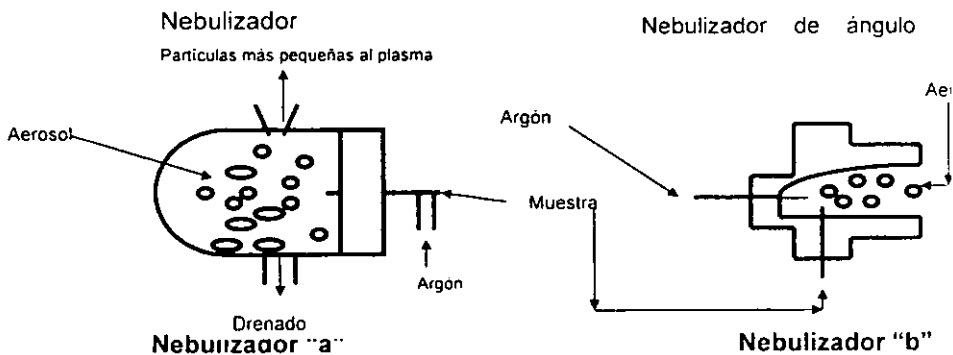


Figura 2 Tipos de Nebulizadores Neumáticos

Figura tomada de el artículo Inductively Atomic Emission Spectrometry. Thomas J. Manning and William R. Gow "The Chemical Educator". 1997 Springer Verlag New York, Inc.³³

2.1.1.2 Atomización y ionización del analito

Las partículas introducidas por el nebulizador en el plasma son calentadas indirectamente por radiación, convección, y por conducción, debido a que existe relativamente poca interacción de la muestra con la corriente circular que sostiene el flujo. Sin embargo, pequeños cambios en la composición de la muestra, tienen un efecto que no se presenta de forma tan evidente en los otros equipos instrumentales y que en ocasiones es muy significativo en las propiedades del plasma que deben tomarse en consideración según sea el caso.

En el momento en que los átomos de la muestra alcanzan la zona de observación, han prevalecido aproximadamente 2ms a temperaturas comprendidas entre los 6000 y los 10000 °K. Estos tiempos y temperaturas son por lo general dos veces o más, más altos que los que se encuentran en las llamas de combustión consideradas como las más calientes (utilizando una mezcla de gases de Acetileno-óxido nitroso), en consecuencia se tiene un proceso de atomización mayoritario que evita muchas de las interferencias clásicas provocadas por la disociación del analito en estudio (fig.3).^{39,43}

Los efectos de ionización de la muestra son pequeños al compararse con otras técnicas analíticas, esto puede deberse a que la concentración de los electrones provenientes de la ionización del argón es grande en comparación con los obtenidos por resultado de la ionización del analito.

33,40,44

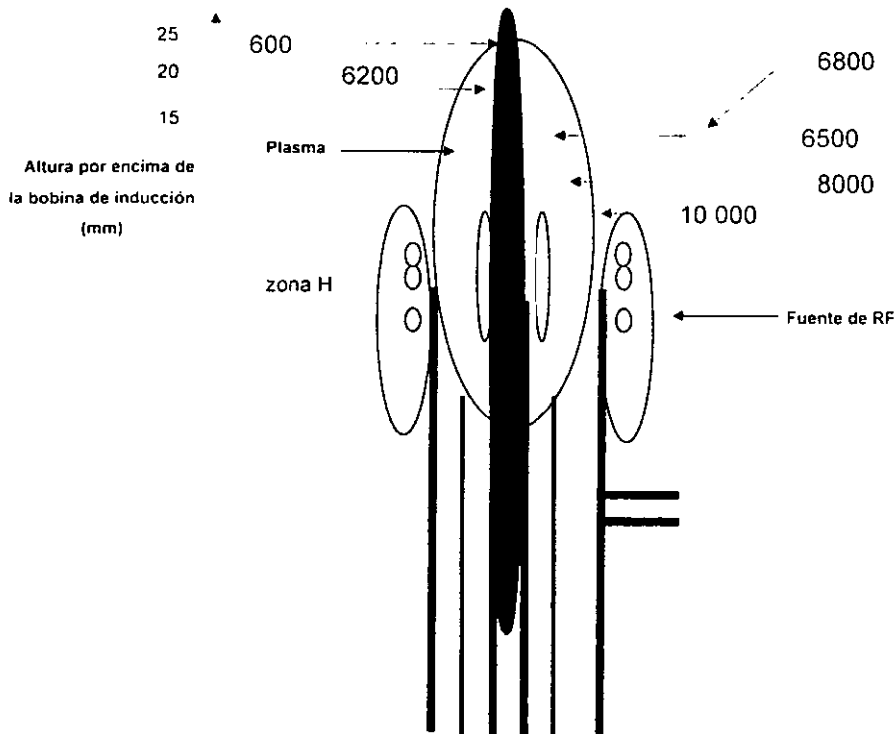


Figura 3 Temperatura de una fuente acoplada por inducción("K)

Figura tomada de "Quantitative Elemental Analyses by Plasma Emission Spectroscopy" Velmer A.Fassel 1978 Science"

2.1.1.3 Efectos de Interferencias

Se pueden considerar como interferencias a todos aquellos fenómenos que impiden la relación normal de la intensidad observada con la concentración real del analito presente en la muestra y que generalmente son debidas a la presencia de compuestos refractarios o de otras especies en la muestra, que impiden que el analito de interés sea cuantificado adecuadamente.^{38 39 40}

Las interferencias en ICP pueden originarse desde la preparación de la muestra, hasta el estado, operación y mantenimiento adecuado del plasma,

Se pueden clasificar las interferencias de manera general en tres categorías: espectral, de vaporización - atomización y de ionización.

Las interferencias espectrales son aquellas donde no se tiene una señal espectral aislada del analito en estudio, y se presentan dos o mas componentes de la matriz que emiten radiación a la misma longitud de onda (por ejemplo Cu a 515.323nm y Ar a 515.139nm). Esta interferencia puede ser minimizada utilizando un sistema de alta resolución y/o leyendo a otras longitudes de onda el analito en cuestión, también se considera la formación de otras especies indeseables que emiten espectros en longitudes de onda cercanas como óxidos, productos de combustión y otros que en ICP son pocos por lo general.

Las interferencias de tipo vaporización - atomización son aquellas en las que se tiene una reducción de la población de átomos del analito y esto reduce la señal de emisión del mismo.

Las interferencias que se consideran incluyen; la formación de compuestos refractarios, de óxidos metálicos, o bien la inclusión del analito en un compuesto refractario, pero estos problemas se presentan más ampliamente en los equipos tradicionales de flama, ya que en el ICP el tiempo de residencia del analito en altas temperaturas favorece la disociación completa y la atomización de la muestra.

Las interferencias de ionización no son significativas por arriba del 2% ³⁵ debido a lo comentado con anterioridad sobre la cantidad mínima de ionizaciones provenientes de la muestra en comparación con las ocurridas con el argón.

Las fuentes de plasma tienen como ventaja además que la atomización se produce en medio inerte desde el punto de vista químico, y la temperatura de la sección transversal del plasma es relativamente uniforme: en

consecuencia, no se producen los fenómenos de autoabsorción y autoinversión. Se pueden obtener curvas de calibración lineales en varios órdenes de magnitud de concentración del analito.

Cabe señalar que las variables de tipo físico, como la diferencia de densidades entre la muestra y los estándares, o bien la velocidad del flujo de inyección de la muestra, podrían jugar un papel importante en la determinación de la concentración de los analitos de estudio. Actualmente se asume que las interferencias de nebulización son las más importantes.

2.2 Principios de la espectroscopia de absorción atómica electrotrémica.

Debido a la concentración que se obtendrá tras la digestión de algunos tejidos, como lo es el músculo, es necesario considerar la utilización de otros equipos cuya características nos permitan determinar concentraciones del orden de 0.02 ppm o menores². Es por ello que en nuestro estudio se utiliza la ETAAS para las muestras y los elementos que lo requieren.

La espectrometría de absorción atómica (AAS) se utiliza en tres modalidades de acuerdo a la forma en que se lleva a cabo la atomización: por Flama (FAAS), Electrotrémica (EAAS) y generación de hidruros. Como ya se mencionó estas técnicas tienen su fundamento en aplicar cierta energía a un analito, de manera que se puede atomizar y en este momento se hace incidir un haz de luz de cierta longitud de onda, que el átomo absorbe. La energía luminosa incidente y la cantidad de energía absorbida se pueden cuantificar, de manera que la cantidad absorbida será proporcional a la población atómica presente.

Por su aplicación en este trabajo se describe únicamente la ETAAS.

La ETAAS es una técnica que presenta varias ventajas:

- Alta sensibilidad (10^{-8} - 10^{-11} g).

- Posibilidad de utilizar pequeños volúmenes de muestras líquidas (5-100 μ l).
- Posibilidad de analizar muestras sólidas sin pretratamiento en algunos casos, entre otras⁴⁶.

En este sistema se puede obtener mayor sensibilidad debido a que la producción de átomos libres del analito en cuestión por un atomizador de carbón calentado eléctricamente⁴⁷ es más eficiente que un atomizador de flama, ya que, prácticamente toda la muestra inyectada se atomiza.

El atomizador consta de varias partes fundamentales :

- Tubo de grafito
- Contactos eléctricos
- Entradas para el agua de enfriamiento
- Entradas para el gas inerte.

El tubo de grafito es el lugar donde la muestra es calentada, tiene forma cilíndrica, se alinea horizontalmente en el paso óptico del espectrómetro y sirve como contenedor de la muestra. En él se colocan algunos microlitros de muestra en el centro y debido a que se encuentra entre dos contactos de grafito que tienen una conexión eléctrica, se provoca un flujo de corriente a través de las paredes del tubo, calentando la muestra hasta atomizarla.

El horno es un sistema relativamente cerrado, a los extremos del tubo se localizan dos ventanas de cuarzo que permiten el paso del haz de luz, y el único orificio por el cual puede entrar aire es por donde se inyecta la muestra. Para evitar la oxidación del grafito por la elevada temperatura se elimina la presencia de oxígeno, manteniendo un flujo de gas inerte tanto interno como externo. El primer flujo es interrumpido mientras sucede la atomización para evitar perder la muestra. La temperatura alcanzada por el

horno puede ser de alrededor de 2400-2600 °C, la cual se alcanza en pasos específicos.

El análisis consiste en la introducción de un volumen conocido de muestra dentro del tubo de grafito, al cual se le aplica una serie de variaciones de temperatura, que son programadas, hasta que ocurra la atomización del analito⁴⁶. El número de pasos dentro de cada programa varía, aunque se pueden considerar en general seis, como se muestra en la tabla siguiente:

Tabla 4 Pasos y temperaturas comunes en ETAAS

<i>Paso del programa</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Finalidad</i>
Secado	110-125	Evaporar líquidos volátiles
Calcinación	1000-1400	Calcinar materia ajena al analito
Enfriamiento a temp amb.	20-45	Para alcanzar un gradiente amplio de temperatura
Atomización	2100-2500	Alcanzar temperatura para volatilizar, disociar y excitar al analito.
Limpieza	2500-2600	Eliminar residuos
Enfriamiento	20-25	Para comenzar de nuevo

Las principales desventajas que presenta esta técnica son: poca precisión y lentitud. La baja precisión es debida a las interferencias de los efectos de la matriz y a la falta de una buena reproducibilidad en la introducción de la muestra.

El primer problema se soluciona mediante dispositivos tales como el corrector Zeeman o el de señal de fondo, y el segundo con un inyector automatizado⁴⁷.

III DISEÑO DE EXPERIMENTOS.

La mayoría de los diseños experimentales se basan en las hipótesis de los experimentadores sobre qué tipo de sucesos se esperan de un determinado experimento a evaluar. Incluso cuando el experimentador piensa que conoce cómo debe ser el modelo, debe asimismo, tener en cuenta algunas alternativas razonables. Como derivación de esto, se requiere diseñar un experimento de tal manera que se puedan detectar los puntos en los que el modelo o el seguimiento inicial del experimento no sean adecuados.

Existen varios tipos de modelos, aquellos donde el fenómeno a estudiar es bien conocido y es posible escribir una forma funcional a partir de consideraciones teóricas de cómo se espera la respuesta de los experimentos realizados, estos modelos experimentales se conocen con el nombre de teóricos. Por otro lado, existen los experimentos en los cuales el mecanismo que gobierna un proceso no se conoce lo suficiente y sólo se tiene una noción de los factores que influirán en el proceso de estudio, en estos casos un modelo empírico es el que se utiliza.^{49 50 51}

En la mayoría de los experimentos o procesos a evaluar lo que se desea es obtener lo más posible de información en un menor tiempo y con menor costo, por lo que es necesario el establecer el tamaño de muestra o la cantidad y tipo de datos que consideraremos como respuesta para solucionar o dar una conclusión bien fundamentada del estudio realizado. Cabe señalar, que esto se verá afectado por el tipo de análisis matemático que se elija en la última etapa de la evaluación de los datos.⁴⁹

El obtener una muestra representativa es fundamental en teoría estadística, por tal motivo, se diseñan experimentos donde lo que se pretende responder

es; ¿Qué tipos de datos deben recogerse?, ¿Cómo deben ser compilados?, ¿De qué tamaño debe ser la muestra? etc.

Los datos numéricos como tales en muchas ocasiones no nos presentan mayor información si no conocemos las características o el proceso que se está evaluando, de tal forma que, con solo conocer los datos no es posible interpretar su significado, por lo que tenemos que utilizar métodos descriptivos para darles mayor sentido o inferenciales para sacar conclusiones válidas sobre ellos.^{50,51}

3.1 Errores sistemáticos

A diferencia de los errores aleatorios los errores sistemáticos no se pueden apreciar con la simple repetición de las mediciones, y a menos que se conozcan de antemano los resultados verdaderos, se pueden presentar errores sistemáticos muy grandes con un valor muy alejado de la realidad sin que se tenga en cuenta dicho error, es decir, se puede estar trabajando con resultados erróneos y concluir basándose en ellos, pasándose por alto la posible incongruencia real de los resultados obtenidos.

La determinación de algunos metales traza en muestras biológicas por espectrometría de absorción atómica es, en principio, relativamente directa, y no hay duda de que los resultados alcanzados por los diversos investigadores son satisfactorios en términos de precisión, aunque en varios casos se pasó por alto el gran error sistemático introducido por la contaminación. Los errores de este tipo se pueden deber al mal lavado del material, la contaminación de reactivos que se suponen puros, y el erróneo funcionamiento de los equipos de medición, entre otros.

Los monocromadores de muchos equipos utilizados en el área química se desajustan paulatinamente de manera que son frecuentes las desviaciones en unos cuantos nanómetros en las mediciones realizadas en un periodo de

tiempo relativamente largo, lo que puede provocar que a medida que pasa el tiempo los resultados presentan una tendencia a tener un valor diferente del inicial o del valor real. Se sabe que los errores sistemáticos no solo se presentan con aparatos o instrumentación analítica, sino también, de sesgos humanos.⁴⁹

Para evitar en lo más posible la presencia de errores sistemáticos es necesario considerar perfectamente todos los pasos y aspectos que involucrarán un experimento antes de comenzar a realizarlo, el analista debe tomar en cuenta cada etapa; muestreo, tratamiento, y conservación de la muestra, procedimiento de análisis, etc., buscando las posibles fuentes de error sistemático y los pasos críticos.^{50 52}

3.2 Diseño de experimentos

Existe un proceso que es de gran utilidad en la puesta a punto de un método analítico, y el cual favorece la optimización del método, este proceso se denomina **diseño de experimentos**.⁴⁹

El diseño de experimentos es una operación de gran utilidad ya que nos permite hacer planes para evitar en lo más posible los errores que se pudieran dar en el transcurso de nuestra experimentación y además valorar los posibles errores que se cometan.

El problema básico en el diseño de experimentos es decidir qué secuencia de factores característicos revelará mejor los aspectos más importantes del problema, y estos factores (variables) serán los que se manejen para lograr una respuesta óptima del experimento.⁵²

En la fase de identificación del modelo experimental resulta de gran ayuda la visualización de las principales características del sistema, para decidir cuales

factores se deben considerar como importantes, lo cual se logra con una ordenación factorial .

No obstante se tiene que el experimentador está más capacitado para describir el comportamiento de los diferentes factores, así como, su importancia dentro del experimento a medida que este último transcurre. Por ello, es importante realizar una secuencia de experimentos de tamaño moderado y evaluar los resultados a medida que estos están disponibles. Así, mientras una investigación se está llevando a cabo, puede suceder que

- 1.- Se decida cambiar la región del experimento en la extensión de las variables por una región donde se obtenga una mejor respuesta.
- 2.- Se desestimen algunas variables iniciales y se agreguen otras que tengan mayor significancia en el experimento.
- 3.- Se acumulen evidencias para que se transformen algunas variables (diferentes unidades, magnitudes, etc.)
- 4.- Se modifique el objeto de la investigación .

En la mayoría de las situaciones es poco útil el planear un experimento de manera exhaustiva al inicio, ya que en lugar de aportar soluciones se produciría un experimento muy largo y costoso.

Como se mencionó con anterioridad se considera para el diseño experimental una ordenación factorial en donde el investigador selecciona un número fijo de niveles para cada uno de los conjuntos de variables y luego se realizan experimentos con cada una de las combinaciones posibles.

Con experimentos del tipo factorial, el comportamiento de cada variable a distintos niveles de otras variables puede ser inmediatamente observado, facilitando enormemente la elección de un modelo experimental. Por el

contrario, con un experimento eligiendo la variación de los factores al azar, con el mismo número de puntos, es muy difícil el observar este tipo de comportamientos de nuestras variables. ⁴⁹

Cuando se realiza un experimento con dos factores y uno de ellos se mantiene constante para determinar el valor óptimo del otro, después se mantiene fijo el factor optimizado para determinar el valor óptimo del segundo factor se pueden tener varios aspectos que no se consideran, como son:

i Pueden existir otros y más importantes factores que afecten nuestro experimento.

ii El valor encontrado puede no ser el valor óptimo real si los factores interaccionan entre sí.

iii La optimización univariable de un experimento puede originar un número de ensayos muy grande para describir el modelo que sigue el experimento en cuestión

De tal modo, este trabajo se realiza utilizando un diseño factorial en la etapa de digestión abierta, y un diseño univariable en la selección de las mejores condiciones de disolución de las muestras por microondas, condiciones de lectura por ICP-AES y por ETAAS, así como en la elección inicial de los reactivos utilizados como oxidantes en los inicios del experimento.

En un diseño factorial se selecciona un número fijo de niveles (valores o respuestas) para un conjunto de variables y luego se hacen experimentos con todas las combinaciones posibles, de tal forma que si existen 2 niveles con tres variables se producirán $2 \times 2 \times 2 = 2^3 = 8$ experimentos elementales donde 2 son los niveles y 3 son las variables o factores.

Considerando ahora que los niveles de los experimentos tienen un valor máximo (+) y un valor mínimo (-) se puede originar una matriz de diseño⁵² siendo para este ejemplo la expuesta en la tabla 5.

Tabla 5 Datos de un diseño factorial 11.

Matriz de diseño

Experimento	Factor A	Factor B	Factor C	Resultado
1	-	-	-	y1
2	+	-	-	y2
3	-	+	-	y3
4	+	+	-	y4
5	-	-	+	y5
6	+	-	+	y6
7	-	+	+	y7
8	+	+	+	y8

Tabla tomada de Evaluation and Optimization of laboratory Methods and Analytical Procedures¹² tabla 12.1

3.3 Algoritmo de Yates

Con este diseño se requiere relativamente de pocos experimentos para conocer la influencia de cada factor y mostrar tendencias de los resultados a medida que los factores varían sus valores numéricos.

También se pueden construir bloques de diseños más complejos a medida que el experimento se vuelve más sofisticado. Por otra parte, se pueden interpretar las observaciones aplicando aritmética elemental o bien utilizando el sentido común.

Se deben calcular los efectos de cada factor, es decir, el efecto de un factor se entiende como el cambio en la respuesta al ir de un nivel – al + de ese factor y nos permite conocer qué factor tiene mayor influencia en la respuesta.

Se observa que hay 4 experimentos donde el valor de cada factor es el máximo, y cuatro donde el valor de ese factor es el mínimo, de tal forma que al realizar un serie de restas y sumas de los valores máximos y mínimos se obtiene el valor final para cada factor en cuestión. Existe una forma más rápida y eficaz para calcular el efecto de cada factor y es por medio de un algoritmo denominado **algoritmo de Yates**, donde los valores de los experimentos se ordenan como se muestra en la tabla 5 (que en algunos libros se llama orden

estándar) y se consideran las medidas como pares sucesivos, agregando una columna más por cada factor, siendo en este caso las columnas 1,2 y 3 y la última que sería el efecto calculado.

Los primeros cuatro números de la columna 1 se obtienen sumando los cuatro pares así $y_1+y_2=a_1$, $y_3+y_4=a_2$, etc. y los segundos cuatro números se obtienen restando el número de abajo del de arriba de cada pareja restante. Así $y_6-y_5=a_7$, $y_8-y_7= a_8$. Tal como se calculó la columna 1 a partir de los resultados, se calcula la columna 2 a partir de la columna 1 (denominados como b_1,b_2 ,etc.) y a su vez la columna tres se calcula a partir de la 2, por ultimo, obtenida la columna 3 (valores de c_1, c_2 , etc) se estima el efecto por la fórmula:

$$Efecto = \frac{Col\ 3}{2^{n-1}k}$$

Donde k = es el número de replicas, y n = el número de factores

Con la cual se sabe el efecto de cada factor sobre el experimento y además se puede observar si es positivo o negativo. Se muestra un ejemplo en la tabla 5b.

Tabla 5b Ejemplo de un experimento diseñado por el método de yates

Fuente de variación	Resultado	Columna 1	Columna 2	Columna 3	Efectos
-	Valor y_1	$y_1+y_2= a_1$	$a_1+a_2=b_1$	$b_1+b_2=c_1$	$Col3/2^{n-1}k$
A	Valor y_2	$y_3+y_4= a_2$	$a_3+a_4=b_2$	$b_3+b_4=c_2$	
B	Valor y_3	$y_5+y_6= a_3$	$a_5+a_6=b_3$	$b_5+b_6=c_3$	
AB	Valor y_4	$y_7+y_8= a_4$	$a_7+a_8=b_4$	$b_7+b_8=c_4$	
C	Valor y_5	$y_2-y_1= a_5$	$a_2-a_1=b_5$	$b_2-b_1=c_5$	
AC	Valor y_6	$y_4-y_3= a_6$	$a_4-a_3=b_6$	$b_4-b_3=c_6$	
BC	Valor y_7	$y_6-y_5= a_7$	$a_6-a_5=b_7$	$b_6-b_5=c_7$	
ABC	Valor y_8	$y_8-y_7= a_8$	$a_8-a_7=b_8$	$b_8-b_7=c_8$	

Para conocer si la diferencia entre los valores de cada factor es estadísticamente significativa se puede aplicar una análisis de varianza. El análisis de varianza de este experimento podría ser :

Tabla 6 Ejemplo de un análisis de varianza para un experimento diseñado por el método de yates

Fuente de variación	Efectos	Suma de cuadrados SC	Grados de libertad GL	Suma de Cuadrados Medios SCM	Valor de F
A	ValorA	$(Col3)^2/2^n k$	n-1	SC/GL	SCM_F/SCM_E
B	ValorB				
AB	ValorAB				
C	ValorC				
AC	ValorAC				
BC	ValorBC				
ABC	ValorABC				
Error		$SC_T - SC_{C/F}$			

Donde se tiene que SC_T = Suma de Cuadrados totales ($\sum (x_i - X)^2$), $SC_{C/F}$ = Suma de Cuadrados de cada

factor, GL = Grados de Libertad, SCM = Suma de Cuadrados Medios, SCM_F = Suma de Cuadrados Medios de cada factor, SCM_E = Suma de Cuadrados Medios del Error, SC_E = Suma de Cuadrados del Error.

En la actualidad existen programas de cómputo que ayudan en este tipo de modelaje experimental, además, nos brindan la posibilidad de observar un gráfico de correlación de factores que se obtiene en menos tiempo y sobre todo efectúa todas las operaciones antes descritas evitando algunos errores fortuitos que se originan comúnmente al manejar muchos datos.

El programa de cómputo más conocido en el diseño de experimentos es el Statgraphics, ya que es muy accesible y fácil de utilizar, además, maneja un diseño experimental muy similar al método de Yates.

Este trabajo se inicia con un diseño experimental común, es decir, se mantienen todos los factores fijos y se mueve solo uno, lo cual se hace para identificar las variables que pudiesen formar parte de un posterior diseño experimental del tipo factorial, para por último optimizar el método y así obtener mejores resultados.

IV . METODOLOGÍA .

En la figura 4 se muestra un esquema general de la metodología seguida para la determinación de Fe, Cu y Zn en tejidos biológicos.

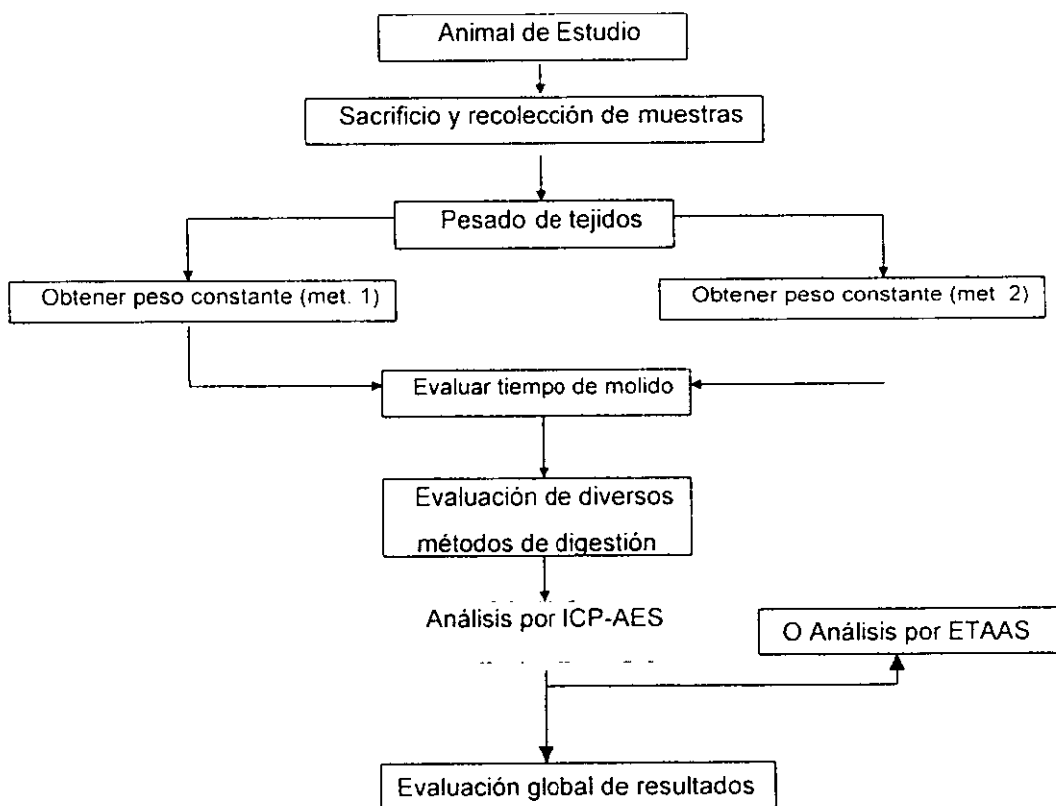


Figura 4 Metodología

Metodología aplicada al análisis de tejidos de ratas Wistar macho

El trabajo se inicia desde la obtención y manejo de los animales de estudio, para su posterior sacrificio. Una vez seccionadas las partes se someten al proceso de secado, donde se prueban dos técnicas con diferentes temperaturas.

Cuando los tejidos están secos se muelen determinando el tiempo adecuado y se conservan en un desecador.

Para la evaluación de las técnicas de digestión, una vez que se tienen los tejidos perfectamente secos y homogenizados, esto para asegurar que todos los procesos se realicen en condiciones similares, se hace un análisis preliminar para establecer cuales son las variables que influyen y que se pueden considerar para un diseño del tipo factorial.

En este primer ensayo se evalúan factores tales como: el volumen y tipo de oxidantes, utilizando tejidos certificados de bovino y de cerdo.

Las muestras de tejido certificado se encuentran liofilizadas, por ello lo primero que se debe de hacer es, determinar la cantidad de humedad que contienen y poner el tejido a peso constante. Una vez a peso constante se pesa el material y se coloca en el recipiente donde se realizará la digestión (en el caso del microondas se utilizan viales de Teflon de 30ml de capacidad).

La digestión abierta se realiza en una parrilla eléctrica con agitador, utilizando vasos de precipitado de 10-20ml, dentro de los cuales se colocan las muestras, (se marca el nivel del ácido el cual se deberá de mantener constante), y se tapan con un vidrio de reloj de tamaño adecuado hasta la finalización del tiempo del proceso.

La digestión por microondas se realiza colocando las muestras, previamente pesadas, en los viales de Teflon, los cuales se introducen en su camisa para luego colocarles su tapa hermética, seguido de esto se colocan los 6 viales en el carrusel de muestras y se aprietan hasta el tope indicado por la llave correspondiente. Una vez listo el carrusel se coloca dentro del horno de microondas y se inicia el ciclo de digestión hasta la finalización del mismo. Las muestras que se obtienen al final de ambos procesos se llevan a 10ml y se analizan en los equipos (ICP-AES y ETAAS).

De los resultados obtenidos por digestión abierta y por digestión de microondas tras este primer ensayo, así como también en base a la literatura, se eligen los oxidantes que se estudiarán más a fondo posteriormente.

En el siguiente diseño experimental se estudian el volumen y el tiempo, por medio de un diseño factorial del tipo 2^2 utilizando los tres tejidos certificados, tomando como valores mínimo y máximo de cada factor de 15min a 35min, y de 2ml a 4ml, para el tiempo y el volumen respectivamente.

Es importante recordar que el análisis de resultados de este nuevo experimento se combina con los resultados estadísticos obtenidos con el programa de cómputo Statgraphics. Resulta importante decir que primero se debe de realizar el experimento y obtener los datos experimentales para luego ocupar el programa de cómputo ya que este programa no es útil con datos no reales.

Finalmente se realiza la optimización del método analítico utilizando un diseño experimental tradicional (de una sola variable).

Dado que las técnicas analíticas seleccionadas fueron ETAAS e ICP-AES, se estudian en ambos casos longitudes de onda, interferencias espectrales, y efectos de matriz, adicionalmente flujo y radio frecuencia en el caso del ICP-AES, y adición de modificador de matriz en el caso del Horno de Grafito. El interés fundamental es disponer de una técnica analítica con las características de sensibilidad, precisión y exactitud requeridas para la determinación de cada uno de los metales en los diferentes tejidos biológicos.

Después de la optimización de todos parámetros que intervienen en la determinación, se realiza otro experimento para verificar las condiciones óptimas y se compara el resultado con el reportado para el material certificado.

V . DESARROLLO

Parte Experimental.

5.1- Equipo utilizado

- **Espectrómetro secuencial** modelo JY 12 marca Jobin - Yvon equipado con:
 - Monocromador de alta resolución modelo Rapid HR 640.
 - Rejilla de difracción holográfica.
 - Generador de plasma de alta frecuencia (40.68 Mhz)
 - Bomba peristáltica modelo PERIMAX 12 marca ISA (PETEC).
 - Unidad de disco marca IBM modelo 4 SX.
 - Monitor Addonics C144 SVGA.
- **Espectrómetro de absorción atómica** Perkin Elmer modelo 3100 controlado por computadora y equipado con:
 - Horno de Grafito HGA-600.
 - Auto muestreador modelo AS-60 que permite tomar como mínimo 1 μ L.
 - Lámparas de cátodo hueco (HCL)
 - Recirculador de agua Perkin Elmer
- Tubos de grafito pirorrecubiertos Perkin Elmer N° BO13-7113
- Horno de digestión por microondas programable de alta presión Milestone 1200MEGA.

- Molino Spex 8000 Mixer/mill 120v / C.A., Motor A.O Smith A.C.(Motor H.P 1/3 types R.P.M. 1725/1425 A= 5.5/2.7).
- Estufa Heraeus W.C.Heraeus G.M.B.H, H.A.N.A.U Temperatura máxima 110°C 2A 125V.
- Balanza analítica OHAUS RS25 (Analytical Plus).
- Desecador

5.2 - Reactivos y Soluciones.

Todos los reactivos utilizados son grado R.A., con excepción del HNO₃ conc. que es de ultra alta pureza o redistilado con certificado de análisis (Aldrich).

Se utiliza agua desionizada por columnas de intercambio iónico, o tipo NANOPURE.

Se preparan estándares multielementales de Fe, Cu y Zn de 0.025, 0.05, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, y 50.0 ppm a partir de soluciones patrón de 1000 ppm Fisher. y/o Merck.

5.3- Material .

Para la disección de los animales se utilizó una tabla de corcho. Los utensilios quirúrgicos fueron de acero inoxidable perfectamente libres de residuos.

Para la preparación de soluciones se utilizan materiales de vidrio (libres de metales) volumétricos, los cuales fueron lavados como lo indica la norma ASTM para lavado de material que debe ser libre de minerales.

5.4. Estándares de referencia .

Se utilizaron los estándares de referencia (tejidos liofilizados de animales) de la BCR, CRM N°184(Músculo de bovino) CRM N°185 (Hígado de bovino) y CRM N°186 (Riñón de cerdo), con certificado de contenido en unidades de masa de Cd, Pb, As, Hg, Se, Cu, Zn, Fe y Mn.

5.5. Programa de cómputo utilizado.

Se utiliza el Statgraphics plus para Windows versión dos 694-696. Para diseñar experimentos de tipo factorial.

CAPITULO VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

6.1 Disección :

En éste estudio se utilizan ratas Wistar Macho con un peso promedio de 250-300g (5-7 semanas de edad), las cuales provienen del biotério de la Facultad de Química, y se mantienen en condiciones similares de alimentación, periodos de luz, y de higiene.

Se practicaron las disecciones de todos los tejidos usando material de acero inoxidable previamente lavado con detergente tratando de estandarizar el tiempo y el material requerido para cada rata.

6.2 Condiciones de secado:

Después de obtener todas las muestras se procedió a secar el material biológico hasta peso constante, para ello se utilizaron estufas programables. La evaluación del proceso se realiza mediante el empleo de dos técnicas para obtener peso constante (Figura 5), una de las cuales consiste en recolectar la muestra después de disección, pesarla en un recipiente perfectamente seco y libre de metales, para después ser introducida en una estufa automática con una temperatura de 50 ± 2 °C y se verifica el peso cada 2 horas durante las primeras 8 h, posteriormente a las 12, 24, 36, 48 y 76h hasta peso constante (curva 1). La otra técnica (curva 2) consiste en recolectar la muestra después de disección, pesarla en un recipiente perfectamente seco y libre de metales, colocarla en una estufa a 100 ± 5 °C verificando el peso en el mismo intervalo anterior.

Tabla 6ª pesos reales de tejidos de rata y su % de pérdida al ponerlos a peso constante.

Tejido de rata	Peso en gramos Húmedo	Peso en gramos Seco	% de pérdida
Cerebro	6,017	0,388	93,5516
Higado	15,2707	4,7322	69,011
Riñón	2,61	0,5508	78,914
Músculo	5,9862	1,42837	76,139
pulmón	2,2717	0,4919	78,346

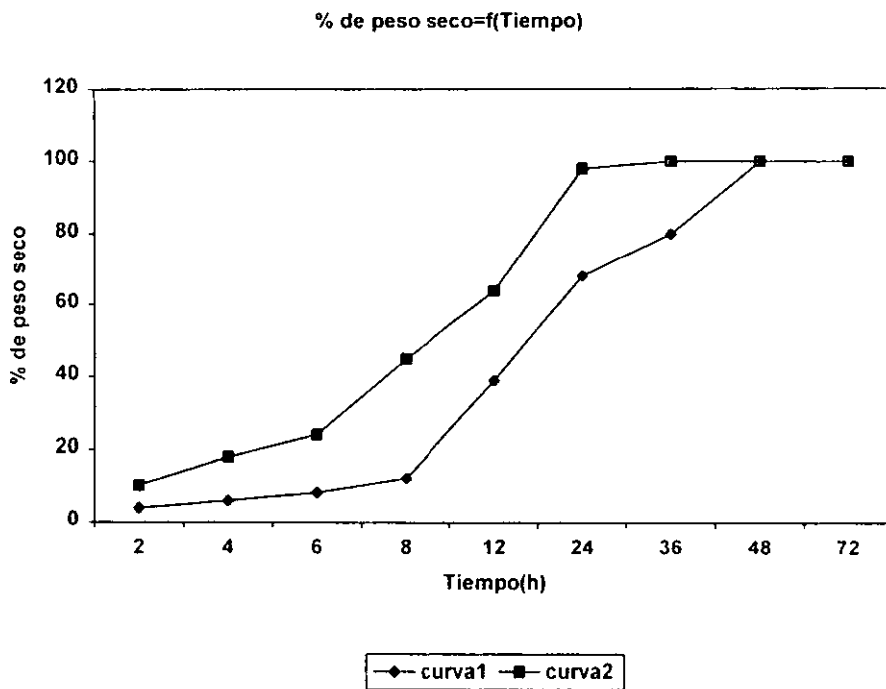


Figura5 Proceso de secado de las muestras peso constante

En esta figura se observa que el tiempo necesario para obtener un secado total del tejido es menor en la curva 2 , y además, se puede considerar que el tejido está seco a partir de las 24 h después de iniciado el proceso, mientras que en la curva 1 se requiere de aproximadamente 48 h para el mismo proceso.

En la figura 6 se muestran los resultados obtenidos para otros tejidos mediante el procedimiento que se describe para la curva 2 de la figura 5, en donde se puede constatar que para tejidos de menor tamaño y peso que el del hígado, el tiempo para obtener un secado total se reduce en pequeña cantidad, pero en general se puede obtener el tejido a peso constante después de 24h.

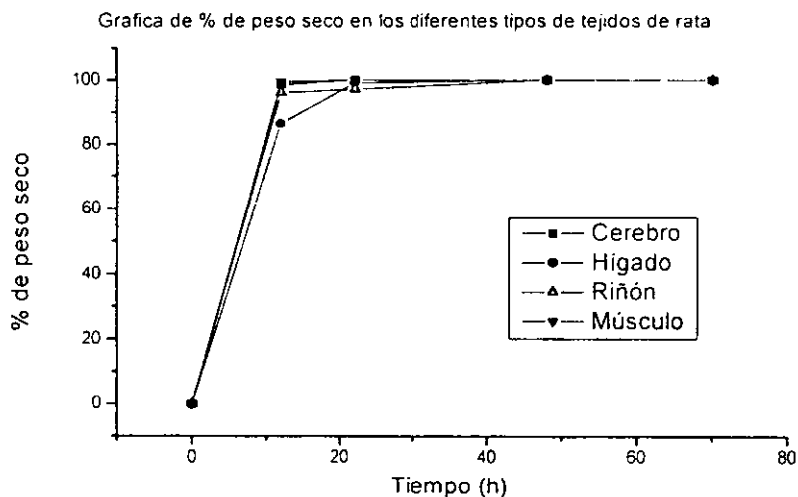


Figura6 Porciento en peso seco con respecto al tiempo en los diferentes tipos de tejidos

Cabe señalar que el % de peso seco se determinó en base al valor de peso constante de los tejidos y tomando en cuenta el valor inicial de peso húmedo, es decir se realiza la siguiente operación;

$$\% \text{ peso} = 100 - \frac{(\text{pesox} - \text{pesof}) \times 100}{(\text{pesoi} - \text{pesof})}$$

Donde *pesox* = peso del tejido al tiempo *x*, *pesof* es el peso del tejido a peso constante, *pesoi* = peso inicial del tejido húmedo.

6.3 Condiciones de molido:

El tiempo óptimo de molido se estableció tras la evaluación de ensayos de diferentes tiempos (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7min, utilizando un molino Spex Mixer y un vial de carburo de tungsteno), los resultados obtenidos se presentan en la Figura 7. El porciento de molido se determina pesando el tejido al inicio del

proceso, después de terminado el tiempo que se esta evaluando se pasa la muestra por un tamiz y se determina lo que no se molio refiriéndose al peso inicial para sacar el % de molido.

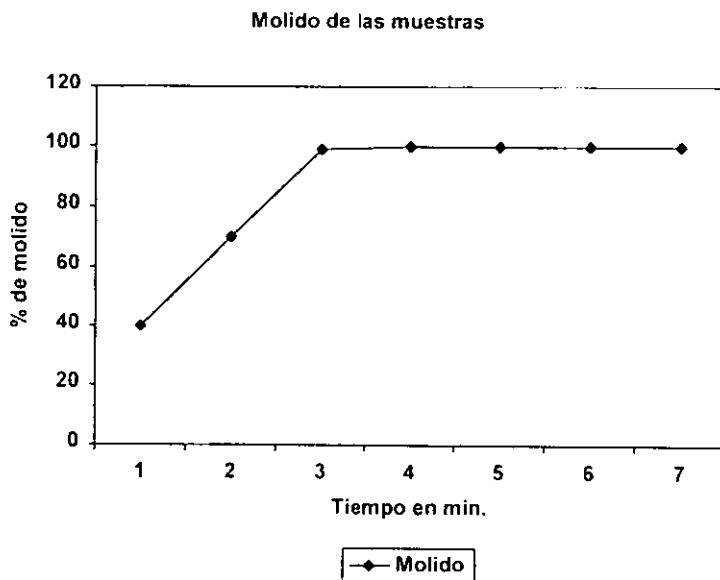


Figura 7 Proceso de molido

6.4 Proceso de digestión:

Dependiendo del contenido del metal en las diferentes muestras es necesario considerar en la optimización del proceso de digestión diferentes tamaños de muestras, así mismo, la cantidad de muestra requerida depende de la técnica analítica seleccionada. Cabe señalar que se considera el número de réplicas requeridas para la evaluación estadística del método.

Se utilizan estándares certificados de hígado de bovino(BCR185), músculo de bovino(BCR184) y riñón de cerdo(BCR186).

Los valores de concentración certificados para Zn, Fe y Cu se dan en la tabla(7).

Tabla 7 Valores certificados de los estándares de referencia

Muestra	Conc.ppm Zn	Conc.ppm Fe	Conc.ppm Cu
Hígado	141.55+/-2.805	213.98+/-5.299	189.2+/-3.7
Músculo	166.286+/-3.363	78.87+/-1.9627	2.35+/-0.06
Riñón	128.19+/-3.085	298.66+/-9.768	31.9+/-0.35

Los procesos usados son de dos tipos; a) microondas y b) de digestión parcial en sistema abierto. Al inicio del experimento se utiliza en primera instancia un tejido considerado como el más representativo (**hígado certificado**), y se sigue un diseño de una sola variable a la vez. En este primer ensayo por ambas técnicas se evalúa el volumen y la naturaleza del oxidante a utilizar ($\text{HNO}_3, \text{H}_2\text{O}_2, \text{HClO}_4$). Los resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8 Comparación de procesos de digestión y tipo de oxidantes

Proceso de digestión	Relación de reactivos utilizados ($\text{HNO}_3, \text{H}_2\text{O}_2, \text{HClO}_4$)	Conc. ppm Zn	Conc. ppm Fe	Conc. ppm Cu	Tejido estudiado
Húmeda	3 2 1	70.2	180.4	160.5	Hígado
Húmeda	4 2 0	150.4	208.6	180.8	Hígado
Húmeda	6 0 0	145.1	203.4	120.2	Hígado
Húmeda	3 2 1	60.7	203.9	210.7	Hígado
Microondas	3 3 0	106.7	171.9	161.4	Hígado
Microondas	5 0 1	86.2	137.4	137.6	Hígado
Microondas	5 1 0	103.2	159.7	145.5	Hígado

Se realizaron las determinaciones por triplicado en cada caso y se reporta en microgramos de elemento por gramo de tejido peso seco, los valores se determinan por calibración directa

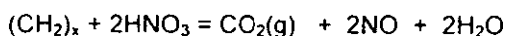
El tiempo que se utiliza para la digestión abierta es de 20 minutos, que es el tiempo que se encontró reportado más frecuentemente en la literatura, en el caso de la digestión por microondas se utilizó el método recomendado por el fabricante y el cual ya establece un tiempo estándar de 20 minutos.

En base a los resultados obtenidos en la tabla anterior se puede apreciar que los valores que se aproximan más a los valores certificados en digestión húmeda son aquellos en donde principalmente se añadieron como oxidantes H_2O_2 y HNO_3 en diferentes proporciones. Cuando se agrega únicamente HNO_3 el valor obtenido es similar pero un poco más bajo.

El uso del peróxido de hidrógeno como agente oxidante es ampliamente conocido, ya que se adiciona al ácido nítrico concentrado para reducir los vapores nitrosos y, al mismo tiempo, acelerar la digestión de muestras orgánicas al aumentar la temperatura.

Por otro lado, al agregar ácido perclórico los resultados son todavía más bajos que los obtenidos con ácido nítrico solo. Esto tal vez puede explicarse tomando en cuenta que el ácido nítrico tiene su punto de ebullición cercano a 120°C aproximadamente a una concentración del 65% (concentrado), y que el del ácido perclórico es de 203°C al 72%(concentrado), por tal motivo, se considera que es más factible alcanzar la temperatura de ebullición del ácido nítrico que la del ácido perclórico, lo cual se traduce en una probable digestión incompleta (valores más bajos que los de referencia). La temperatura a la cual se encontraba la solución de digestión fluctuaba entre los 98-110°C en este sistema abierto. No obstante este caso en particular se ha estudiado en pocas ocasiones y podría servir de tema para un próximo estudio.

Por otro lado, el Dr. H.M. Kingston en su conferencia de "El uso de la tecnología de microondas en el laboratorio en el siglo XXI" en Octubre de 1998, afirma que la descomposición de matrices orgánicas por ácido nítrico, cuya reacción general es :



es dependiente directamente de la temperatura, y la presión. Con base en esta información y a los datos presentados se puede decir que en ciertas condiciones de temperatura se presenta una digestión más completa con la utilización de ácido nítrico, o mezcla ácido nítrico - peróxido, que con alguna otra utilizando ácido perclórico.

Se ha reportado así mismo que la presencia de HClO₄ eleva momentáneamente la temperatura en la mezcla pero que ésta rápidamente decae.

De manera semejante se aprecia una tendencia de mejores resultados sin la utilización del ácido perclórico en el procedimiento de digestión de microondas. Esto se apoya, además, en que si se quisiera mejorar la recuperación de los metales presentes en la muestra con este ácido se tendría, por un lado, que aumentar el volumen del mismo, o bien, la temperatura del sistema, en donde en cualquiera de los dos casos la consecuencia es un aumento en la presión del mismo, lo cual debe de realizarse con extremo cuidado para evitar accidentes (explosiones). Esto se podría hacer si el equipo dispone de sensores de presión y temperatura .

En los ensayos con el horno de microondas, se realizaron también estudios del efecto memoria presentado por los recipientes de Teflon, para lo cual se adicionó HNO₃ redistilado en cada uno de los recipientes donde se había realizado la digestión. Los resultados se muestran en la tabla 9.

Tabla 9 Resultados del efecto memoria presentado por los viales de Teflon.

Proceso de digestión	Relación de reactivos utilizados (HNO ₃ , H ₂ O ₂ , HClO ₄)			Conc. Ppm Zn	Conc. ppm Fe	Conc. ppm Cu	Tejido
Microondas	3	3	0	0.018	0.066	0.163	Higado
Microondas	5	0	1	0.025	0.064	0.153	Higado
Microondas	5	1	0	0.041	0.024	0.143	Higado

Se realizaron las determinaciones por triplicado en cada caso y se reporta en microgramos de elemento por gramo de tejido peso seco, los valores se determinan por calibración directa

Se puede apreciar en la tabla 9 que si existe un efecto memoria, de aproximadamente 0.02% para Zinc, 0.03% para el Fe y un 0.12% para el Cu, este efecto es relativamente pequeño para los dos primeros metales. En el caso del cobre se observa un efecto memoria más grande.

Esto muestra que a pesar de que los metales se encuentran en niveles de concentración similares el comportamiento es diferente para cada caso.

6.4.1 diseño de experimentos

En posteriores ensayos se evaluaron los parámetros más significativos, con la utilización del **diseño de experimentos**, considerando cada parámetro con un valor máximo y un valor mínimo para poder observar el efecto de dicho parámetro.

Para el proceso de digestión parcial en sistema abierto se estudia el volumen de oxidante (HNO_3), y el tiempo de digestión, siguiendo un diseño factorial 2^2 (se realizan 4 experimentos para cada uno de los tejidos $2^2=4$), usando en este caso estándares de referencia certificados.

Cabe señalar que a pesar de que los valores obtenidos tras la digestión con ácido nítrico sólo, son similares a los obtenidos con la utilización de la mezcla nítrico - peróxido, se decidió no evaluar la presencia de peróxido ya que en el transcurso de la digestión se presenta una espuma que asciende por los recipientes hasta que se tira fuera de él, y en el primer ensayo se perdieron 6 muestras antes de lograr obtener una muestra útil, y para evitar que se desborde la espuma se tiene que quitar de la fuente de calor para que disminuya la espuma y esto altera el tiempo real del proceso, además los resultados son similares.

Se realiza un experimento como el descrito en seguida:

Factor	Valor mínimo	Valor máximo	Letra asignada
Vol. de HNO_3	2ml	4ml	A
Tiempo	15min.	35min.	B

$$2^2=4 \text{ experimentos}$$

Se diseña el experimento para **digestión abierta con tejidos de referencia** (tabla 10).

Tabla 10 Diseño factorial de digestión abierta.

Experimento	Factor A	Factor B
1	-	-
2	+	-
3	-	+
4	+	+

Cada experimento se hace por triplicado

Los resultados se muestran en la Tabla 11 (para Hígado), Tabla 12 (para Riñón), y Tabla 13 (para Músculo), en donde se describe el número del experimento, el tejido, la concentración del metal y su coeficiente de variación (CV).

Tabla 11 Resultados de diseño factorial por digestión abierta

Número	Tejido	Conc.Zn	CV	Conc.Fe	CV	Conc.Cu	CV
1	Hígado	151.85	1.1	210.77	0.7	187.86	1.7
2	Hígado	136.32	0.3	199.79	0.4	170.31	1.3
3	Hígado	135.86	1.3	190.38	2.7	176.18	2.1
4	Hígado	144.60	4.2	255.49	2.2	212.76	1.6

Se realizan determinaciones por triplicado en cada caso y se reporta en microgramos por gramo de tejido peso seco, los valores se determinan por calibración directa., con un peso de 0.4-0.5g.

Tabla 12 Resultados de diseño factorial por digestión abierta

Número	Tejido	Conc.Zn	CV	Conc.Fe	CV	Conc.Cu	CV
1	Riñón	145.503	1.1	270.964	0.7	26.839	2.2
2	Riñón	125.883	6.3	260.124	2.0	29.442	0.9
3	Riñón	142.412	1.5	265.487	1.6	26.974	6.3
4	Riñón	108.236	2.1	261.963	2.1	25.697	0.9

Se realizan determinaciones por triplicado en cada caso y se reporta en microgramos por gramo de tejido peso seco, los valores se determinan por calibración directa., con un peso de 0.4-0.5g.

Tabla 13 Resultados de diseño factorial por digestión abierta

Número	Tejido	Conc.Zn	CV	Conc.Fe	CV	Conc.Cu
1	Músculo	116.419	7.1	61.877	0.6	ND
2	Músculo	143.559	0.6	90.069	1.8	ND
3	Músculo	167.668	1.2	81.510	1.8	ND
4	Músculo	138.408	1.1	68.820	0.6	ND

Se realizan determinaciones por triplicado en cada caso y se reporta en microgramos por gramo de tejido peso seco, los valores se determinan por calibración directa., con un peso de 0.4-0.5g.

Las letras ND indican que no se detectó el nivel de concentración por estar debajo del límite de detección del ICP. Por otro lado, las siglas CV expresan el coeficiente de variación o la desviación estándar relativa (RSD) para un número de muestras dadas del mismo experimento.

De acuerdo a los datos anteriores podemos observar que efectivamente los factores considerados (volumen del oxidante y tiempo) son aquellos que influyen en el desarrollo del proceso de digestión, aunque los valores de las determinaciones no varían demasiado por ser valores de muestras en teoría idénticas, puede observarse que presentan cambios numéricos hasta de 30 unidades en algunos casos y que el comportamiento para cada elemento en los diferentes tejidos no presenta la misma tendencia.

En el siguiente apartado se muestran las figuras y datos obtenidos con el programa Statgraphics donde se observa el comportamiento de cada uno de los factores y su correlación de manera más evidente.

6.4.1.1 Datos y Figuras obtenidos con el programa de computo Statgraphics

A) Figuras correspondientes al comportamiento de la cantidad de Fe en Higado certificado con respecto a los diferentes valores de los variables.

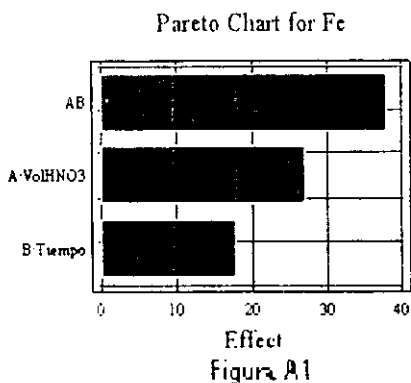


Figura A1

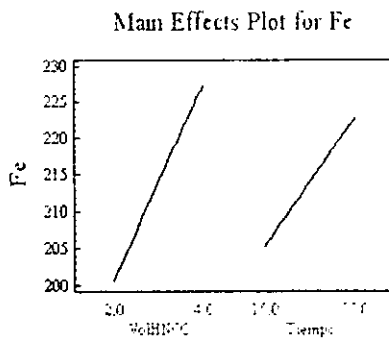


Figura A2

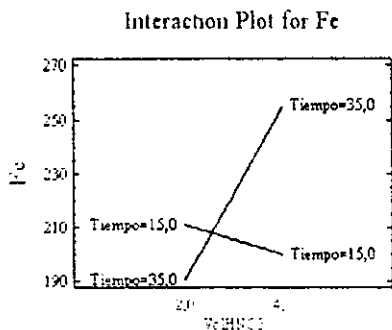


Figura A3

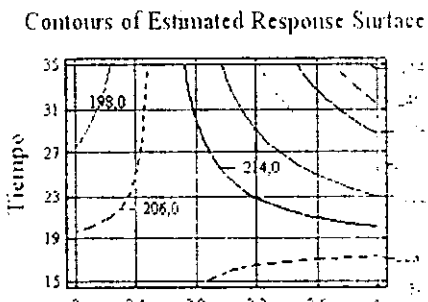


Figura A4

Analysis Summary

File name: C:\miostesis\CosastaC\Higado certificado.sfx
 Comment: Valores de Higado certificado

Estimated effects for Fe

average	=	214.107
A: VolHNO3	=	27.065
B: Tiempo	=	17.655
AB	=	38.045

De la Figura A1 y los datos numéricos obtenidos para cada factor (que se muestran debajo de las figuras) se observa que la interacción entre el tiempo y el volumen, para este elemento, es mayor que el efecto presentado por las variables aisladas, lo que significa que existe una relación de sinergia entre el tiempo y el volumen.

Esto se explica ya que si aumenta el tiempo de exposición del tejido a la cantidad del oxidante puede aumentar su efecto de éste.

Al analizar la Figura A2 se puede confirmar lo antes dicho, se obtiene mayor recuperación de Fe al aumentar el volumen de ácido.

De la figura de área estimada de respuesta (Figura A4) se aprecia que los valores para el tiempo y el volumen, en teoría óptimos para obtener la cantidad de metal reportado, se encuentran sobre una hipérbola que pasa alrededor de 20-35 minutos y de 2.5 - 4.0 ml. Esto se comprobó cuando al realizar el experimento sobre un punto que se encuentra sobre la línea (3.2 mililitros de ácido y 23 minutos), se obtiene un valor de 214.108 ppm, que es cercano al esperado (Tabla 18), por lo que se puede decir, que el programa describe con cierta fiabilidad las condiciones y el comportamiento del experimento.

A1) Figuras correspondientes al comportamiento de la cantidad de Cu en Higado certificado con respecto a los diferentes valores de las variables.

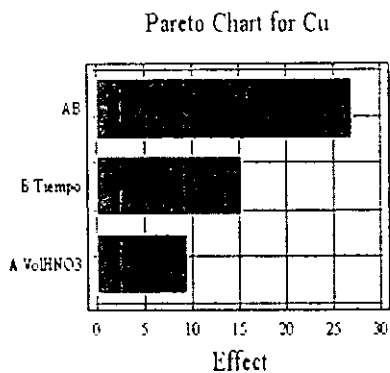


Figura A5

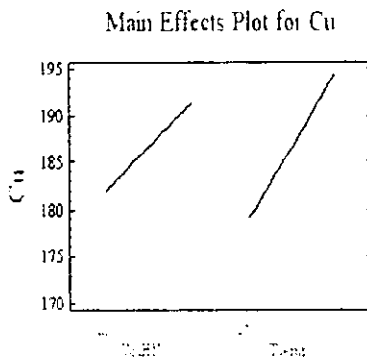


Figura A6

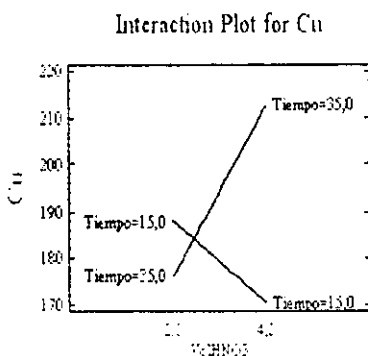


Figura A7

Contours of Estimated Response Surface

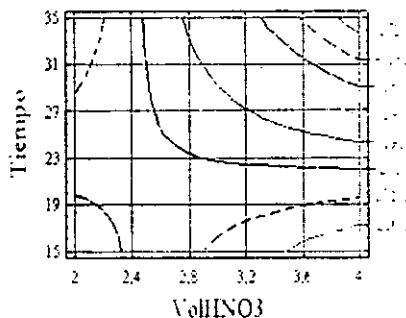


Figura A8

Analysis Summary

File name: C:\miostesis\Cosmstat\Higado certificado.six
 Comment: Valores de Higado certificado

Estimated effects for Cu

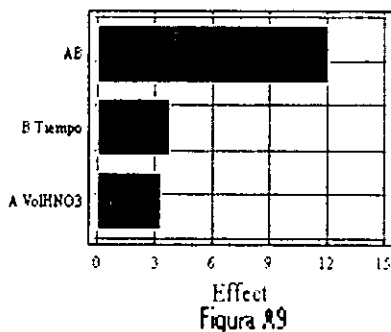
average = 186.778
 A: VolHNO3 = 9.515
 B: Tiempo = 15.385
 AB = 27.065

De manera análoga que el caso del Fe se puede observar lo siguiente:

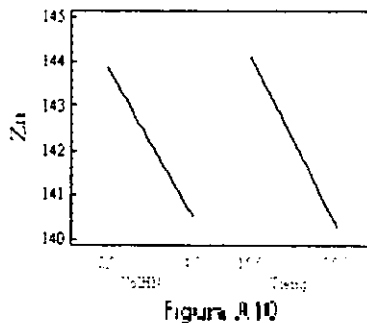
Figura	Comportamiento	Comentario
A5	Similar al de la figura A1	Se presenta sinergia entre T&V
A6	Similar al del caso del Fe	Similar al de la Figura A3
A7	Efecto de sinergia al estar los dos valores experimentales al máximo.	El efecto de sinergia no se da cuando los valores se alternan.
A8	Valores óptimos sobre hipérbola que pasa por Vol. = 2.8-4.0ml, y tiempo de 25-35 minutos.	Los valores son similares que en el caso del Fe, se encontró un valor de 186.778 al realizar el exp.

A2) Figuras correspondientes al comportamiento de la cantidad de Zn en Hígado certificado con respecto a los diferentes valores de los variables.

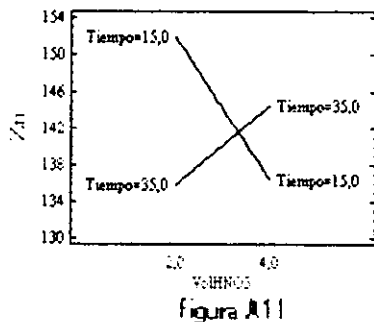
Pareto Chart for Zn



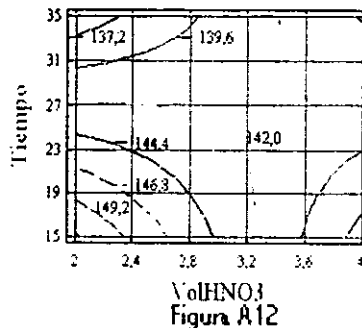
Main Effects Plot for Zn



Interaction Plot for Zn



Contours of Estimated Response Surface



Analysis Summary

File name: C:\miostesis\Cosastat\Higado certificado.sfx

Comment: Valores de Higado certificado

Estimated effects for Zn

average = 142,158

A:VolHNO3 = -3,395

B:Tiempo = -3,855

AB = 12,135

Comentarios sobre las figuras A9-A12 para el Zn en higado certificado.

Figura	Comportamiento	Comentario
A9	Interacción con mayor valor numérico y de signo +, valor numérico de cada variable semejante y -	Se presenta un efecto negativo entre el tiempo, volumen y la cantidad de Zn recuperado
A10	Mayor recuperación de Zn al disminuir el valor experimental del volumen y la temperatura	Se observa lo dicho en el apartado anterior
A11	El valor más alto de Zn se presenta cuando se trabaja el nivel más pequeño de volumen y de tiempo.	Se tienen valores más bajos si las condiciones del experimento se alternan.
A12	Valores óptimos sobre hipérbola que pasa por un volumen de 2.0-3.2ml y un tiempo de 15-27minutos.	Se utilizaron 3.2ml y 23 minutos para corroborar resultados se obtienen 142.15ppm.

Se conoce que el comportamiento de un metal en una matriz acuosa varia de acuerdo a sus propiedades intrínsecas y características fisico-químicas.

Por consiguiente, en este caso en particular el comportamiento del Zn es diferente al del Fe y Cu dentro de la misma matriz acuosa, observándose que la recuperación es menor al aumentar la temperatura y el volumen de ácido nítrico.

B) Figuras correspondientes al comportamiento de la cantidad de Fe en Riñón certificado con respecto a los diferentes valores de las variables.

Pareto Chart for Fe

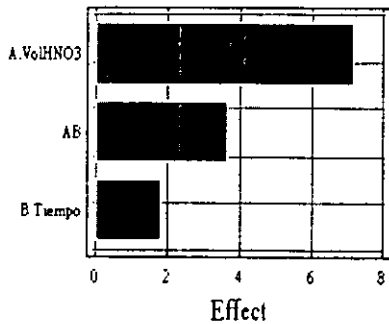


figura A13

Main Effects Plot for Fe

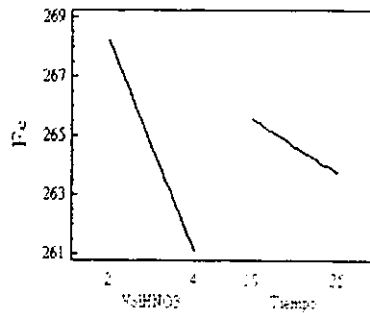


figura A14

Interaction Plot for Fe

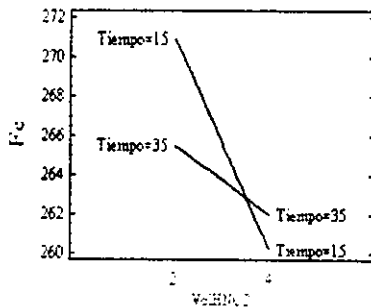


figura A15

Contours of Estimated Response Surface

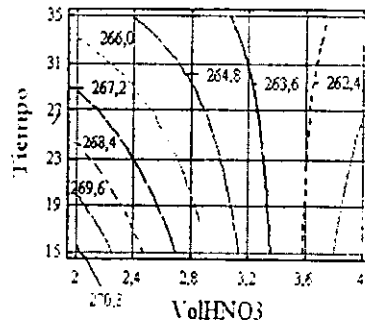


figura A16

Analysis Summary

File name: C:\miostesis\Cosastat\Riñon certificado.six
 Comment: Riñón de cerdo certificado

Estimated effects for Fe

 average = 264.635
 A:VolHNO3 = -7.182
 B:Tiempo = -1.819
 AB = 3.658

De la Figura A13 y los datos numéricos obtenidos para cada factor (que se muestran debajo de las figuras) se observa, ahora en el caso del riñón, que la interacción entre el tiempo y el volumen, para este elemento, es positiva y numéricamente tiene un valor medio con respecto al presentado por las variables individuales, a diferencia del caso de este metal en hígado, se observa que los efectos del tiempo y del volumen de ácido son negativos, es decir, mientras su valor experimental aumenta la recuperación del Fe tenderá a disminuir.

Al analizar la Figura A14 se puede confirmar que efectivamente al aumentar su valor experimental, del tiempo y del volumen de ácido, la cantidad recuperada del metal de la matriz disminuye. Cabe señalar que en el caso del tiempo, no se afecta tan considerablemente la cantidad de metal recuperado, en comparación con el caso del volumen de ácido nítrico.

Por otro lado al analizar la figura A15 se tiene que cuando las dos variables se encuentran en sus valores experimentales más altos la recuperación del metal es la menor.

En la figura de área estimada de respuesta (Figura A16) se aprecia que los valores para el tiempo y el volumen en teoría óptimos no se encuentran sobre el área de respuesta estimada. Esto indica que en las condiciones experimentales manejadas no se logrará encontrar el valor esperado, aun evaluando las posibles combinaciones de las condiciones experimentales, como consecuencia no se espera una optimización del proceso en estas condiciones.

En este caso se obtendrá una respuesta máxima de 270.8 ppm sobre la hipérbola que pasa por los valores experimentales de 2.0 - 2.2ml con un tiempo de 15-17 minutos. Se comprobaron dichas predicciones realizando el experimento con un volumen de 3.6ml de ácido nítrico concentrado y un tiempo de 25 minutos, obteniendo un valor de 264.63ppm y es nuevamente cercano al esperado (tabla18).

B1) Figuras correspondientes al comportamiento de la cantidad de Cu en Riñón certificado con respecto a los diferentes valores de las variables.

Pareto Chart for Cu

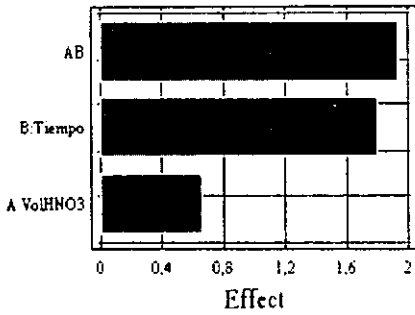


Figura A17

Main Effects Plot for Cu

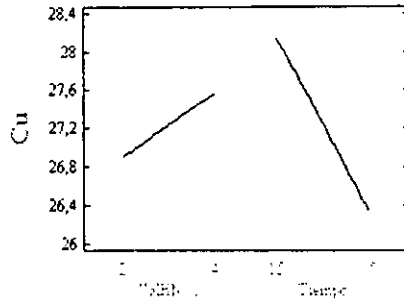


Figura A18

Interaction Plot for Cu

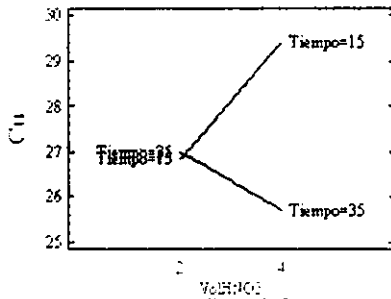


Figura A19

Contours of Estimated Response Surface

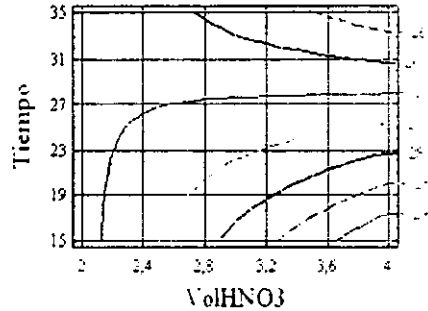


Figura A20

Analysis Summary

File name: C:\miostesis\Cosastat\Riñón certificado.sfx
 Comment: Riñón de cerdo certificado

Estimated effects for Cu

average = 27,238
 A:VolHNO3 = 0,663
 B:Tiempo = -1,805
 AB = -1,94

Comentarios de las figuras A17-A20 para el Cu en riñón certificado

Figura	Comportamiento	Comentario
A17	Interacción negativa y semejante en magnitud al valor del tiempo, el valor del tiempo también es negativo, efecto de ácido positivo.	En el caso del ácido mientras su volumen experimental aumenta la recuperación del Cu aumenta.
A18	Al aumentar el valor experimental del tiempo la recuperación de Cu disminuye, en el caso del volumen aumenta.	Se tienen efectos contrarios, en este caso, para las variables aisladas
A19	Cuando los valores experimentales están en su valor máximo la recuperación de Cu es la menor de todos los casos.	Se tiene un valor de Cu constante cuando se utilizan 2ml de ácido sin importar el tiempo del proceso.
A20	Los valores reportados del material certificado no se encuentran dentro de la figura de respuesta esperada.	En estas condiciones experimentales no se logrará obtener el valor reportado del material certificado.

En este caso se obtendrá una respuesta máxima de 29 ppm sobre la hipérbola que pasa por los valores experimentales de 3.6 - 4.0ml con un tiempo de 15-18 minutos.

B2) Figuras correspondientes al comportamiento de la cantidad de Zn en Riñón certificado con respecto a los diferentes valores de las variables.

Pareto Chart for Zn

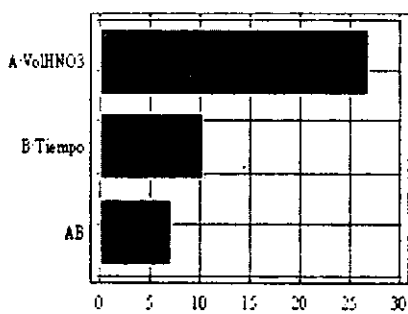


Figura A21

Main Effects Plot for Zn

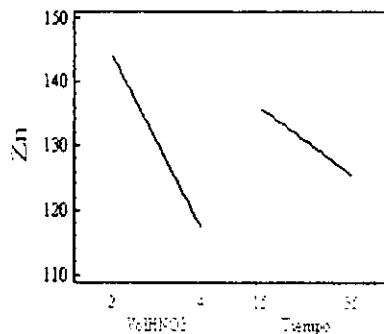


Figura A22

Interaction Plot for Zn

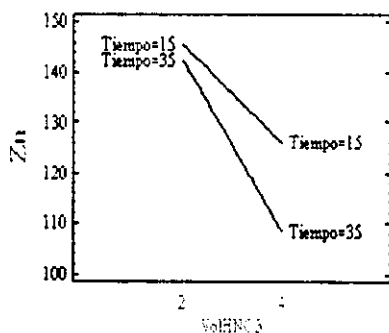


Figura A23

Contours of Estimated Response Surface

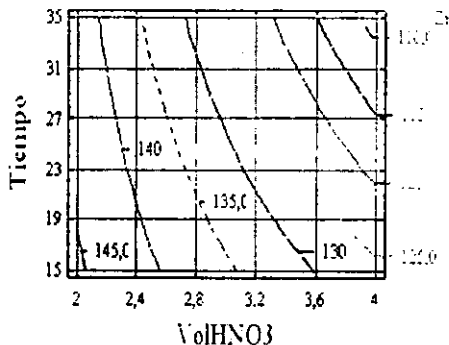


Figura A24

Analysis Summary

File name: C:\miostesis\Cosastat\Riñon certificado.sfx
 Comment: Riñón de cerdo certificado

Estimated effects for Zn

 average = 130.509
 A: VolHNO3 = -26.898
 B: Tiempo = -10.369
 AB = -7.278

Comentarios sobre las figuras A21-A24 para el Zn en riñón certificado.

Figura	Comportamiento	Comentario
A21	La interacción es negativa y el valor de los otros dos factores también	El valor más pequeño es de la interacción
A22	Al aumentar el valor tanto del volumen como del tiempo la cantidad de metal disminuye	El efecto es menos evidente en el caso del efecto del tiempo
A23	Cuando las dos variables están en sus valores experimentales más altos la recuperación del metal es la menor	Siempre que se utiliza el volumen de dos mililitros la cantidad de metal recuperada es constante y mayor.
A24	Los valores en donde se pueden obtener valores cercanos al reportado están sobre la línea curva que va de 3.6 - 2.8ml y de 15-35 minutos.	Como en los casos anteriores los valores teóricos obtenidos se evalúan con un experimento, obteniendo un valor de 130.50ppm

C) Figuras correspondientes al comportamiento de la cantidad de Fe en Músculo certificado con respecto a los diferentes valores de las variables.

Pareto Chart for Fe

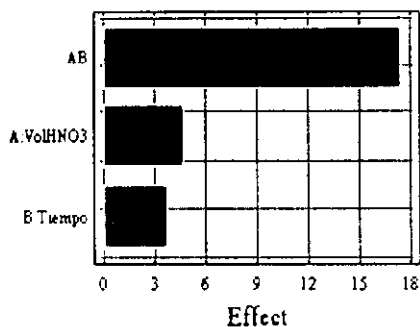


Figura A25

Main Effects Plot for Fe

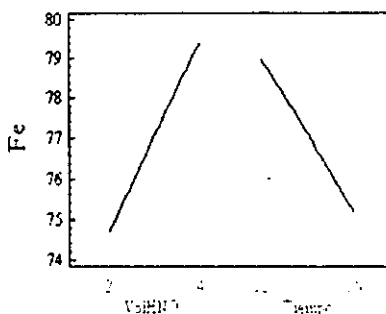


Figura A26

Interaction Plot for Fe

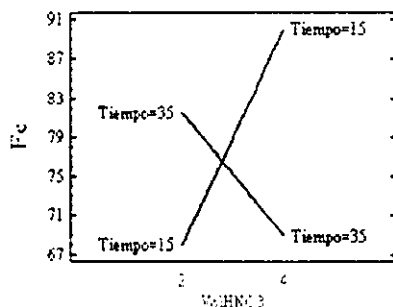


Figura A27

Contours of Estimated Response Surface

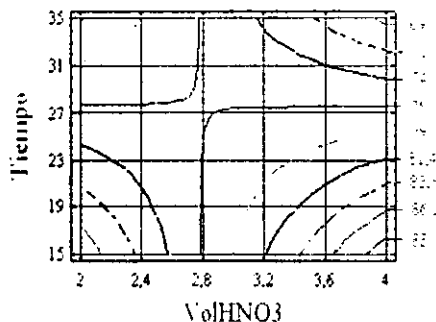


Figura A28

Analysis Summary

File name: C:\miostesis\Cosastat\Músculo certificado.six
 Comment: Músculo de Bovino

Estimated effects for Fe

average = 77,069
 A:VolHNO3 = 4,751
 B:Tiempo = -3,808
 AB = -17,441

Comentarios sobre las figuras A25-A28 para el Fe en músculo certificado.

Figura	Comportamiento	Comentario
A25	La interacción entre el tiempo y el volumen es negativa, además numéricamente es la más grande	el valor numérico del efecto del tiempo es negativo, y el otro factor es positivo.
A26	Al aumentar el valor experimental del volumen, la cantidad de Fe recuperado aumenta.	Con el tiempo la cantidad recuperada del metal disminuye conforme se aumenta el valor experimental.
A27	Cuando las dos variables se encuentran en sus valores experimentales más altos, la recuperación del metal es la menor.	Alternando un valor experimental alto de una variable y un valor bajo de la otra se pueden obtener mejores resultados.
A28	Los valores en donde se puede alcanzar la recuperación total en teoría del elemento se encuentran sobre una hipérbola dentro del área esperada.	La línea en su parte de abajo inicia en 3.0ml. y termina en 4.0 ml, además va desde 15 hasta los 25 minutos, se realizó un experimento obteniendo 80.9ppm

C1) Figuras correspondientes al comportamiento de la cantidad de Zn en Músculo certificado con respecto a los diferentes valores de las variables.

Pareto Chart for Zn

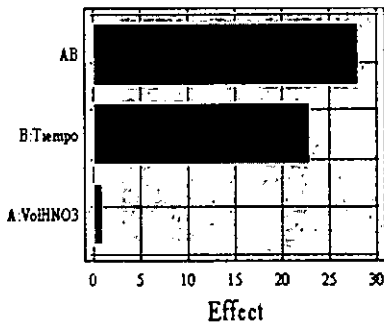


Figura A29

Main Effects Plot for Zn

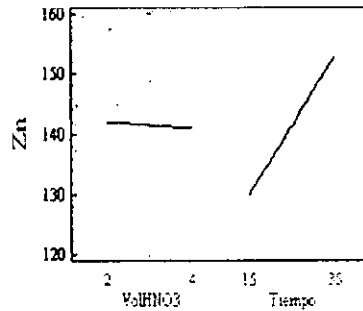


Figura A30

Interaction Plot for Zn

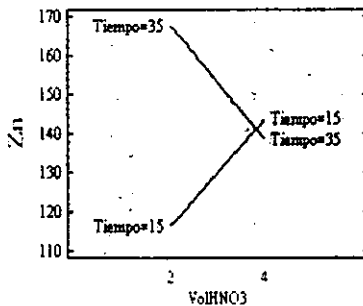


Figura A31

Contours of Estimated Response Surface

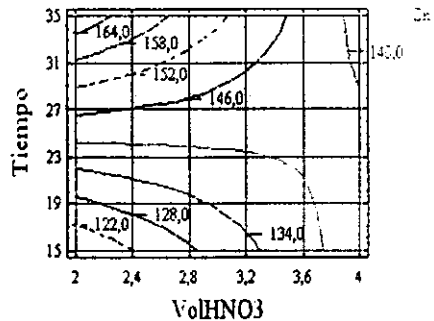


Figura A32

Analysis Summary

File name: C:\miostesis\Cosastac\Músculo certificado.sfx
 Comment: Músculo de Bovino

Estimated effects for Zn

average = 141,513
 A: VolHNO3 = -1,06
 B: Tiempo = 23,049
 AB = -28,2

Comentarios sobre las figuras A29-A32 para el Zn en músculo certificado.

Figura	Comportamiento	Comentario
A29	La interacción entre el tiempo y el volumen, es negativa y numéricamente es la más grande el valor numérico del efecto del tiempo es positivo	El valor del efecto del volumen de ácido es el más pequeño y casi despreciable en comparación con los otros dos factores .
A30	Al aumentar el valor experimental del volumen, la cantidad de Fe recuperado no varía de manera significativa.	Con el tiempo la cantidad recuperada del metal aumenta conforme se aumenta el valor experimental.
A31	Con el volumen de 4 ml. la cantidad recuperada no varía de forma apreciable.	Con un volumen de dos mililitros la cantidad recuperada depende mucho del tiempo utilizado.
A32	Los valores en donde se obtendría experimentalmente el valor reportado, no se encuentran sobre el área de respuesta estimada.	Como en el caso del Fe en riñón en las condiciones experimentales manejadas no se lograra encontrar el valor esperado

En este caso se obtendrá una respuesta máxima de 164 ppm sobre la hipérbola que pasa por los valores experimentales de 2.0 a 2.4ml con un tiempo de 32-35 minutos.

Todo lo anterior nos muestra un panorama de las respuestas que se pueden obtener de nuestro experimento, con las condiciones que se consideraron las más idóneas en un inicio, y como se puede apreciar algunas de ellas no son las más adecuadas.

La obtención numérica del valor de cada uno de los efectos por métodos estadísticos ayuda a una visualización más sencilla de la importancia real de la variable, con lo cual, tras un análisis puede elegirse entre variar el valor experimental o, en último de los casos, si no es importante puede eliminarse del diseño experimental.

Los programas de cómputo diseñados para facilitar el manejo estadístico de datos en un diseño experimental cumplen con su función y reducen el tiempo

que generalmente se tardaría el investigador en analizar los datos de forma manual o con otros programas más limitados.

Paralelamente, se tiene la posibilidad de presentar gráficos y figuras que facilitan el análisis. Cabe señalar, que cuando el interés es el establecimiento de metodología analítica se debe de contar con los valores de un estándar certificado de referencia del material a analizar para poder constatar que los resultados obtenidos en el experimento y con el programa son apegados a comportamientos reales y no solamente teóricos.

Por otro lado, en el ambiente analítico no es muy utilizado este tipo de diseños experimentales y es interesante evaluar su utilidad.

Los valores obtenidos de digestiones abiertas siempre son más altos que los obtenidos por digestión de microondas, y al realizar el ajuste de condiciones (optimización) se tienen valores que están dentro de los límites del material certificado, lo que indica que el método es recomendable y que los resultados son confiables.

6.4.2 Diseño tradicional de una sola variable.

Con lo que respecta a la digestión de microondas cabe señalar que la química de los procesos donde interviene la radiación de microondas es diferente y poco estudiada en comparación con los procesos tradicionales de calentamiento y tratamiento de muestras.

La radiación de microondas es una forma de radiación electromagnética de más baja energía que la radiación de infrarrojo, la frecuencia comúnmente usada en los equipos de digestión por microondas es de 2450MHz, esto es debido a un convenio internacional que sugiere esta frecuencia para fines industriales, científicos y médicos.

La radiación consiste en una onda electromagnética oscilante cuyos campos se encuentran en ángulos rectos, los líquidos expuestos a este tipo de radiación se pueden calentar por dos mecanismos, la rotación de dipolo y la conducción iónica, en donde las moléculas polares pueden alinear sus momentos dipolares con el campo eléctrico de la microonda. Como el campo no es constante y se encuentra cambiando hace que las moléculas roten hacia delante y hacia atrás provocando choques intermoleculares con las moléculas cercanas para generar calor.

Por otro lado en la digestión de microondas se estudia la **cantidad de muestra y tipo de tejido**, lo cual se hace siguiendo un diseño experimental común (**una sola variable a la vez**), usando los mismos estándares de referencia.

Este experimento se realiza bajo las siguientes condiciones experimentales: Se utilizan los mismos viales de Teflon que en el primer experimento, se colocan las muestras, se les adiciona el oxidante, y se ponen en el carrusel, después se cierran para después colocarse dentro del horno de microondas.

El programa que se sigue para la digestión es el método dos, que viene predeterminado en el equipo y en teoría es el adecuado para todo tipo de muestras biológicas, según el fabricante del equipo (Milestone Inc.).

En este caso en particular no se cambian los parámetros como son: potencia, tiempo, y ciclos de digestión, por que en primer lugar el equipo no consta de sensores presión y temperatura, en segundo lugar no pertenece al laboratorio donde se realizó el presente trabajo, como consecuencia, cualquier problema de seguridad e integridad del equipo derivado de los posibles cambios que se puedan hacer al método predeterminado de digestión, no han sido previstos en el acuerdo inicial de los dos departamentos.

El tiempo que utiliza el programa son 20 minutos, más el tiempo adecuado para enfriar las muestras que es de aproximadamente 3 horas.

En la tabla siguiente (Tabla 14) se muestran los resultados obtenidos al evaluar para la cantidad de muestra 0.1, 0.3 y 0.5g para el caso del hígado, 0.1 y 0.3g para el caso del riñón y el músculo. Como solución oxidante se utiliza una mezcla de HNO₃ - peróxido en relación 4:2.

Tabla 14 Resultados obtenidos por digestión de microondas con el diseño de una sola variable

Tejido	Peso	Conc. Zn	CV	Conc. Fe	CV	Conc. Cu	CV	Número de muestras
Hígado	0.1	111.56	2.8	152.5	0.4	167.3	4.8	3
Hígado	0.3	114.45	6.5	152.3	2.7	166.02	1.9	3
Hígado	0.5	129.44	8.1	183.8	3.2	179.22	5.1	3
Promedio		118.48	8.1	162.8	10	170.84	4.2	9
Riñón	0.1	106.83	1.6	201.6	1.9	28.59	6.3	4
Riñón	0.3	109.14	2.6	175.3	3.5	28.39	3.1	4
Promedio		107.98	1.5	188.4	1.5	28.49	0.5	8
Músculo	0.1	132.15	2.6	55.58	0.8	1.8	4.8	3
Músculo	0.3	137.52	1.1	57.86	0.9	1.94	7.1	3
Promedio		132.33	2.8	56.72	2.8	1.87	5.2	6

Se realizan determinaciones por triplicado en cada caso y se reporta en microgramos por gramo de tejido peso seco, los valores se determinan por calibración directa.

De la tabla anterior se tiene que los valores obtenidos para cada metal en los diferentes tejidos son sistemáticamente más bajos que los registrados por digestión abierta, además los valores de sus Coeficientes de variación (CV) son en general un poco menores y similares entre sí. Se observa una ligera tendencia a tener valores más altos entre mayor sea la cantidad de muestra tomada para la digestión.

Cuando se analizan muestras biológicas en los digestores de microondas⁵⁷ con una concentración relativamente baja de algunos elementos, se pueden cometer errores sistemáticos importantes cuando se utilizan viales de Teflon ya que se recomienda por algunos investigadores el uso de viales de cuarzo de alta pureza ya que la temperatura que se alcanza con estos viales es de alrededor de 320°C, lo que garantiza la completa digestión de los minerales presentes en la matriz, mientras que con los viales de Teflon la temperatura alcanzada es menor lo que implica que probablemente la destrucción completa de los componentes orgánicos no se llega a alcanzar. (G Knapp, New developments in the decomposition of biological material. Invited lecture presented at the 5th International Workshop, trace element Analytical C. In Medicine & Biology, Neuherberg, Germany, April 1988)

Tras la realización de los anteriores experimentos se puede establecer que la planeación "a priori" de un diseño experimental exhaustivo es difícil ya que por lo general cuando se inicia un experimento lo que se desea es conocer el comportamiento del mismo y en unos casos no se tiene evidencia de los probables resultados. Al ir avanzando en el desarrollo del experimento se van conociendo a fondo cuales variables afectan, así como, el grado de importancia que estas presentan. Además, por falta de información en un inicio no se puede diseñar un experimento solamente con el diseño factorial ya que este se basa en una matriz de diseño, en donde en cada punto se asigna un valor para la variable. Sin embargo, conforme se tienen más elementos se aprecia la utilidad de este diseño, ya que facilita el trabajo reduciendo el tiempo y el número de experimentos a realizar. Por otro lado, se tiene la posibilidad de encontrar interacciones entre las variables, y así apoyar la optimización del método.

6.5 Determinación analítica por ICP-AES

6.5.1 Linearidad

En la figura 8 se presentan las curvas de calibración y las rectas de regresión obtenidas para cada uno de los diferentes metales. Se puede apreciar que existe una relación lineal entre los resultados de intensidad (en el intervalo de 0.05-10 ppm) y las concentraciones de los analitos en el intervalo de concentraciones manejado.

Cabe señalar en este caso que la matriz no presenta un efecto evidente que altere la determinación y las curvas de regresión son aceptables para los tres elementos.

Intensidad (I)

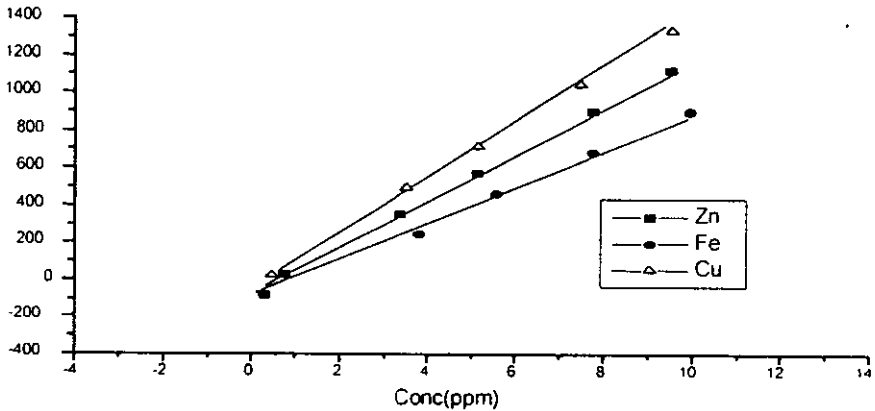


Figura 8 Curvas patrón de Zn, Fe y Cu en condiciones experimentales optimizadas (n=5).

Se realizan las determinaciones por triplicado para cada punto en cada curva y se reporta el promedio, el CV obtenido en cada caso es menor del 5% .

Las figuras 9, 10 y 11 nos muestran los espectros de emisión obtenidos para Zn, Fe y Cu, respectivamente, en la muestra de músculo. En ellas se observa que la señal prácticamente no presentan interferencias, es simétrica, bien definida, no presenta corrimiento en la longitud de onda y el fondo de la señal es mínimo.

Cabe señalar en el caso del Cu en músculo (Figura 11), que debido a los niveles de concentración de este metal en la muestra, no es posible determinarlo de manera adecuada por medio del ICP-AES, ya que la intensidad de la señal de la muestra es similar a la intensidad obtenida para el blanco. Por tal motivo se recurre a analizar este elemento por Absorción Atómica Electrotérmica (Horno de Grafito), y los resultados se discuten más adelante.

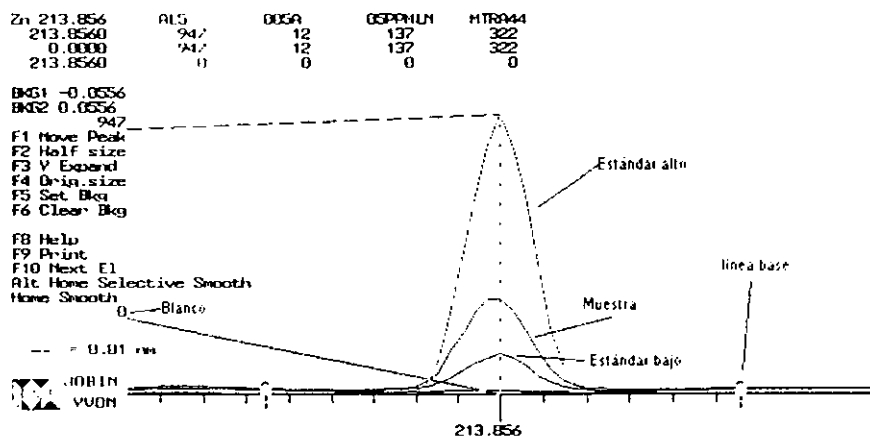


Figura 9 Espectro obtenido de Zn en la muestra de músculo junto con el estándar alto, bajo y el blanco.

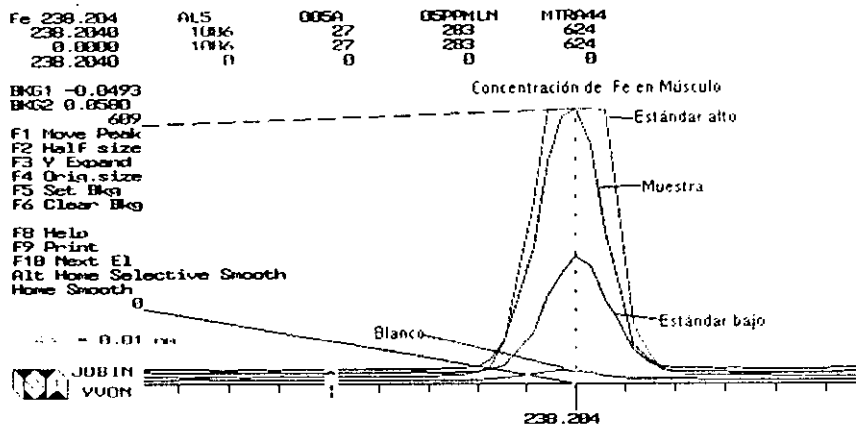


Figura 10 Espectro obtenido para el Fe en la muestra de músculo junto con el estándar alto, bajo y el blanco.

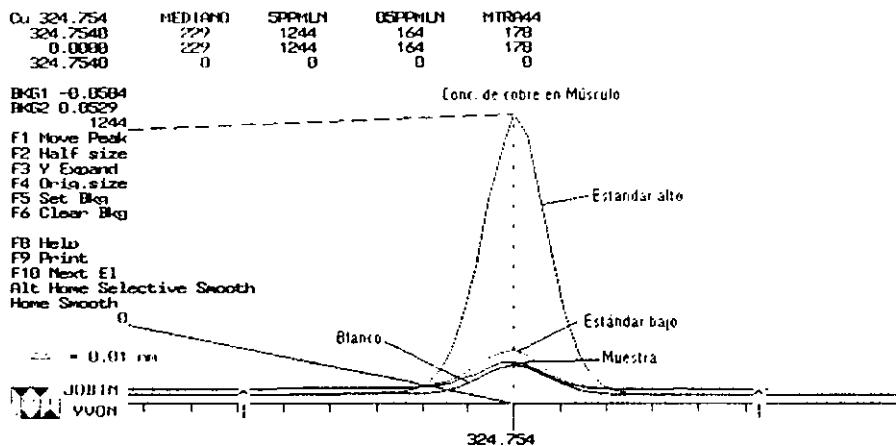


Figura 11 Espectro obtenido para el Cu en la muestra de músculo junto con el estándar alto, bajo y el blanco.

6.5.2 Efecto de la adición de sodio

Experimentalmente se estudio el efecto de la presencia de sodio en la matriz biológica, observándose que las otras especies presentes en mayor concentración que los elementos de interés tales como; Ca, Mg, Na, y K, entre otros, no afectan significativamente el análisis instrumental en las condiciones experimentales trabajadas (Tabla 15).

Tabla 15 Resultados del efecto de la matriz (Presencia de sodio)

Tejido	Conc.Zn	Conc.Fe	Conc.Cu
Músculo	132.15	55.58	1.80
Tejido	Conc.Zn ⁺	Conc.Fe ⁺	Conc.Cu ⁺
Músculo	132.8	56.6	1.85
Tejido	Conc.Zn	Conc.Fe	Conc.Cu
Hígado	114.45	152.3	166.02
Tejido	Conc.Zn ⁺	Conc.Fe ⁺	Conc.Cu ⁺
Hígado	114.8	153.2	168.2
Tejido	Conc.Zn	Conc.Fe	Conc.Cu
Riñón	109.14	226.59	28.59
Tejido	Conc.Zn ⁺	Conc.Fe ⁺	Conc.Cu ⁺
Riñón	109.2	228.1	28.6

Se realizan determinaciones por triplicado en cada caso y se reporta en microgramos de elemento por gramo de tejido peso seco, los valores se determinan por calibración directa. Los valores con el + son aquellos obtenidos tras la adición de sodio a las muestras.

El anterior experimento se realizó de la siguiente manera:

A una muestra proveniente de la digestión abierta se le determina su concentración de los tres metales (Fe, Cu y Zn), una vez hecho esto se le adiciona un mililitro de un estándar conocido de Na en solución ácida 0.1N de HNO₃, cuya concentración de la solución es de 3000ppm, es decir, se adiciona la misma proporción que se supone hay normalmente, en cuanto a magnitudes de concentración, del sodio con respecto a los otros metales.

6.5.3 Efecto de la adición estándar

Como ya se mencionó con anterioridad los resultados de concentración obtenidos por digestión abierta siempre fueron sistemáticamente más altos que los obtenidos por microondas por consiguiente con el objeto de estudiar el efecto matriz sobre la respuesta de la señal de intensidad se utilizó el método de las adiciones estándar para las muestras obtenidas por los dos tipos de digestiones.

Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 16 y 17 para digestión abierta y digestión por microondas respectivamente.

Tabla 16 Resultados del efecto de la matriz por digestión abierta

(Adición estándar)

Tejido	Conc.Zn	Conc.Fe	Conc.Cu
Músculo	167.66	81.510	ND
Tejido	Conc.Zn/	Conc.Fe/	Conc.Cu/
Músculo	168.2	80.9	ND
Tejido	Conc.Zn	Conc.Fe	Conc.Cu
Hígado	151.855	210.771	187.859
Tejido	Conc.Zn/	Conc.Fe/	Conc.Cu/
Hígado	150.24	212.3	187.56
Tejido	Conc.Zn	Conc.Fe	Conc.Cu
Riñón	125.88	260.124	29.44
Tejido	Conc.Zn/	Conc.Fe/	Conc.Cu/
Riñón	125.6	261.01	29.2

Se realizan determinaciones por triplicado en cada caso y se reporta en microgramos por gramo de tejido peso seco. Los valores con el / son aquellos obtenidos tras la adición estándar con tres puntos para cada elemento.

Tabla 17 Resultados del efecto de la matriz por digestión de microondas

(Adición estándar)

Tejido	Conc.Zn	Conc.Fe	Conc.Cu
Músculo	132.15	55.584	1.8
Tejido	Conc.Zn/	Conc.Fe/	Conc.Cu/
Músculo	133.91	56.73	1.95
Tejido	Conc.Zn	Conc.Fe	Conc.Cu
Hígado	114.45	152.5	167.3
Tejido	Conc.Zn/	Conc.Fe/	Conc.Cu/
Hígado	126.79	161.1	179.83
Tejido	Conc.Zn	Conc.Fe	Conc.Cu
Riñón	109.14	226.6	28.39
Tejido	Conc.Zn/	Conc.Fe/	Conc.Cu/
Riñón	109.29	238.01	29.27

Se realizan determinaciones por triplicado en cada caso y se reporta en microgramos por gramo de tejido peso seco. Los valores con el / son aquellos obtenidos tras la adición estándar con tres puntos para cada elemento.

Para determinar la concentración de las muestras por adiciones estándar se determina el valor de los metales de la siguiente forma;

Se analiza la muestra proveniente de la digestión, después se le hacen tres adiciones de 1 ml de solución estándar multielemental (de Fe, Cu y Zn) en 0.1N de HNO_3 , leyendo tras cada adición el valor de concentración en la muestra, finalmente se gráficán los resultados como se muestra en la figura 11a y se efectúa una extrapolación al intercepto con el eje de las X, en donde el valor de $-X$ es el valor que se reporta en las tablas anteriores (16 y 17).

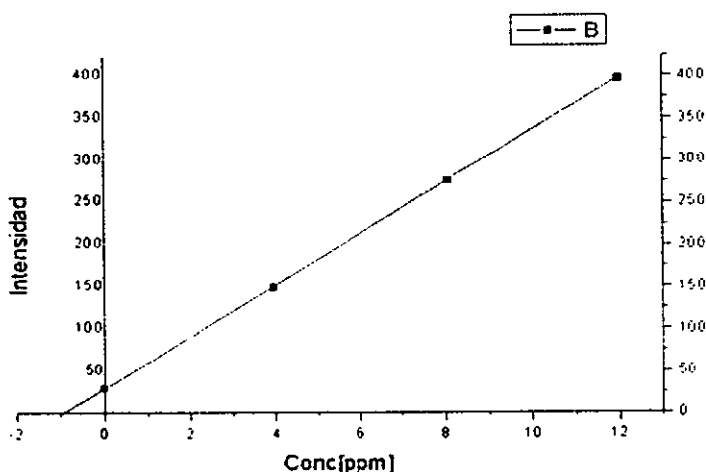


Figura 11ª Obtención del valor de concentración de una muestra por el método de adiciones estándar.

A partir de estas tablas se logra apreciar que en el caso de digestión abierta no se presenta un efecto matriz evidente en los resultados, sin embargo, en el caso de digestión por microondas se logra apreciar que el efecto matriz es grande y puede generar valores más bajos de concentración. Por el método de adiciones estándar se elevan los valores pero todavía no se acercan al valor certificado.

En la tabla siguiente (tabla 18) se presenta un resumen de los resultados obtenidos por los métodos utilizados y se comparan con el valor certificado.

Tabla 18 Resultados por digestión de microondas y por digestión abierta en comparación con el valor certificado.

<i>Digestión</i>	<i>Tejido</i>	<i>Conc.Zn</i>	<i>Conc.Fe</i>	<i>Conc.Cu</i>
Microondas	Músculo	132.33	56.72	1.87
Abierta	Músculo	168.2	80.9	ND
Valor referencia	Músculo	166.286+/-3.363	78.87+/-1.9627	2.35+/-0.06

<i>Digestión</i>	<i>Tejido</i>	<i>Conc.Zn</i>	<i>Conc.Fe</i>	<i>Conc.Cu</i>
Microondas	Hígado	126.79	161.1	179.83
Abierta	Hígado	142.15	214.11	186.778
Valor referencia	Hígado	141.55+/-2.805	213.98+/-5.299	189.2+/-3.7

<i>Digestión</i>	<i>Tejido</i>	<i>Conc.Zn</i>	<i>Conc.Fe</i>	<i>Conc.Cu</i>
Microondas	Riñón	109.29	238.01	29.27
Abierta	Riñón	130.50	264.63	29.38
Valor referencia	Riñón	128.19+/-3.08	298.66+/-9.77	31.9+/-0.35

Se realizan determinaciones por triplicado en cada caso y se reporta en microgramos por gramo de tejido peso seco.

El valor que se encuentra en la tabla anterior es el que se obtuvo con las condiciones óptimas para cada caso, y en base a esta tabla podemos observar que los valores obtenidos por digestión abierta son aceptables para el caso del hígado, y músculo en cuanto al Fe y Zn, mientras que para el caso del riñón el único valor que es similar al reportado es el del Zn. Los valores obtenidos para el Fe y Cu en riñón se encuentran por debajo del valor reportado lo que significa que las condiciones de trabajo manejadas no son las adecuadas.

Nos queda como evidencia entonces que este método es útil para la recuperación de ciertos metales a partir de muestras biológicas, y que tras unos cuantos ensayos se podría aplicar para análisis de rutina obteniendo un estimado bastante acertado del contenido metálico en una muestra dada.

Los parámetros experimentales óptimos que se derivan de este experimento son:

<i>Tejido</i>	<i>Para Zn</i>	<i>Para Fe</i>	<i>Para Cu</i>
Músculo	2ml ácido y 35 minutos	3ml de ác. y 25minutos	ND
Riñón	3.2ml de ác. y 16minutos	2.2ml de ác. y 16 min.	3.6 ml ác. y 16min
Hígado	3.2ml (HNO ₃) y 23minutos	3.2ml ác. y 23min.	3.2ml ác. y 23min

6.6 Evaluación de las figuras de mérito de los estudios realizados por ICP

6.6.1 Precisión (repetibilidad y reproducibilidad)

En las figuras siguientes se muestran los resultados analíticos obtenidos al realizar en repetidas ocasiones el análisis de las muestras y sus respectivas curvas de calibración.

Las curvas de calibración se obtienen de la siguiente manera:

Se realizan diluciones de los estándares de 1000 ppm, de tal modo que se obtengan concentraciones multielementales de Zn, Fe y Cu de 0.05, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 y 50.0 ppm, utilizando como solución diluyente HNO₃ al 1%, éstas soluciones serán los estándares para la curva, utilizándose como blanco de calibración la solución diluyente de HNO₃ al 1% (el ácido usado es redestilado con certificado de análisis).

Los datos que aparecen en la figura 12 se refieren a las curvas realizadas para el Zn, mientras que la figura 14 se refiere al Fe y por último la figura 15 se refiere al cobre.

En las figuras 12, 14 y 15 se muestra la precisión del método que se está utilizando, es decir, se realizan curvas de calibración el mismo día con condiciones de trabajo idénticas, como es; suministro eléctrico, temperatura, presión, mismo tanque de argón, reactivos, estándares, etc., lo que se conoce como repetitividad o precisión dentro de rachas.

Asimismo, se realiza el mismo ensayo en diferentes días, diferentes reactivos, condiciones del equipo, suministro eléctrico, presión y diferente analista (algunos datos fueron aportados por la Bióloga Beatriz Rodarte Munguía y por el supervisor técnico LQI María Teresa de Jesús R.S), lo que es conocido como la reproducibilidad del método o precisión entre rachas

diferentes, es decir, la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes.

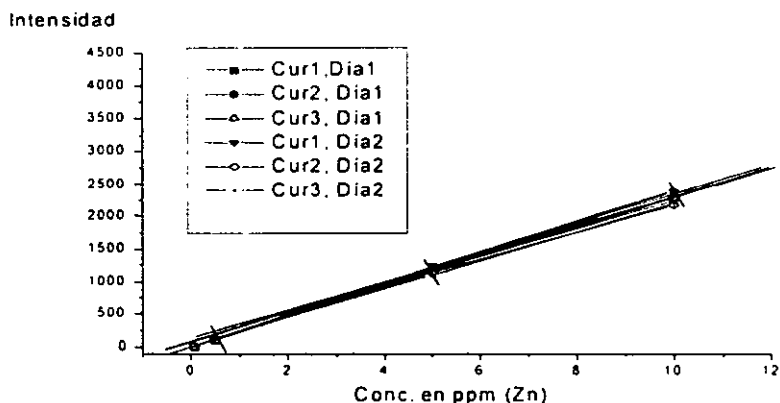


Figura 12

Curvas patrón realizadas en días diferentes para el Zn

Se realizan las determinaciones por triplicado para cada punto en cada curva y se reporta el promedio, el Coeficiente de Variación obtenido en cada caso es menor del 5%.

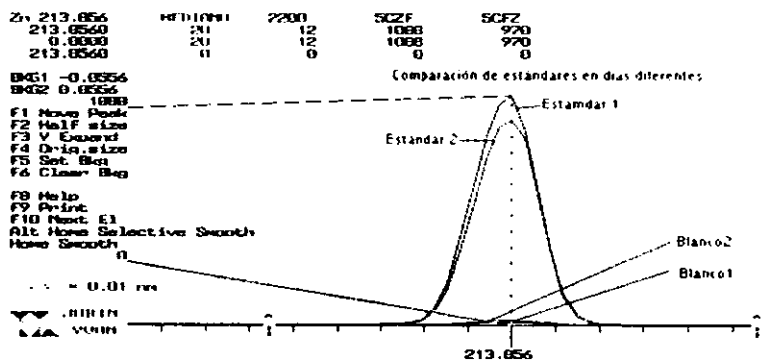


Figura 13 Comparación de la intensidad y del espectro obtenido para dos estándares de Zn preparados en diferentes días.

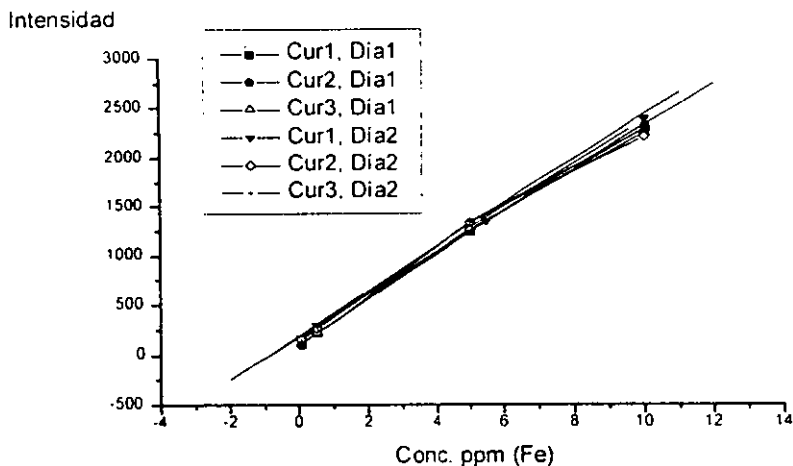


Figura 14

Curvas patrón realizadas en días diferentes para el Fe

Se realizan las determinaciones por triplicado para cada punto en cada curva y se reporta el promedio, el Coeficiente de Variación obtenido en cada caso es menor del 5%.

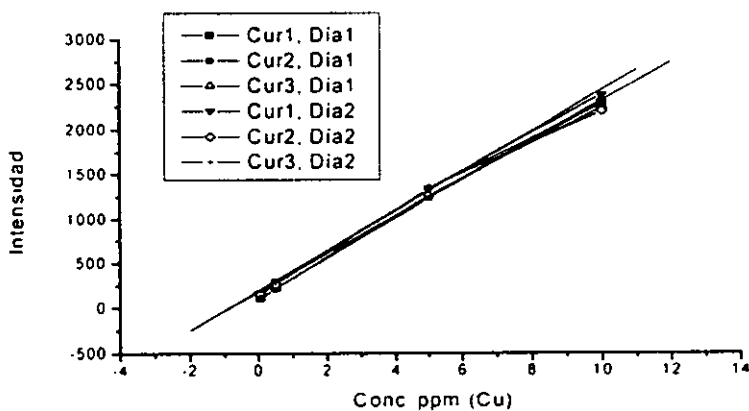


Figura 15

Curvas patrón realizadas en días diferentes para el Cu

Se realizan las determinaciones por triplicado para cada punto en cada curva y se reporta el promedio, el CV obtenido en cada caso es menor del 5%.

6.7 Determinación analítica por Horno de Grafito (Absorción Atómica)

6.7.1 Optimización de la temperatura de calcinación

En primera instancia se realizan experimentos para obtener la temperatura de calcinación más adecuada con base en el estudio de la desviación estándar relativa (RSD ó coeficiente de variación (CV)), tanto del blanco como del problema, en función de la temperatura (Figura 16). Al mismo tiempo se evalúa también la respuesta Abs - área de la muestra (con su blanco) en función de la temperatura de calcinación (Figura 17), utilizándose para tal efecto estándares de referencia (músculo de bovino BCR 184).

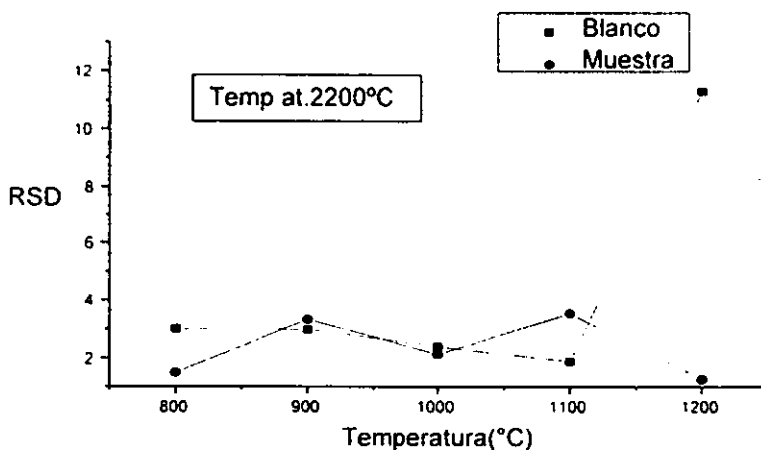


Figura 16 Valor de la desviación estándar relativa (RSD) en función de la Temperatura de calcinación (°C)

Se realizan determinaciones por triplicado en cada caso y el RSD representado es el obtenido de las tres lecturas de Abs-área.

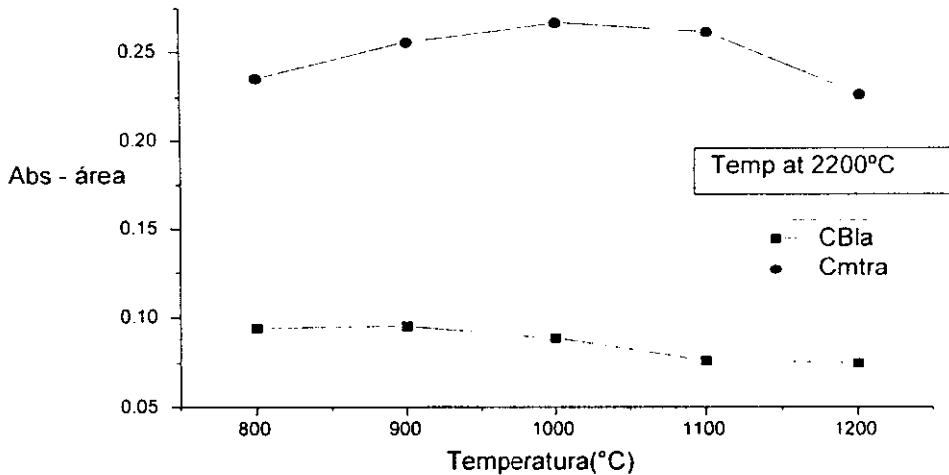


Figura 17 Concentración de una misma muestra (con su respectivo blanco) en función de la temperatura de calcinación(°C).

Los resultados se reportan en Absorbancia área (Abs-área) de la muestra. Se realizan determinaciones por triplicado en cada punto del blanco y de la muestra.

El comportamiento observado en las figuras 16 y 17 indican que el valor de RSD a la temperatura de calcinación de 1000°C es de alrededor de 2.5 para el blanco y de 2.7 para la muestra, y el valor de Abs- área obtenido corresponde a concentraciones entre 2.4-2.7 ppb, en el intervalo de 1000-1100°C, mientras que la concentración esperada es de 2.35 ppb. Por lo anterior se considera adecuada la temperatura de 1000°C, para el proceso de calcinación, ya que se obtienen bajos valores de RSD (precisión) y valores cercanos al esperado en cuanto a concentración (exactitud).

6.7.2 Optimización de la temperatura de atomización

De igual modo que para la temperatura de calcinación se realizan experimentos para obtener la temperatura de atomización más adecuada en base al estudio del RSD, en función de la temperatura (Figura 18), y se analiza además la

respuesta Abs - Area de una misma muestra (con su blanco) en función de la temperatura de atomización (Figura 19).

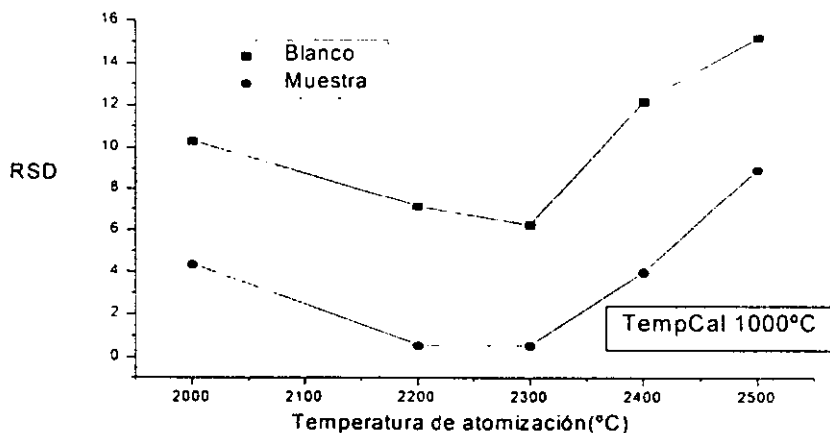


Figura 18 Valor de RSD en función de la Temperatura de atomización (°C)

Se realizan determinaciones por triplicado en cada caso y el RSD manejado es el obtenido tras las tres lecturas de Abs-área.

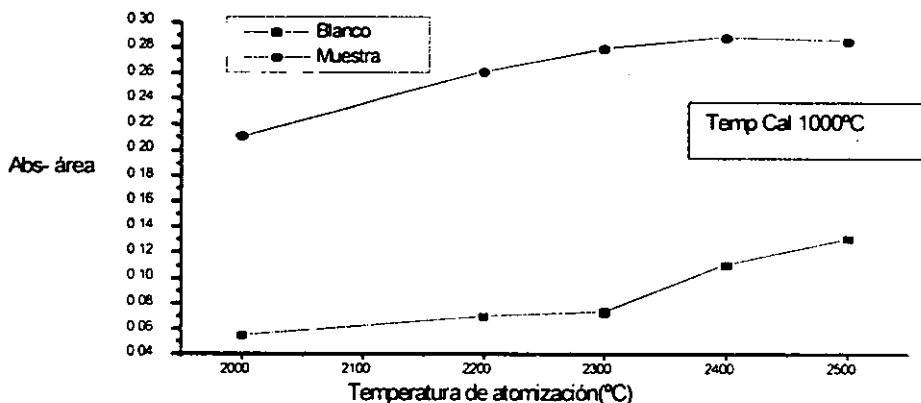


Figura 19 Concentración de una misma muestra (con su blanco) en función de la temperatura de atomización.

Los resultados se reportan en Abs-área de la muestra. Se realizan determinaciones por triplicado en cada punto del blanco y de la muestra .

De la figura 19 se obtiene que del valor Abs-área, más cercano a la concentración esperada se encuentra alrededor de los 2200°C-2300°C, siendo la primera la que presenta menor RSD, es decir, mayor precisión.

6.7.3 Ensayos para determinar el volumen de modificador de matriz a agregar.

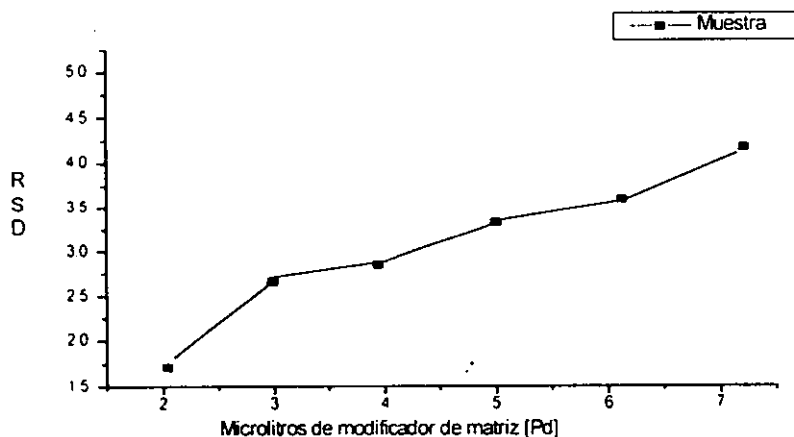


Figura 20 RSD en función de la cantidad de modificador de matriz agregado, el valor reportado ya tenía restado el blanco .

Se realizan determinaciones por triplicado en cada caso y el RSD manejado es el obtenido tras las tres lecturas de Abs - área.

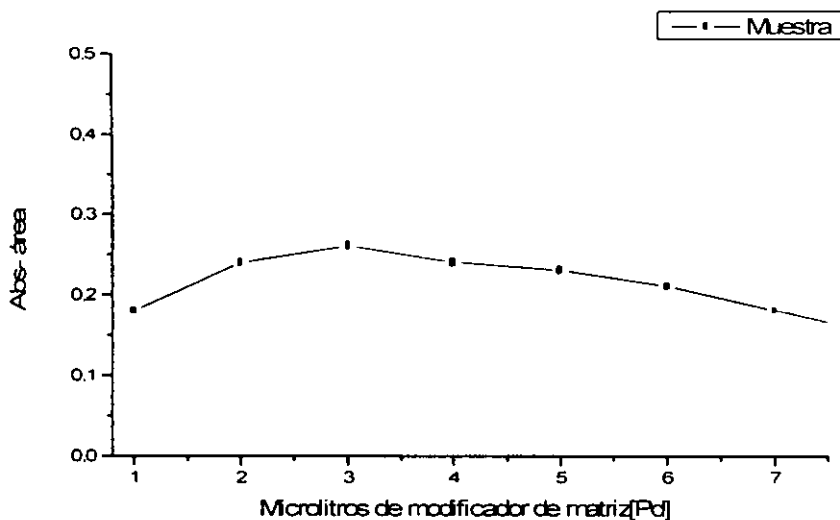


Figura 21 Comportamiento del valor de Abs-área con respecto a la cantidad de modificador agregado (microlitros), ya restado el blanco.

Se realizan determinaciones por triplicado en cada caso de Abs-área tanto del blanco como de la muestra.

Para determinar el volumen de modificador de matriz óptimo se realizan ensayos similares a los anteriores de los cuales se obtiene lo siguiente:

El RSD más bajo obtenido en la figura 20 es el presentado al agregar 2 y 4 microlitros de modificador de matriz, mientras que por su lado, las concentraciones obtenidas de la respuesta Abs-área al agregar modificador (figura 21), son cercanas a la esperada al agregar 2,4 y 5 microlitros. Sin embargo se considera más conveniente de acuerdo a trabajos anteriormente realizados en este laboratorio y en base a la literatura^{2,46} la utilización de menos cantidad de modificador, además de que se pueden obtener resultados aceptables con 2 microlitros de modificador de matriz de Paladio reducido.

6.7.4 Ensayos para determinar la influencia de la optimización de los parámetros anteriores en el análisis de las muestras biológicas.

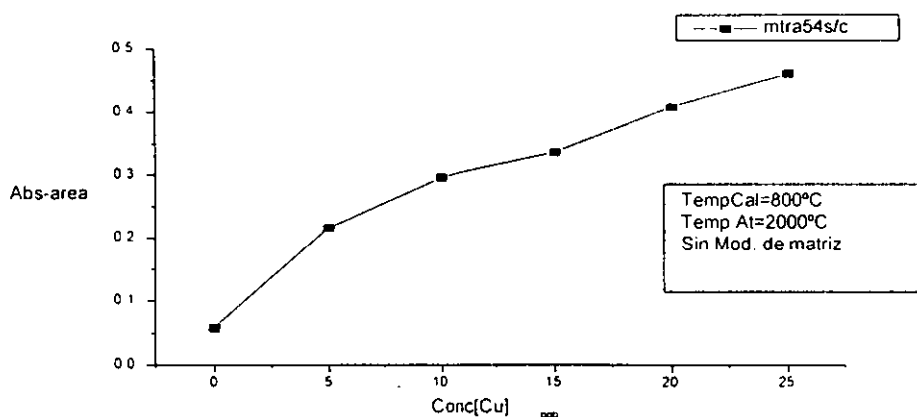


Figura 22 Curva de lecturas realizadas antes de ajustar condiciones óptimas de lectura por horno de grafito

Los resultados se reportan en ppb de concentración de la muestra. Se realizan determinaciones por triplicado en cada punto del blanco y de la muestra, sólo se reporta el valor ya restado el blanco respectivo.

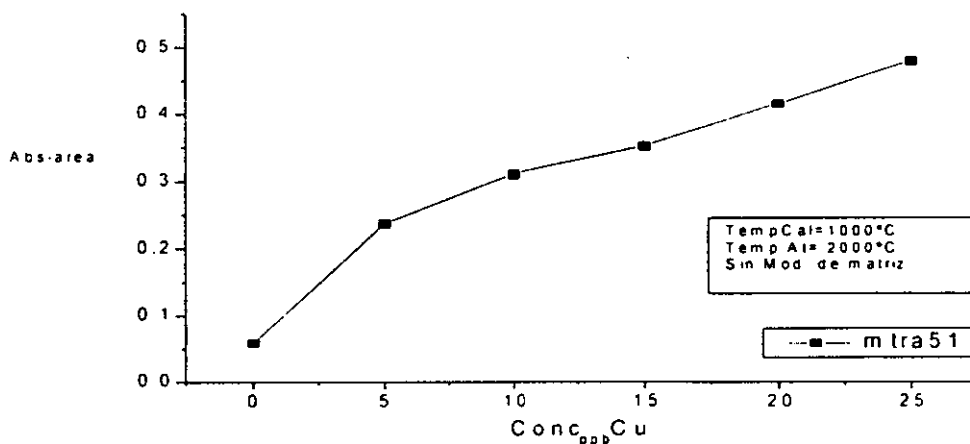


Figura 23 Ejemplo 2 de curva realizada con condiciones no óptimas del proceso .

Los resultados se reportan en ppb de concentración de la muestra. Se realizan determinaciones por triplicado en cada punto del blanco y de la muestra, sólo se reporta el valor ya restado el blanco respectivo.

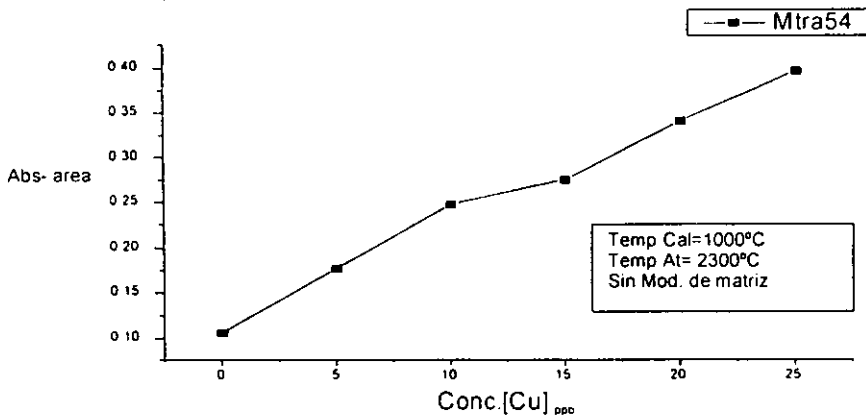


Figura 24 Curva de la muestra anterior realizando ajusten en temperatura de calcinación y atomización.

Los resultados se reportan en ppb de concentración de la muestra. Se realizan determinaciones por triplicado en cada punto del blanco y de la muestra, sólo se reporta el valor ya restado el blanco respectivo.

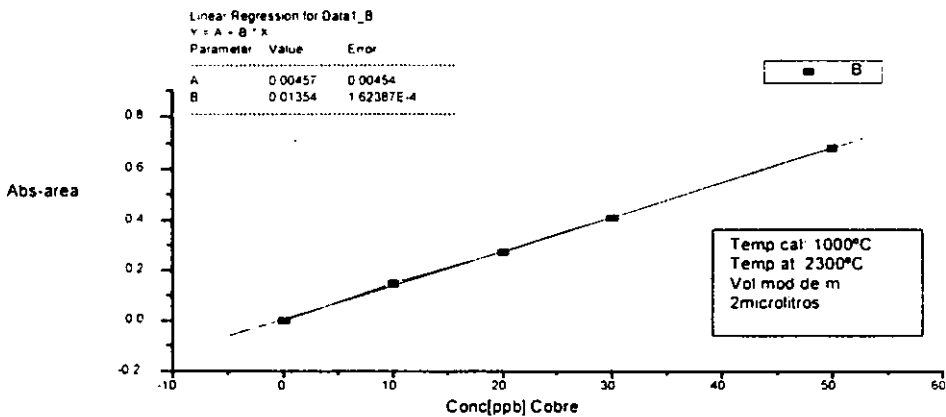


Figura 25 Curva de la muestra anterior realizando ajusten en temperatura de calcinación, atomización y concentración de modificador de matriz.

Los resultados se reportan en ppb de concentración de la muestra. Se realizan determinaciones por triplicado en cada punto del blanco y de la muestra .

En las figuras 22 y 23 se muestra un ejemplo del comportamiento no lineal de las muestras antes de tener optimizado el método de análisis, lo que nos da

oportunidad de observar que la influencia del efecto matriz es notorio e importante para el análisis.

En las figuras 24 y 25 se muestra el cambio de comportamiento del analito al ir ajustando los parámetros que afectan la lectura (Temperatura de atomización, Temperatura de calcinación y concentración de modificador de matriz), hasta obtener una respuesta lineal, es decir, se trata de reducir el efecto matriz a tal grado que no interfiera en la determinación instrumental del analito en cuestión.

VII CONCLUSIONES

Basándose en la experiencia adquirida se puede decir que algunas de las variables que pueden influir en una determinación analítica de metales traza son: la contaminación causada por reactivos o por el material contenedor (Que el material este mal lavado), la pérdida de los elementos causada por la adsorción o reacción con las paredes del material contenedor, o bien las pérdidas por la volatilización de los elementos susceptibles a este proceso.

Otras variables importantes son: tipo de muestra (si la muestra se obtiene o no de un ser vivo), el tipo de material con el que se obtienen las muestras, la forma de almacenamiento y preservación de las mismas, el tipo de metales a analizar en la muestra, la naturaleza y concentración del oxidante u oxidantes a utilizar, el tiempo requerido para el proceso, el tipo de ataque utilizado (en el caso de microondas, la temperatura y presión) y la técnica analítica de análisis instrumental.

Todas las variables anteriores son aquellas que más comúnmente se pueden evaluar en un diseño de experimentos, de tal forma que el estudio se torna un complejo y laborioso, lo cual justifica de forma evidente la importancia del diseño factorial y de la utilización de técnicas de digestión y lectura más sencillas, que sean reproducibles, exactas, rápidas y económicas de preferencia.

Acerca del aporte de este trabajo se tiene que:

En el proceso de secado es conveniente el utilizar una temperatura de 100 ± 5 °C ya que después de 24 h se tiene prácticamente todo el tejido a peso constante (si el peso del tejido es menor de los 40g), es de esperarse que con tejidos muy grandes el tiempo de secado aumente.

En el proceso de molido se asegura que la superficie de ataque sea mayor que la presentada si el tejido estuviese sin moler, en el caso de las muestras

trabajadas se considera un tiempo idóneo de tres minutos aproximadamente, usando el mólino mecánico.

Para el proceso de digestión abierta con ácido nítrico concentrado se pudo determinar que las variables como son el tiempo y el volumen del ácido nítrico, afectan la respuesta y que en ocasiones ese efecto es alternado.

Se constató que para cada tejido y en cada elemento se observa un comportamiento diferente, es decir, a pesar de que los tres elementos están contenidos en la misma matriz biológica se comportan diferente al variar las condiciones de experimentación, lo que dificulta de alguna manera la puesta a punto del método de análisis.

En el caso del hígado certificado la cantidad recuperada de Hierro y Cobre aumenta al aumentar tanto el tiempo como el volumen del ácido nítrico, mientras para el Zn se observan tendencias diferentes ya que se disminuye su recuperación al aumentar el volumen y el tiempo de digestión.

Se observan valores de concentración relativamente bajos para el cobre, mientras que para los otros dos elementos el valor es más cercano al valor certificado, aunque en los tres casos se está dentro del intervalo de confianza.

Mediante el uso del programa Statgraphics se obtiene que para el caso del riñón no existe una hipérbola en donde se obtengan los valores reportados para el cobre, por ello se considera que no son factibles de alcanzar los valores reportados en las condiciones que se está trabajando y que la hipérbola que describe las condiciones en donde se podría alcanzar un valor más cercano es aquella que pasa entre los intervalos: de 3.6ml - 4.0ml con un tiempo de 15-18 minutos (el valor esperado se encontrará alrededor de los 29ppm).

Para el caso del hierro en riñón sucede algo similar ya que se obtendrá una respuesta máxima de 270.8 ppm con unas condiciones de 2.0 - 2.2ml con un tiempo de 15-17 minutos, mientras que para el zinc el comportamiento es diferente obteniendo una hipérbola que describe condiciones para alcanzar el valor certificado (se puede obtener con un volumen de ácido de 2.8-3.6 ml., con

un tiempo de 15-35 min.). Se comprobaron dichas predicciones realizando el experimento con un volumen de 3.6ml de ácido nítrico concentrado y un tiempo de 25 minutos observando valores nuevamente cercanos a los esperados (tabla18).

Para el músculo de bovino se presentan hipérbolas que tienen valores cercanos al valor certificado (2.0-2.3ml de ácido nítrico con un tiempo de 32-35min), pero los valores máximos de respuesta son de 164ppm para el Zn lo cual esta por debajo del reportado, y para el Hierro las condiciones óptimas se describen con la hipérbola que pasa por las condiciones de 3.0- 4.0 ml. con un tiempo de 15 a 25 minutos.

Las ventajas de la técnica de digestión abierta son:

- a) Es una técnica fácil.
- b) Rápida
- c) No requiere material adicional
- d) No requiere de grandes inversiones
- e) No representa peligro como en el caso de la digestión de microondas al digerir muestras relativamente grandes
- f) Es reproducible
- g) Se obtienen valores similares a los reportados

Los inconvenientes que se presentan son:

- a) Se deben realizar un mayor número de réplicas para acercarse al valor real debido a que la desviación que se presenta entre diferentes muestras es mayor que la presentada por resultados obtenidos tras la digestión de microondas.

b) Se debe tener extremo cuidado con el material y reactivos a utilizar para evitar contaminaciones

Por su parte, los resultados del proceso de **digestión por microondas** indican que en el intervalo de concentraciones que se está manejando y en las condiciones de trabajo experimental, los valores de concentración obtenidos mediante este tipo de digestión son sistemáticamente más bajos que los obtenidos en digestión abierta, y por tanto cuando se trabaja con estándares certificados de hígado, riñón y músculo no se alcanzan los valores reportados sin importar cuales variaciones se efectúen en el tratamiento.

Las ventajas que se obtienen de la digestión por microondas son:

- 1) Pese al error sistemático una vez estandarizado el proceso de digestión éste es muy preciso (reproducibile).
- 2) Evita la pérdida del analito por volatilización.
- 3) Requiere de un mínimo de manipulación.

Entre las desventajas se encuentra:

- 1) Si no se poseen aditamentos adicionales como sensores de temperatura y presión, es sumamente complicado el optimizar el proceso de digestión.
- 2) Se debe evaluar la utilización de los recipientes de Teflon y su efecto memoria.
- 3) Se requiere de mayor inversión para realizar el estudio.
- 4) Se gasta gran volumen de agua para el proceso de enfriado.
- 5) El proceso de enfriado es lento.

Por consiguiente, la técnica de microondas requiere de un minucioso análisis de cada parámetro que interviene en el proceso de digestión, tales

como las partes mecánicas y eléctricas, programa utilizado, volumen y tipo de los oxidantes, potencia de calentamiento, y tiempo de cada uno de los pasos. Por último es importante señalar que por la forma en que los equipos han sido diseñados tradicionalmente, el control de muchos de estos parámetros sólo se puede hacer de manera empírica, lo cual conlleva demasiado tiempo y gasto económico. Cabe mencionar que los hornos actuales poseen sensores especiales de presión y temperatura dentro de los viales donde se realiza el proceso de digestión, además de contar con un equipo de cómputo lo cual permite el mejor monitoreo del proceso

Sólo resta decir que ampliando los alcances de este trabajo podría utilizarse este método de digestión para análisis de rutina, claro esta que, se tendrían que hacer otros análisis que por el momento no se contemplaron.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Gelinás Yves, Youla Massayon, Beliveau Richard, Schmit Jean Pierre, "Multielement Analysis of Biological Tissues by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, Healthy Sprague Dawley Rats", *Anal. Chim. Acta.* 1992, 269(1), 115-22.
- 2.- Subramaniam Kunneeth, "Determination of trace Metals in Blood by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry: Recent Studies", *Atomic Spectroscopy*, Vol 9 , Nº5 Sep-Oct 1988.
- 3.- Müller Er Ku Pk "Zinc Deficiency and Tissue Nucleic Acid and Protein Concentration", 1970, Mills E&Slivingsstone Edinburgh.
- 4.- Miller Wj, Pate Em, "Zinc Metabolism In Ruminants". 1970. Mills E&Slivingsstone Edinburgh
- 5.- Merck Sharp & Dohme International, "El Manual Merck de Diagnostico y Terapéutica" , Merck Sharp & Dohme Research Laboratories, Rahway, NJ. 1978.
- 6.- Grassmann E & Kirchgessner M , "The Dynamics of Copper Absorption", 1970, Mills E&Slivingsstone Edinburgh.
- 7.- Hartmans J, "The Detection of Copper Deficiency and Other Trace Element Deficiencies Under Field Conditions". 1970, Mills E&Slivingsstone Edinburgh.
- 8.- Howell J Mcc, "Infertility Associated With Experimental Copper Deficiency In Sheep, Guinea Pigs And Rats". 1970, Mills E&Slivingsstone Edinburgh.
- 9.- Reinhold JG, Pascoe Enid, "Zinc Concentrations and Enzyme Activities of Rat Tissues During the Initial Stages of Zinc Depletion", 1970, Mills E&Slivingsstone Edinburgh
- 10.- Mills E,Cf, & S, "The Trace Element Metabolism in Animals, Clinical Effects of Deficiency and Excess". Livingstone Edinburgh, 1970.
- 11.- Jankowski Maragret A, Uriu Hare Janet, "Maternal Zinc Deficiency, But Not Copper Deficiency or Diabetes, Results in Increased Embryonic Cell Death In The Rat", *Teratology* 51:85-93 (1995).
- 12.- Kingston Hm, Jassie Lb. "Microwave Energy for Acid Decomposition at Elevated Temperatures and Pressures Using Biological and Botanical Samples", *Anal. Chem.* 1986, 58, 2534-2541.
- 13.- Luecke R W, Bruna E, "The Zinc Content of Blood Serum and Bone as Indices of Dietary Zinc Adequacy in the Rat". 1970, Mills E&Slivingsstone Edinburgh
- 14.- Pories Walter J. Strain William H, "The Functional Role of Zinc in Epidermal Tissues". 1970, Mills E&Slivingsstone Edinburgh
- 15.- Schmit Jean Pierre, Youla Massayon And Gelinás Yves, "Multielement Analysis of Biological Tissues by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry". *Anal. Chim. Acta* , 249 (1991) 495-501.

- 16.- Schoenemann Herman M, Failla Mark L, "Cardiac and Splenic Levels of Norepinephrine and Dopamine in Copper Deficient Pigs and Rats", *Comp. Biochem. Physiol*, Vol 97c, N^o 2, Pp 387-391, 1990.
- 17.- Seidel Karen, Failla Mark L, Cardiac "Catecholamine Metabolism in Copper Deficient Rats", *Mínerals and Trace Elements 1991 American Institute of Nutrition*.
- 18.- Sourke T L , "Factors Affecting the Concentration of Copper in the Liver of the Rat", 1970, Mills E&Slivingsstone Edinburgh
- 19.- Trace Element Metabolism in Animals, 1970, Mills E & Slivingsstone Edinburgh
- 20.- Rosenstein Emilio Ster., "Diccionario de Especialidades en Análisis Clínicos", PLM Publicaciones 9^o Edición México 1995.
- 21.- Murray J Stein Nell, "Gastric Secretions and Iron Absortion in Rats", 1970, Mills E&Slivingsstone Edinburgh
- 22.- Application Note, ICP Spectrometry, "ICP Applied to Analysis of Trace Elements in Serum, Blood or Urine, With The JY 138 Ultrace."
- 23.- Baldwin S, Deaker M, Maher W, "Low Volume Microwave Digestion of Marine Biological Tissues for the Measurement of Trace Elements", *Analyst(Uk)*, 1994. 119(8), 1701-4.
- 24.- Asp T N, Lund W, "Elemental Analysis of Bovine Liver By Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry by Using a Simple Dissolution Procedure", *Talanta*, Vol 39, N^o5, 563-566, 1992.
- 25.- Ballinas Casarrubias María de Lourdes, Tesis "Evaluación de Paladio como Modificador de Matriz en el Análisis de Arsénico en Muestras Acuosas Mediante Espectrometría de Absorción Atómica Electrotérmica y Espectrometría de Masas con Plasma Inductivamente Acoplado como Fuente de Ionización", *Fac de Química UNAM, México DF, Mayo de 1996.* (Asesor : Josefina de Gyves M.)
- 26.- Chappuis Philippe, Poupon Joel & Rousselet, "A Sequential and Simple Determination of Zinc, Copper and Aluminium in Blood Samples by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry", *Clínica Química Acta*, 206 (1992) 155-165.
- 27.- Halls David J, "Analytical Minimalism Applied to the Determination of Trace Elements by Atomic Spectrometry", *JAAS*, March 1995, Vol 10, 169-175.
- 28.- US Environmental Protection Agency (EPA) "Methods for the Determination of Metals in Environmental Samples", *Laboratory, Environmental Monitoring Systems Office of Research and Development, Cincinnati, Ohio*
- 29.-Niazi, Shaida B, Littlejohn David, Halls David J, "Rapid Partial Digestion of Biological Tissues with Nitric Acid for the Determination of Trace Elements by Atomic Spectrometry", *Analyst* 1993, 118(7), 821-5.
- 30.- Que Hee Shane, And Boyle James R, "Simultaneous Multi elemental Analysis of Some Environment and Biological Samples by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry", *Anal. Chem.* 1988, 60, 1033-1042.

- 31.- Locke J, "The Application of Plasma Source Atomic Emission Spectrometry In Forensic Science", *Anal. Chim. Acta*, 113 (1980), 3-12.
- 32.- Van Wyck David B, Schifman Ron B, Ruiz Joaquín, "Rapid Sample Preparation for Determination of Iron in Tissue by Closed Vessel Digestion and Microwave Energy", *Clin. Chem.* 34/6, 1128-1130 (1988).
- 33.- Manning Thomas J, Grow William, "Inductively Atomic Emission Spectrometry", *The Chemical Educator*, 1997 Springer Verlag New York Inc.
- 34.- Bersier Pierre M, Howell Jonathon, Tutorial Review, "Advanced Electroanalytical Techniques Versus Atomic Absorption Spectrometry, Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry in Environmental Analysis", *Analyst*, February 1994, Vol 119.
- 35.- Barnes Ramon M, "Determination of Trace Elements in Biological Materials by Inductively Coupled Plasma Spectroscopy with Novel Chelating Resins", *Biological Trace Element Research*, 6, 93-103 (1984).
- 36.- De Boer JLM, Maessen JMJ, "A Comparative Examination of Sample Treatment Procedures for ICAP-AES Analysis of Biological Tissue", *Spectrochimica Acta*, Vol 38B, No5/6, 739-746, 1983.
- 37.- Uchida Tetsuo, Isoyama Hirofumi, "Determination of Twelve Elements in Botanical Samples with Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry After Leaching with Tetramethylammonium Hydroxide and Ethylenediaminetetraacetic Acid", *Analytica Chi. Acta.* 256(1992) 277-284.
- 38.- Fassel Velmer A, Quantitative "Elemental Analyses By Plasma Emission Spectroscopy", *Science* Vol 202, 13 October 1978.
- 39.- Fassel Velmer & Kniseley Richardn, "Inductively Coupled Plasma, Optical Emission Spectroscopy", *Anal. Chem.*, Vol 46, N°13, November 1974.
- 40.- Skoog A Douglas, West Donald M, "Análisis Instrumental". Segunda Edición, Editorial Interamericana, México DF 1986.
- 41.- Castellan Gilbert W, "Físico-Química" 2ª Edición, Addison Wesley Iberoamericana, USA 1987.
- 42.- Martínez Padilla Kira, Tesis "Influencia de Algunos Modificadores de Matriz Sobre la Señal Atómica de Ga(III) y Ge(IV) en Matrices Complejas en Espectrometría de Absorción Atómica Electrotérmica", *Fac de Química UNAM, México DF*, Mayo de 1995.(Asesor : Josefina de Gyves M.)
- 43.- Faires Linda M, "Inductively Coupled Plasma: Principles and Horizons", *Analyst*, November 1982.
- 44.- Skoog A Douglas, West Donald M, "Química Analítica", Cuarta Edición, Mcgraw- Hill, México 1994
- 45.- Willard, LL. Merrit Jr, "Métodos Instrumentales de Análisis". Grupo Editorial Iberoamericana. 1ª Edición en español. 1991.

- 46.- Viñas Pilar, Campillo Natalia, Lopéz Ignacio, Hernández Manuel, "Slurry Electrothermal Atomic Absorption Spectrometric Methods for The Determination of Copper, Lead, Zinc, Iron and Chromium In Sweets and Chewing Gum After Partial Dry Ashing", *Analyst*, June 1994, Vol 119.
- 47.- Webb John, Niedemeier Williams, Griggs James H, James Thomas E, "Emission Spectrometric Determination of Trace Metals in Biological Tissues", *Appl. Spectrosc.* 1973, 27(5), 342-7.
- 48.- Soares Maria E, Ferreira Margarita, Bastos Maria, "Determination of Arsenic, Cadmium And Lead in Porcine and Bovine Kidneys By Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry", *Analyst*, September 1995, Vol 120.
- 49.- Box Goerge, Hunter William G, Hunter Stuart J, "Estadística Para Investigadores, Introducción al Diseño de Experimentos, Análisis de Datos y Construcción de Modelos". Editorial Reverte SA Barcelona España 1988.
- 50.- Cuaderno de Seminario de Validación en la Industria Farmacéutica, Asociación Farmacéutica Mexicana Mayo de 1994
- 51.- Miller JC, Miller JN "Estadísticas Para Química Analítica", 2º Edición , Addison Wesley Iberoamericana, Delaware, EUA 1993.
- 52.- Remington's, "Pharmaceuticals Sciences", Mack Publishing Company, Easton Pennsylvania 1980.
- 53.- Massart Desiré L., Dijkstra Auke, Kaufman Leonard, "Evaluation and Optimization of Laboratory Methods and Analytical Procedures", A Survey of Statistical and Mathematical Techniques, Elsevier Scientific Publishing Company Amsterdam- Oxford 1978.
- 54.- Lachman Leon, Lieberman, Kanig, "The Theory and Practice of Industrial Pharmacy", Lea Febigen Philadelphia 1986.
- 55.- Luterotti Sjetlana, Zanic Grubisic And Juretic Dubravka, "Rapid Simple Method for the Determination of Copper, Manganese and Zinc in Rat Liver by Direct Flame Atomic Absorption Spectrometry", *Analyst*, February 1992, Vol 117, 141-143.
- 56.- Dybczynski Rajmund, "The Contribution of Various Analytical Techniques to the Certification of Reference Materials", *Fresenius J Anal Chem* (1995) 352: 120-124.
- 57.-Burguera M, Buegera J, Alarcon Om, "Determination of Zinc and Cadmium in Small Amounts of Biological Tissues By Microwave-Assisted Digestion and Flow-Injection Atomic Absorption Spectrometry", *Anal. Chim. Acta* 1988, 214(1-2), 421-7.
- 58.- Subramanian Ks *Prog. Anal.Spectrosc.*,9, 237 (1986).

Índice de materias

A	
<i>aislación térmica</i>	27
albinismo	11
Algoritmo de Yates.....	41
<i>atomización</i>	22
Atomización y ionización del analito	30
C	
cobre	
generalidades sobre	7
D	
deficiencias de Zinc	9
digestión convencional	15
digestión parcial.....	15
digestión por microondas	16
diseño de experimentos.....	38
Diseño de experimentos	36
diseño factorial	39
E	
El horno	34
Electrotérmica.....	33
emisión atómica	25
Errores	37
errores aleatorios	37
espectrometría atómica	21
Espectrómetro secuencial	47
espectroscópicas	25
estado homeostático	7
ETAAS	33
F	
fuelle acoplada	31

fuerate ideal de atomización	23
<i>H</i>	
hemocromatosis	14
hidróxido de tetrametil amonio.....	16
hierro	7
<i>I</i>	
interferencias	31
<i>J</i>	
Jurado asignado:	2
<i>L</i>	
los estándares	49
<i>M</i>	
Material.....	48
métodos de digestión	15
<i>N</i>	
nebulizador	28
<i>O</i>	
oligoelementos	7
<i>P</i>	
plasma inductivamente acoplado.....	26
pretratamiento.....	34
<i>R</i>	
radio frecuencia	27
<i>S</i>	
síndrome del pelo rizado de Menke	12
sistemáticos.....	37
Statgraphics	43

T	
Tubo de grafito	34
U	
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO	1
V	
variables de tipo físico.....	33
Z	
zinc	7
zona analítica	27