



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**CUANTIFICACIÓN DE COBRE Y ZINC EN MATRICES
BIOLÓGICAS MEDIANTE ICP-MS.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA

PRESENTA:

HEBE GARCÍA GARCÍA



MEXICO, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. Liliana Virginia Raquel Saldívar y Osorio

VOCAL: M. en C. Francisco Rojo Callejas

SECRETARIO: Q.F.B. María Guadalupe Espejel Maya

1^{er} SUPLENTE: Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero

2^o SUPLENTE: M. en C. Elba Rojas Escudero

EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLÓ EN EL LABORATORIO 103 DE ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA (LEAA), DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA: _____

DRA. LILIANA VIRGINIA RAQUEL SALDÍVAR Y OSORIO

SUSTENTANTE: _____

HEBE GARCÍA GARCÍA

**AGRADECIMIENTOS:**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, por haber permitido que en sus aulas me formara profesionalmente.

A la Facultad de Química, UNAM, por haberme abierto sus puertas para realizar mis estudios profesionales. Estaré eternamente agradecida por eso, y feliz de que no le fallé.

A la Doctora Liliana Saldivar y Osorio, por haberme dado su tiempo, paciencia y ayuda. Sin su apoyo nunca habría logrado terminar esta tesis. Siempre estaré infinitamente agradecida con usted.

A mí jurado la Doctora Liliana Virginia Raquel Saldivar y Osorio, el Maestro en Ciencias Francisco Rojo Callejas y la Q.F.B. María Guadalupe Espejel Maya, por su valioso tiempo en la revisión y corrección de este trabajo. Gracias por su paciencia y aportaciones académicas.

A la Doctora María Teresa de Jesús Rodríguez Salazar, por su apoyo en la realización de este trabajo.

A la Q.F.B. Guadalupe Espejel, porque además de brindarme su asesoría técnica y académica, me dio su amistad. Siempre estaré agradecida por tu tiempo, apoyo y cariño Lupita, te quiero mucho.

A todos los profesores que tuve a lo largo de la carrera, por haberme brindado su tiempo y conocimientos.

A mi compañero de trabajo en el laboratorio 103, Rafael León Zárate, por toda su ayuda, paciencia, explicaciones, tiempo y amistad. Gracias por salvarme tantas veces. Sin ti no habría podido concluir esta tesis. Te admiro mucho y espero que te vaya muy bien siempre.

A mis demás compañeros del laboratorio 103: Berenice, Laura y Juan Alberto.

Al Proyecto PAPIIT IN 229911, por el financiamiento en la realización de este trabajo.

**DEDICATORIAS:**

A mis padres Ariadna C. García Roldán y Antonio García Estrada, porque todo se los debo a ustedes. Gracias por darme la vida y la oportunidad de crecer y superarme día con día. Los amo más que a nada en el mundo y esta tesis, aunque tarde, se las dedico como una forma de demostrarles lo infinitamente agradecida que estoy con ustedes, por ser los papás más increíbles y maravillosos del mundo.

A ti, Leonel Galicia Rosas, mi niñito lindo. Gracias por estar conmigo apoyándome, echándome porras y animándome en cada instante. Tu amistad, cariño, comprensión, paciencia, confianza, dulzura, honestidad, compañía, aliento, apoyo, tiempo y amor los llevo muy dentro de mi corazón. Eres el impulso de mi vida, mis sueños y esperanzas; y la mejor parte de haber estado en esta maravillosa facultad. Te amo con toda el alma mi Leónidas y espero siempre estar a tu lado. Besos Muchos!!! ♥ ♥ ♥

A mi hermano Ismael García, sabes que te quiero muchísimo y que siempre vas a contar conmigo para lo que necesites.

A mi Abue hermosa y preciosa, Ma. del Socorro Estrada J., por ser un gran ejemplo de vida. Te adoro muchísimo y espero algún día ser tan fantástica como tú. Siempre te voy a llevar en mi corazón abuelita linda.

A mi abuelito Antonio García G.; me hubiera encantado tener la dicha de conocerte. Gracias por haberme dado al papá más maravilloso del mundo.

A mis abuelitos maternos Ma. del Refugio Roldán y Leobardo García, por ser tan lindos y buenos conmigo siempre, los quiero y adoro muchísimo.

A mis tíos paternos, Rafael, Gerardo, Aída y Socorro. Gracias por estar siempre a mi lado brindándome su ejemplo, cariño y apoyo. Los quiero y admiro.



A mis primos paternos, Rodrigo, Letty, Armando, Alonso, Andrea y Emilio. Los quiero, admiro y adoro. Gracias por ser parte de mi vida. A mis tíos y primos maternos, Leobardo, Lupita, Adrián, Gema, Eve, Marco, Rubén, Lorena, Jorge Alberto, Adrián, Brandon y Diana.

A mis amigas Mirna y Laura, porque ustedes fueron las primeras amigas que tuve en esta facultad y siempre me brindaron su cariño y amistad desinteresadamente. Las quiero mucho y siempre recordaré los grandes momentos que tuvimos.

A mi amigo Raúl Orduña, por ser siempre tan chido conmigo. Gracias por tu amistad, apoyo y cariño. Te quiero y admiro mucho mucho mucho. Espero que siempre conservemos esta linda amistad.

A mi amiga arqueóloga Rocío Hernández, gracias por tu ayuda, cariño y consejos. Te quiero mucho y espero pronto ir también a tu titulación.

Al Doctor Luis Barba y al Maestro Agustín Ortiz, del Instituto de Investigaciones Antropológicas. Gracias por su tiempo y ayuda. Nos estaremos viendo pronto para comenzar nuevos proyectos.

A mis compañeras y amigas de esta nueva carrera de arqueología que he comenzado en la ENAH, Valentina Valiente y Kenya Díaz. Manas, las quiero muchototote, gracias por escucharme, ayudarme y brindarme su cariño siempre (son mis soles en el cenit!!!, jaja :P). Sin ustedes tampoco hubiera logrado terminar esta tesis. Espero que seamos muy buenas amigas siempre.

A todos mis amigos de la ENAH, principalmente Andrea, Haydée, Liliana, Alejandro, Nocel, Manuel, Carmen, Martha y Eder.



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	5
2.1. Objetivos generales	5
2.2. Objetivos particulares	5
3. ANTECEDENTES	7
3.1. Oligoelementos	7
3.2. Cobre	8
3.2.1. Propiedades físicas	8
3.2.2. Rol Biológico	9
3.2.3. Metabolismo	9
3.2.4. Enzimas	10
3.2.5. Fuentes	11
3.2.6. Ingesta recomendada	11
3.2.7. Interacción con micronutrientes	12
3.2.8. Deficiencia	12
3.2.9. Toxicidad	13
3.3. Zinc	14
3.3.1. Propiedades físicas	14
3.3.2. Rol biológico	14
3.3.3. Metabolismo	15
3.3.4. Enzimas	16
3.3.5. Fuentes	16
3.3.6. Ingesta recomendada	17
3.3.7. Interacción con micronutrientes	17
3.3.8. Deficiencia	17
3.3.9. Toxicidad	18
3.4. Interacción entre Cu y Zn	18
3.5. Fundamento del trabajo	19
3.6. Ratón: modelo biológico	20



3.7. Manganeso	26
3.8. Vanadio	28
3.9. Espectrometría de masas	31
3.9.1. Fundamento teórico de la espectrometría de masas	31
3.9.2. Funcionamiento general	32
3.10. Espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS)	33
3.10.1. Componentes de un equipo de ICP-MS	35
3.10.2. Problemas en la determinación de metales traza por ICP-MS	50
3.10.3. Preparación de muestra	55
3.11. Precauciones para el análisis elemental a niveles traza	58
3.12. Evaluación de un método analítico	59
3.12.1. Parámetros de desempeño	60
3.13. Método del estándar interno (E.I.)	65
4. EXPERIMENTACIÓN	67
4.1. Equipos e instrumentos	67
4.2. Reactivos y soluciones	67
4.3. Material	68
4.4. Procedimiento experimental general	69
4.4.1. Lavado de material	69
4.4.2. Tratamiento del material de referencia certificado (MRC) y de las muestras	70
4.4.3. Diluciones gravimétricas	73
4.4.4. Curva de calibración	75
4.4.5. Condiciones analíticas	76
4.4.6. Uso del ICP-MS	81
4.4.7. Tratamiento de datos	83
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	84
5.1. Condiciones instrumentales de análisis	84
5.2. Optimización de la metodología analítica	85
5.2.1. Curvas de calibración	86



5.2.2. Concentración de analitos en el MRC con los diferentes E.I. y su porcentaje de error relativo (%ER)	93
5.2.3. Elección de los isótopos analitos y E.I.	96
5.3. Parámetros de desempeño	98
5.3.1. Límite de detección y límite de cuantificación	98
5.3.2. Intervalo lineal	101
5.3.3. Intervalo de trabajo	105
5.3.4. Recuperación	105
5.3.5. Selectividad	107
5.3.6. Exactitud	108
5.3.7. Precisión	109
5.3.8. Sensibilidad	111
5.3.9. Robustez	113
5.3.10. Deriva instrumental	116
5.3.11. Resumen de los parámetros de desempeño	119
5.4. Aplicación del método analítico desarrollado a muestras reales	120
5.4.1. Concentraciones de analitos obtenidas y su relación en las diferentes muestras	121
5.4.2. Comportamiento de los analitos con respecto a las inhalaciones de Mn-V	131
6. CONCLUSIONES	140
7. BIBLIOGRAFÍA	145
8. ANEXOS	153
8.1. Certificado del MRC Hígado de bovino 1577c National Institute of Standards & Technology (NIST)	153
8.2. Curvas de secado de las muestras	158
8.3. Programas de digestión para los hornos de microondas	161
8.4. Procedimiento para el uso del equipo de ICP-MS	162
8.5. Cálculo de la concentración de analitos en el MRC y en las muestras	164
8.6. Certificado del MRC Hígado de bovino lote#529004 High Purity Standards (HPS)	169



1. INTRODUCCIÓN

El cuerpo humano tiene un elaborado sistema de administración y regulación de la cantidad de metales traza esenciales que circulan en la sangre y se almacenan en las células. Los nutrientes metálicos de nuestra dieta son incorporados a la sangre si los niveles en ésta son bajos; son transportados a las células si los niveles celulares no son los adecuados; y son excretados si tanto en la sangre como a nivel celular son suficientes o se encuentran en exceso. Cuando este sistema no funciona correctamente se pueden desarrollar niveles y proporciones anormales de metales traza. (Osredkar y Sustar, 2011).

Uno de los equilibrios de metales traza más comunes, es el que se presenta entre el cobre y el zinc; ya que la relación entre sus proporciones se considera clínicamente más importante dentro del cuerpo humano, que la concentración de cada uno de ellos por separado (Osredkar y Sustar, 2011).

El zinc es el segundo metal de transición más abundante en el cuerpo humano después del hierro y es el único metal que aparece en todas las clases de enzimas. Está involucrado en numerosos aspectos del metabolismo celular, se requiere para la actividad catalítica de más de 200 enzimas y juega un importante papel en la función inmune, la curación de heridas, la división celular y la síntesis de proteínas y ADN (Osredkar y Sustar, 2011).

El cobre es el tercer metal traza más abundante en el cuerpo humano, es parte integral de múltiples sistemas enzimáticos e interviene en el metabolismo de hierro, en la síntesis de melanina, en la generación de energía, en la síntesis de neurotransmisores y en la función



del sistema nervioso central (SNC); también interviene en la síntesis y los enlaces cruzados de elastina y colágeno y la eliminación de radicales superóxido (Osredkar y Sustar, 2011).

El manganeso es un nutriente esencial de gran importancia, ya que participa en las reacciones bioquímicas de varias enzimas, juega un importante rol en el metabolismo del hierro y es requerido para el funcionamiento adecuado del cerebro, entre otras muchas funciones. Pero cuando se encuentra en niveles elevados, puede producir efectos neurológicos tóxicos que causan una serie de síntomas, entre los que se encuentran debilidad y fatiga muscular, sialorrea, cefaleas, reducción de la coordinación, alucinaciones e irritabilidad mental, dando finalmente lugar, a la enfermedad llamada manganismo. La inhalación es la vía principal de toxicidad, relacionada directamente con trabajadores de industrias donde se interactúa con este metal y la población aledaña a estos lugares (Michalke y Fernsebner, 2014).

El Vanadio es un metal ampliamente distribuido tanto en la naturaleza como en los sistemas biológicos y es uno de los elementos traza presente en los combustibles fósiles (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006), por lo que la principal fuente de exposición para los humanos, es la contaminación atmosférica producida por la quema de estos materiales. Se ha determinado que algunos compuestos de V funcionan como agentes que disminuyen los niveles séricos de glucosa, como antihipertensivos, anorexígenos y anticancerígenos. La toxicidad en los humanos produce, por inhalación, irritación en ojos y tracto respiratorio, con sangrado nasal, tos, rinitis, y dolor de garganta; mientras que por la vía oral, provoca dolor abdominal, náuseas y diarrea (García, 2006).



A fin de comprender la toxicología y las vías metabólicas de elementos tóxicos y esenciales, diversas estrategias analíticas han sido desarrolladas para obtener información cualitativa y cuantitativa acerca de los elementos, especies de elementos, sus interacciones, transformaciones y funciones en los sistemas biológicos. Por tal motivo, el análisis de los metales y de los compuestos que los contienen en los tejidos biológicos, constituye un aspecto importante a ser considerado en las ciencias biológicas. Gran parte del interés está ligado al estudio de los elementos esenciales, que incluyen metales de transición tales como Cu, Fe y Zn y también elementos tóxicos como Cd, Hg y Pb (Mesko, Hartwig, Bizzi, Pereira, Melloy Flores, 2011).

En este sentido, la espectrometría de masas es considerada una de las técnicas analíticas más importantes para el análisis de la concentración de elementos a niveles traza y ultra traza, para el análisis isotópico, la caracterización de superficie y para el análisis estructural de compuestos bioinorgánicos (Mesko et al., 2011).

El espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS, por sus siglas en inglés), es el equipo más adecuado para la determinación multielemental en muestras muy pequeñas y con matrices complejas. Esto debido a que presenta excelente sensibilidad y precisión, una mayor capacidad de reducir las interferencias espectrales, un consumo de muestra muy bajo y un rápido y simultáneo análisis de múltiples elementos en un amplio rango de concentraciones de analitos (que van de trazas a ultratrazas). Lo anterior, combinado con una preparación de muestras biológicas muy simple, se ha establecido y aplicado, de tal forma que ha permitido acelerar el análisis y limitar potencialmente las fuentes de contaminación (Liu, Piao, Huang, Zhang, Tian y Yang, 2014).



En el presente trabajo, se desarrolló la metodología analítica para la determinación (mediante un equipo de ICP-MS) de los elementos cobre y zinc, en muestras de tejidos de órganos de ratones de sexo masculino, los cuales fueron intoxicados por medio de inhalaciones de una mezcla de óxidos de manganeso y vanadio.

Debido a la importancia que tienen el Cu y el Zn en el cuerpo humano, es de suma importancia, conocer los efectos que tiene la presencia de Mn y V en su comportamiento dentro del organismo.



2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos generales

- Desarrollar la metodología analítica para la determinación de cobre y zinc en matrices biológicas empleando un equipo de Espectrometría de Masas – Plasma Acoplado por Inducción (ICP-MS).
- Evaluar el método analítico desarrollado.
- Aplicar el método a muestras reales.

2.2. Objetivos particulares

- Optimizar la metodología analítica:
 - Controlar los tratamientos físico y químico en la preparación del Material de Referencia Certificado (MRC) y de las muestras, para su introducción en el equipo de ICP-MS.



- Emplear el método del estándar interno para la determinación de los analitos Cu y Zn en el Material de Referencia Certificado (MRC) para obtener las mejores condiciones analíticas e instrumentales de trabajo.
 - Seleccionar los isótopos analitos y estándares internos adecuados para la determinación de cada elemento.
 - Corregir y/o minimizar las interferencias espectrales (isobáricas y poliatómicas).
 - Determinar los parámetros de desempeño principales, empleando como MRC el NIST 1577c (hígado de bovino).
- Aplicar la metodología analítica optimizada en muestras reales (diferentes tipos de tejidos de ratón, proporcionados por la Dra. Teresa I. Fortoul van der Goes de la Facultad de Medicina de la UNAM):
 - Con los resultados obtenidos, hacer una evaluación muy general sobre los efectos de la inhalación de una mezcla de gases de óxidos de V-Mn, en las concentraciones de Cu y Zn presentes en los tejidos analizados.



3. ANTECEDENTES

3.1. Oligoelementos

Los nutrientes son sustancias (elementos o compuestos) esenciales para la vida que no se sintetizan en cantidades suficientes en el cuerpo y por tanto deben ser suministradas a través de la dieta (Longo, Kasper, Jameson, Fauci, Hauser y Loscalzo, 2012). Dependiendo de la cantidad necesaria para el organismo, se clasifican en macronutrientes (proteínas, carbohidratos y grasas) y micronutrientes (minerales y vitaminas) (Vázquez, De Cos y López-Nomdedeu, 2005).

Los minerales son elementos inorgánicos esenciales para la salud humana. (Stathopoulou, Kanoni, Papanikolaou, Antonopoulou, Nomikos y Dedoussis, 2012). Suponen de un 4 a 5 % del peso corporal total. Su función en el organismo es tanto estructural como reguladora. Constituyen tejidos como hueso y dientes, regulan la transmisión neuromuscular, la permeabilidad de las membranas celulares, el balance hidroelectrolítico y el equilibrio ácido-base, así mismo, intervienen como cofactores de enzimas regulando el metabolismo. Se absorben principalmente en el intestino delgado y se eliminan generalmente mediante la orina y las heces (Vázquez et al., 2005).

La biodisponibilidad del mineral, es decir, la fracción ingerida que puede ser asimilada y utilizada en las funciones metabólicas, depende de diversos factores, como son: cantidad, forma en que se encuentre, otros nutrientes ingeridos, estado nutricional de cada individuo, entre otros (Vázquez et al., 2005).

Los minerales se clasifican dependiendo de las cantidades en las que son requeridos en el organismo. Los que se necesitan en cantidades superiores a los 100mg/día son



denominados macrominerales o mayoritarios, y son: calcio, magnesio, fósforo, sodio, potasio, cloro y azufre (Vázquez et al., 2005 y Faller, Schünke y Schünke, 2006).

Por otro lado, los que se necesitan en cantidades menores a 100mg/día se denominan microminerales, minoritarios, oligoelementos o elementos traza (Vázquez et al., 2005) y son: cromo, hierro, flúor, germanio, yodo, cobalto, cobre, manganeso, molibdeno, níquel, selenio, silicio, vanadio, zinc y estaño, aunque también se ha constatado la presencia de aluminio, arsénico, bario, oro y rubidio, pero no está bien aclarada su importancia (Faller et al., 2006).

Se les denomina elementos traza cuando se les relaciona con su análisis mediante técnicas químicas, ya que se trata de la detección de concentraciones a niveles de partes por millón (ppm) e incluso en partes por billón (ppb), denominándoles ultratrazas.

Los oligoelementos tienen un nivel normal de concentración en cada compartimento del organismo, el cual se define como la cantidad adecuada del elemento que garantiza el desempeño de las funciones biológicas del organismo. Si la concentración es más alta de lo normal, el elemento pasa a tener características tóxicas y en el caso opuesto, se pueden manifestar síntomas carenciales en el organismo. Las cantidades diariamente requeridas de elementos traza son mínimas, por lo que una dieta equilibrada, generalmente es capaz de cubrir sus necesidades (Hernández y Sastre, 1999).

3.2. Cobre

3.2.1. Propiedades físicas

El cobre es un metal de transición de color rojizo y brillo metálico, con símbolo químico Cu y con número atómico 29, perteneciente al grupo 11, periodo 4 de la tabla periódica. Su configuración electrónica es de $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^{10} 4s^1$. Tiene una masa atómica de 63.546



u.m.a., con dos isótopos estables, uno de 63 u.m.a. y otro de 65 u.m.a., con sus respectivas abundancias relativas de 69.15% y 30.85% (Chang, 2002, Berglund y Wieser, 2011 y Petrucci, Harwood y Herring, 2006).

Sus energías de ionización son (Spencer, Bodner y Rickard, 2000):

1ª → 745.4 KJ/mol (7.7eV)

2ª → 1957.9 KJ/mol (20.3eV)

3ª → 3553 KJ/mol (36.9eV)

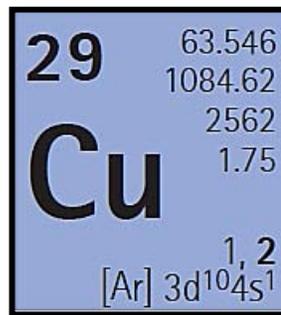


Figura 1. Símbolo químico del cobre (Editada de: Merck Millipore, 2013).

3.2.2. Rol biológico

El cobre juega un papel muy importante en nuestro metabolismo, en gran medida, porque permite que muchas enzimas fundamentales funcionen correctamente. Es esencial para mantener la fuerza de la piel, de los vasos sanguíneos y del tejido epitelial y conectivo de todo el cuerpo. Juega un rol en la producción de hemoglobina, mielina, melanina y también mantiene en buen funcionamiento la glándula tiroides (Osredkar y Sustar, 2011).

3.2.3. Metabolismo

El cobre se absorbe en el intestino y se transporta al hígado unido a la albúmina. Entra en el torrente sanguíneo a través de la proteína plasmática denominada ceruloplasmina, la cual es responsable de llevarlo a los tejidos que lo necesiten.

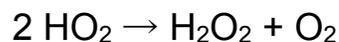


Su correcta absorción y metabolismo requieren un equilibrio adecuado con los minerales de zinc y manganeso, siendo más importante el primero, ya que puede competir con el cobre en el intestino delgado e interferir con su absorción.

Además la ceruloplasmina también actúa como una enzima que cataliza la oxidación de minerales, especialmente hierro, lo cual es necesario para que éste se una a la proteína de transporte (transferrina), así que una anemia de hierro puede ser un síntoma de deficiencia de cobre (Osredkar y Sustar, 2011).

3.2.4. Enzimas

Las proteínas de cobre tienen diversas funciones de transporte, procesos que se aprovechan de la fácil interconversión de Cu (I) y Cu (II). En el citocromo c oxidasa, que se requiere para la respiración aeróbica, cobre y hierro cooperan en la reducción de oxígeno. El cobre también se encuentra en la enzima Cu / Zn superóxidodismutasa, que cataliza la dismutación de superóxidos en oxígeno y peróxido de hidrógeno:



Igualmente el cobre es un componente de la lisil oxidasa, una enzima que participa en la síntesis de colágeno y elastina, dos proteínas estructurales importantes que se encuentran en el hueso y el tejido conectivo.

Como parte de las enzimas del citocromo c oxidasa, el cobre participa en la producción de energía; como parte de la dopamina beta-hidroxilasa participa en la conversión de la dopamina a norepinefrina (o noradrenalina), y con el Factor IV (una de las proteínas de la sangre) ayuda en la coagulación de ésta.

Así mismo es importante para la producción de la hormona tiroidea, tiroxina.



El cobre también es necesario para la síntesis de fosfolípidos que se encuentran en vainas de mielina de los nervios periféricos (Osredkar y Sustar, 2011).

3.2.5. Fuentes

Las fuentes ricas de cobre incluyen ostras y otros mariscos, carne de res y las vísceras (especialmente hígado), vegetales de hoja verde, cereales enriquecidos, nueces y semillas de girasol, aceitunas verdes, aguacates, legumbres secas, chocolate, cacao y pimienta negra.

Los multivitamínicos que incluyen minerales generalmente proporcionan cobre, aunque también está disponible de forma individual. Los suplementos de cobre no se deben de administrar a los niños, ya que deben obtenerlos directamente de los alimentos (Osredkar y Sustar, 2011).

3.2.6. Ingesta recomendada

En el caso del cobre las dosis son muy pequeñas (menos de 1 mg por día), por lo que debe tenerse en cuenta que si se excede puede ocasionar peligros para el organismo.

En general, para un rango de edades que van desde recién nacido hasta los 8 años la cantidad de cobre debe de encontrarse entre 200 y 440 µg por día, para edades de entre 9 y 18 años debe ser de entre 700 y 890 µg por día y para personas de 19 años en adelante de 900 µg por día, siendo el nivel de consumo máximo tolerable de 10 mg por día (Osredkar y Sustar, 2011).



3.2.7. Interacción con micronutrientes

Algunos expertos creen que los niveles elevados de cobre, sobre todo cuando los niveles de zinc son bajos, pueden ser un factor que contribuye a muchas enfermedades como esquizofrenia, hipertensión, autismo, fatiga, dolor muscular y articular, dolor de cabeza, hiperactividad infantil, depresión, insomnio, senilidad y síndrome premenstrual. Los adultos que toman suplementos de cobre también deben tomar suplementos de zinc (8-15 mg de zinc por cada 1 mg de cobre), debido a un desequilibrio de estos dos minerales.

Se sabe que el cobre reacciona con una variedad de nutrientes, incluyendo el hierro, zinc, molibdeno, azufre, selenio y la vitamina C (Osredkar y Sustar, 2011).

3.2.8. Deficiencia

Como el cobre está implicado en muchas funciones del cuerpo, su deficiencia puede producir una amplia gama de síntomas.

Las deficiencias de cobre pueden resultar en hernias, aneurismas, rompimiento de los vasos sanguíneos que se manifiesta como hematomas o hemorragias nasales, anemia por deficiencia de hierro, osteoporosis y problemas en las articulaciones, trastornos cerebrales, anormalidades en la glucosa y el metabolismo del colesterol, aumento de la susceptibilidad a las infecciones debido a una pobre función inmune (neutropenia), pérdida de pigmento, debilidad, fatiga, llagas en la piel, mal funcionamiento de la tiroides, latido irregular del corazón y temperatura corporal baja. Ya que el cobre es importante en la estructura de la membrana celular, una deficiencia de éste puede alterar gravemente la circulación de nutrientes a través de las paredes celulares.

A pesar de que la mayoría de las personas consumen menos de las cantidades recomendadas de cobre en su dieta, los síntomas de deficiencia de cobre son relativamente



raros. Sin embargo, ciertas condiciones médicas, incluyendo diarrea crónica, celiaquía y la enfermedad de Crohn pueden aumentar el riesgo de desarrollar una deficiencia de cobre. Además, el cobre requiere suficiente ácido en el estómago para su absorción, por lo que las personas que consumen antiácidos regularmente pueden incrementar el riesgo de desarrollar una deficiencia de cobre. Un nivel de cobre inadecuado también se observa en los niños con baja ingesta de proteínas y en los recién nacidos alimentados únicamente con leche de vaca sin suplemento de cobre lo que podría acarrear una deficiencia en el crecimiento (Osredkar y Sustar, 2011).

3.2.9. Toxicidad

El consumo de cobre en exceso puede causar náuseas, vómitos, dolor abdominal y calambres, dolor de cabeza, mareos, debilidad, diarrea y un sabor metálico en la boca. La toxicidad de cobre crónica no se produce normalmente en seres humanos debido a los sistemas de transporte que regulan su absorción y excreción. Dado que el exceso de cobre se excreta a través de la bilis, es más probable que ocurra una intoxicación de cobre en los individuos con enfermedad hepática u otras condiciones médicas en las que la excreción de bilis se vea comprometida. Aún no se ha determinado si el cobre es carcinogénico. En los últimos años, los nutricionistas han estado más preocupados por la toxicidad del cobre que por su deficiencia. Una explicación para esto fue el aumento de la cantidad de cobre que se encuentra en el agua potable debido a las tuberías de cobre. Cocinar con utensilios de cobre también puede aumentar el contenido de cobre de los alimentos. La exposición industrial a los humos de cobre, polvos o nieblas puede causar fiebre por humos metálicos con cambios atróficos en las membranas mucosas nasales. Altas captaciones de cobre pueden causar daño al hígado y los riñones e incluso la muerte (Osredkar y Sustar, 2011).



3.3. Zinc

3.3.1. Propiedades físicas

El zinc es un metal de transición de color blanco azulado, con símbolo químico Zn y con número atómico 30, perteneciente al grupo 12, periodo 4 de la tabla periódica. Su configuración electrónica es de $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^{10} 4s^2$. Tiene una masa atómica de 65.409 u.m.a., con cinco isótopos estables de 64, 66, 67, 68 y 70 u.m.a., con sus respectivas abundancias relativas de 49.17%, 27.73%, 4.04%, 18.45% y 0.61% (Chang, 2002, Berglund y Wieser, 2011, y Petrucci et al., 2006).

Sus energías de ionización son (Spencer et al., 2000):

1^a → 906.4 KJ/mol (9.4eV)

2^a → 1733.2 KJ/mol (17.9eV)

3^a → 3832.6 KJ/mol (39.7eV)

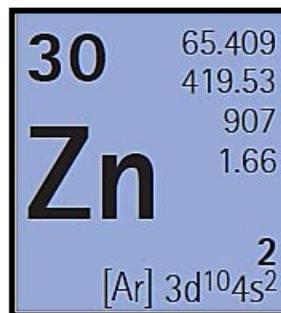


Figura 2. Símbolo químico del zinc (Editada de: Merck Millipore, 2013).

3.3.2. Rol biológico

El zinc está involucrado en numerosos aspectos del metabolismo celular. Se estima que aproximadamente 10% de las proteínas humanas se unen potencialmente al zinc, además de cientos que lo transportan y circulan.



Es requerido para la actividad catalítica de más de 200 enzimas y juega un papel importante en la función inmune, cicatrización de heridas, síntesis de proteínas, síntesis del ADN y en la división celular.

El zinc es necesario para el correcto funcionamiento de los sentidos del gusto y del olfato, y ayuda al crecimiento y desarrollo normal durante el embarazo, la infancia y la adolescencia. Los iones del zinc son agentes antimicrobianos efectivos incluso a bajas concentraciones.

Los problemas de gastroenteritis pueden verse fuertemente disminuidos gracias a la ingesta de zinc, lo cual puede deberse a la acción antimicrobiana de los iones de zinc en el tracto gastrointestinal.

Las células de las glándulas salivales, de la próstata, del sistema inmune y del intestino emplean señales de zinc para comunicarse entre ellas.

En el cerebro, el zinc es almacenado en vesículas sinápticas específicas por las neuronas glutamatérgicas y puede modular la excitabilidad del cerebro. Igualmente juega un papel clave en la plasticidad sináptica y por lo tanto en el aprendizaje. También puede ser una neurotoxina, ya que la homeostasis del zinc es de gran importancia para el funcionamiento normal tanto del cerebro como del sistema nervioso central (Osredkar y Sustar, 2011).

3.3.3. Metabolismo

En el plasma sanguíneo el zinc es transportado por la albúmina y la transferrina, las cuales son proteínas transportadoras de la sangre contenidas en el plasma. Ya que la transferrina transporta también al hierro, si hay un exceso de éste se reduce la absorción de zinc y viceversa. La concentración de zinc en el plasma sanguíneo permanece relativamente constante independientemente de su ingesta. El zinc se mantiene en las reservas de la



metalotioneína y puede también ser transferido a distintas familias de proteínas transportadoras. El exceso de zinc perjudica la absorción de cobre porque las metalotioneínas absorben ambos metales (Osredkar y Sustar, 2011).

3.3.4. Enzimas

Algunas de las enzimas que contienen zinc son la anhidrasa carbónica y la carboxipeptidasa, que son vitales para los procesos de regulación del dióxido de carbono (CO₂) y la digestión de proteínas, respectivamente.

Este metal tiene una geometría de coordinación flexible, que permite a las proteínas usarlo para cambiar rápidamente conformaciones y llevar a cabo reacciones biológicas (Osredkar y Sustar, 2011).

3.3.5. Fuentes

Una amplia variedad de alimentos contienen zinc. Las ostras contienen más zinc por porción que cualquier otro alimento, pero la carne roja, especialmente la carne de res, el cordero y el hígado tienen algunas de las más altas concentraciones de zinc en los alimentos. Otras buenas fuentes incluyen frijoles, nueces, otros tipos de pescados y mariscos (como el cangrejo y la langosta), granos, cereales, almendras, semillas de calabaza y semillas de girasol.

Los suplementos contienen diversas formas de zinc, como son gluconato de zinc, sulfato de zinc y acetato de zinc (Osredkar y Sustar, 2011).



3.3.6. Ingesta recomendada

Dependiendo del género y edad será la ingesta de zinc. En general, para un rango de edades que van desde recién nacido hasta los 8 años la cantidad de zinc debe encontrarse entre 2 y 5 mg por día, para edades de entre 9 y 18 años debe ser de entre 8 y 11 mg por día y para personas de 19 años en adelante aproximadamente de entre 11 y 13 mg por día, siendo el nivel de consumo máximo tolerable de 40 mg por día (Osredkar y Sustar, 2011).

3.3.7. Interacción con micronutrientes

La fortificación de alimentos con hierro en la anemia por deficiencia de hierro no afecta significativamente la absorción de zinc. Sin embargo, grandes cantidades de suplementos de hierro (mayor a 25 mg), si pueden disminuir su absorción.

Varios estudios han encontrado que los altos niveles de zinc suplementario tomado durante largos períodos de tiempo pueden ocasionar una disminución en la absorción de cobre en el intestino y por ende deficiencia de cobre con anemia asociada (Osredkar y Sustar, 2011).

3.3.8. Deficiencia

Casi dos millones de personas en el mundo presentan deficiencia de zinc, la cual se caracteriza por retraso en el crecimiento, pérdida del apetito y daño de la función inmune.

En los casos más graves, la deficiencia de zinc provoca la pérdida del cabello, diarrea, retraso en la maduración sexual, impotencia, hipogonadismo en los hombres, y lesiones de la piel y ojos. También se pueden producir pérdida de peso, retraso en la cicatrización de las heridas, alteraciones del gusto y de las funciones cognitivas.



Cuando se produce deficiencia de zinc, suele ser debido a una inadecuada ingesta o absorción de éste, a grandes pérdidas de peso corporal o al aumento de sus requerimientos. Puede estar asociado con la mala absorción, la acrodermatitis enteropática, enfermedad hepática crónica, enfermedad renal crónica, enfermedad de células falciformes, diabetes, cáncer y otras enfermedades crónicas.

En los niños, provoca un aumento en infecciones y diarrea, contribuyendo a la muerte de alrededor de 800 000 niños en todo el mundo por año (Osredkar y Sustar, 2011).

3.3.9. Toxicidad

Aunque el zinc es un elemento esencial para la buena salud, su exceso puede ser perjudicial. La absorción excesiva de cobre y zinc suprime la absorción de hierro. Efectos adversos agudos de la alta ingesta de zinc incluyen náuseas, vómitos, pérdida de apetito, calambres abdominales, diarrea y dolores de cabeza. La ingesta de 150 a 450 mg de zinc por día ha sido asociada con efectos crónicos como el bajo estatus de cobre, alteración de la función del hierro, reducción de la función inmune y de los niveles de lipoproteínas de alta densidad (Osredkar y Sustar, 2011).

3.4. Interacción entre Cu y Zn

El Cu y el Zn tienen una relación antagónica, lo que significa que altas concentraciones de Zn en el organismo, inducen una deficiencia de Cu (Maret y Sandstead, 2006) debido a que se produce un decrecimiento en su absorción (Osredkar y Sustar, 2011). De la misma manera, altas concentraciones de Cu producen un deterioro nutricional con respecto al Zn (Menéndez et al., 2005).



3.5. Fundamento del trabajo

El proyecto global, del cual se desprende este trabajo, consistió en el desarrollo de la metodología analítica para lograr la determinación, con ayuda de un equipo de ICP-MS; de los elementos cobre, manganeso, vanadio y zinc (a niveles traza y ultratrazas) en muestras de tejidos de órganos de ratones macho (bazo, hígado, pulmón, riñón, testículo y timo), los cuales fueron expuestos a inhalaciones de una mezcla de óxidos de manganeso y vanadio. La parte experimental en los ratones, fue realizada por la Dra. Teresa I. Fortoul van der Goes y su equipo de trabajo, en la Facultad de Medicina de la UNAM. De tal manera que al laboratorio 103 de la División de Estudios de Posgrado (Facultad de Química, UNAM) donde se realizó este trabajo; fueron proporcionados solamente los viales que contenían pequeñas muestras de los diferentes tejidos de los órganos en estudio y una lista donde se encontraban descritos el tipo de tejido y el número de inhalaciones a las que fue sometido cada ratón (rango que iba desde 0 inhalaciones, para las muestras control, hasta un máximo de 26).

El proyecto para desarrollar la metodología analítica adecuada para la determinación de los elementos en estudio, fue dividido a su vez en dos proyectos de tesis de licenciatura, los cuales por emplear las mismas muestras, trabajaron de manera conjunta.

Uno de los proyectos se enfocó en los elementos que se dieron a inhalar (Mn y V), realizada por el Q. Rafael León Zárate (León, 2013),

El otro proyecto, que forma la base de esta tesis, se encargó de los elementos Cu y Zn; en los cuales se deseaba estudiar su concentración y comportamiento, derivado de dicha inhalación Mn-V. Lo anterior, gracias a que las funciones de estos dos elementos (Cu y Zn) son de suma importancia para el organismo, como ya se mencionó en los puntos anteriores (Ver puntos 3.2., 3.3. y 3.4.).



3.6. Ratón: modelo biológico

El animal de laboratorio es aquel que es engendrado y producido en condiciones controladas, es mantenido en un entorno controlado, posee claros antecedentes genéticos y microbiológicos y existe una comprobación sistemática de estos antecedentes (Fuentes, Mendoza, Rosales y Cisneros, 2008).

También es definido como cualquier especie animal que, mantenido bajo determinadas condiciones controladas es utilizado como instrumento de medida en experimentación científica, desarrollo tecnológico e innovación, pruebas de laboratorio y docencia, para la generación de datos, los cuales son utilizados como información (Fuentes et al., 2008).

El uso de animales como modelos biológicos, se ha convertido en una práctica bien establecida y esencial, que ha ayudado a comprender y predecir respuestas en los seres humanos; convirtiéndose así en una herramienta importante en las ciencias biomédicas, principalmente en las áreas de medicina experimental, farmacología y evaluación toxicológica (Gad, 2007).

Ya sea sirviendo como fuentes de células, tejidos y órganos o como modelos para estudiar enfermedades y analizar los efectos de distintas drogas u otros xenobióticos, los experimentos en animales han proporcionado los componentes básicos necesarios que han permitido el crecimiento explosivo del conocimiento médico y biológico que se ha dado desde la segunda mitad del siglo XX hasta el presente (Gad, 2007).

Igualmente, los experimentos en animales, han servido con bastante éxito para la identificación de peligros potenciales para la toxicidad de los seres humanos, debido a los diferentes productos químicos a los que se encuentran expuestos, ya sea por el medio ambiente en que habitan o por las actividades que desarrollan (Gad, 2007).



Entre los animales más empleados como modelos biológicos se encuentran: ratones, ratas, hámsteres, conejillos de indias, conejos, hurones, perros, primates y cerdos (Gad, 2007).

En el caso de la realización de pruebas de toxicidad, la elección de las especies animales a emplear, se basa en la consideración de una serie de variables. Idealmente, si las pruebas están destinadas a proporcionar información acerca de la seguridad de un producto sobre los humanos, las especies seleccionadas deberían ser similares al ser humano, ya que diferencias substanciales en cuanto a la absorción, distribución, metabolismo o eliminación, entre las especies de prueba y las de destino (en este caso humanos), pueden reducir el valor predictivo de los resultados del experimento (Gad, 2007).

El uso del ratón para la investigación biomédica, ha sido reportado desde hace varios cientos de años (Gad, 2007).

El ratón es una especie cosmopolita que se adapta a una gran variedad de condiciones ambientales, desde zonas muy frías hasta regiones tropicales. Son mamíferos de sangre caliente, de hábitos nocturnos, los cuales poseen agudos sentidos de la audición y del olfato, mientras que su visión es muy pobre. El tamaño de un ratón adulto varía entre 12 y 15 cm desde la punta de la nariz hasta la punta de la cola; siendo el largo de la cola igual al largo del cuerpo. Tienen un peso aproximado de 30g. Su vida útil es de 10 a 12 meses y se obtienen de 8 a 10 camadas. Por su pequeño tamaño son muy susceptibles a cambios ambientales (Fuentes et al., 2008).

La clasificación taxonómica de los ratones se muestra a continuación:



Reino	<i>Animalia</i>
Filo	<i>Chordata</i>
Clase	<i>Mammalia</i>
Orden	<i>Rodentia</i>
Familia	<i>Muridae</i>
Subfamilia	<i>Murinae</i>
Género	<i>Mus</i>

Tabla 1. Taxonomía del ratón (Fuentes et al., 2008).

Los ratones tienen muchas ventajas como modelos animales para las pruebas de toxicidad, ya que son pequeños, relativamente económicos de obtener, albergar y cuidar, y generalmente fáciles de manipular. Otras ventajas son sus cortos períodos de gestación y de vida útil (Gad, 2007).

Las desventajas con ratones están relacionadas con el pequeño tamaño del animal. Ya que los cambios ambientales tienen efectos más graves en las especies más pequeñas, además de que no suelen ser tan dóciles. Igualmente el pequeño tamaño a menudo impide o hace más difícil una serie de procedimientos que se realizan habitualmente en las pruebas de toxicidad, tales como la recogida de muestras grandes o muestras repetidas de sangre y orina, evaluación electrocardiográfica y algunas evaluaciones de necropsia (Gad, 2007).

Una cepa es la población de una misma especie, descendiente de un mismo origen; conservada por medio de una serie de pasos o cultivos (Fuentes et al., 2008). Existen diferencias importantes entre las distintas cepas de ratones. La elección adecuada de una cepa de ratones para una evaluación de toxicidad en particular, debe considerar los objetivos específicos del estudio y las características específicas de cada una de las cepas



candidatas, que podrían ayudar u obstaculizar el logro de resultados confiables (Gad, 2007).

El diseño de los experimentos de toxicidad debe adaptarse a los objetivos que se desea alcanzar, a las características específicas de la sustancia de ensayo y a las normas expedidas por los diferentes órganos reguladores que existen (Gad, 2007).

La mayoría de los estudios de toxicidad y teratología realizados en ratones, están diseñados para proporcionar información sobre la toxicidad humana, por lo que las técnicas de administración de las sustancias de ensayo, deben tener en cuenta las vías de exposición humana, intentando que sean las mismas, en la medida de lo posible (Gad, 2007).

De las distintas rutas disponibles, los efectos más rápidos y efectivos se obtienen cuando la administración se lleva a cabo vía intravenosa, seguido en orden descendente por inhalación, vía intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intradérmica, y rutas tópicas orales (Gad, 2007).

La administración por inhalación es el medio más tecnológicamente complejo de exposición de rutina, y los estudios que se realizan por dicha vía son particularmente útiles en la estimación del riesgo de exposición accidental u ocupacional de gases, vapores, polvos, humos, o nieblas, así como en la evaluación de la toxicidad de agentes destinados a ser administrados por dicha vía (Gad, 2007).

La inhalación ofrece una rápida y eficiente absorción de la mayoría de las sustancias, debido a la gran área de superficie del sistema respiratorio y a que toda la sangre circula a través de los pulmones (Gad, 2007).



La absorción de los agentes inhalados, se produce por vía de uno o más de los siguientes mecanismos, dependiendo de características específicas del agente: absorción directa en el torrente sanguíneo, absorción en el tracto gastrointestinal posterior a su depósito en la nasofaringe o a su transporte mucociliar y/o por deglución, o por absorción linfática posterior a su depósito en los alveolos (Gad, 2007).

La principal ventaja de la inhalación es su rapidez y eficiencia de absorción. La principal desventaja es la complejidad tecnológica del método (Gad, 2007).

Para poder realizar las pruebas de inhalación sobre ratones, los animales deben ser colocados en ambientes que contengan la muestra en estudio, ya sea en forma de gas, vapor, polvo, humo o niebla. Para que las partículas de la sustancia a inhalar puedan ser aspiradas por los ratones, el tamaño de su diámetro debe encontrarse en un rango de entre 1 y 10 μm . Igualmente, su tamaño determinará la parte del tracto respiratorio en que se depositará y será absorbida la muestra (Gad, 2007).

Existen dos tipos de aparatos empleados para llevar a cabo la exposición a sustancias (por inhalación), sobre ratones: cámaras que contienen al animal o a un grupo de animales, o un dispositivo que expone sólo la cabeza o la nariz del animal a la atmósfera experimental (Gad, 2007).

En cuanto a la recolección de información, existen diferentes tipos de datos que pueden ser obtenidos, de forma rutinaria, durante la realización de los estudios de toxicidad en ratones (vía inhalación); los cuales se dividen en tres grandes categorías: observaciones clínicas y exámenes físicos, evaluaciones de laboratorio clínico y procedimientos postmortem (Gad, 2007).



Los procedimientos postmortem son los realizados después de la muerte del animal, los cuales incluyen: la confirmación del número de identificación y el sexo del animal, un examen externo y el examen de los órganos internos (en su lugar original y posteriormente a su extracción). Este último punto incluye: la medición de su peso y la recolección de muestras de tejido para su procesamiento histológico, la realización de un examen microscópico, y en caso de ser necesario y posible, un análisis químico (Gad, 2007).

Para el presente trabajo, fueron empleados ratones de la cepa CD-1, que fueran de la misma edad y el mismo sexo (macho), y que tuvieran un tamaño parecido. Todos recibieron diferente número de inhalaciones de óxidos de manganeso y vanadio (de 0 a 26), por medio de una cámara que contenía a todos los ratones en un principio y que conforme el número de inhalaciones fue incrementando, fueron siendo extraídos para su posterior estudio postmortem (histológico, microscópico y químico).

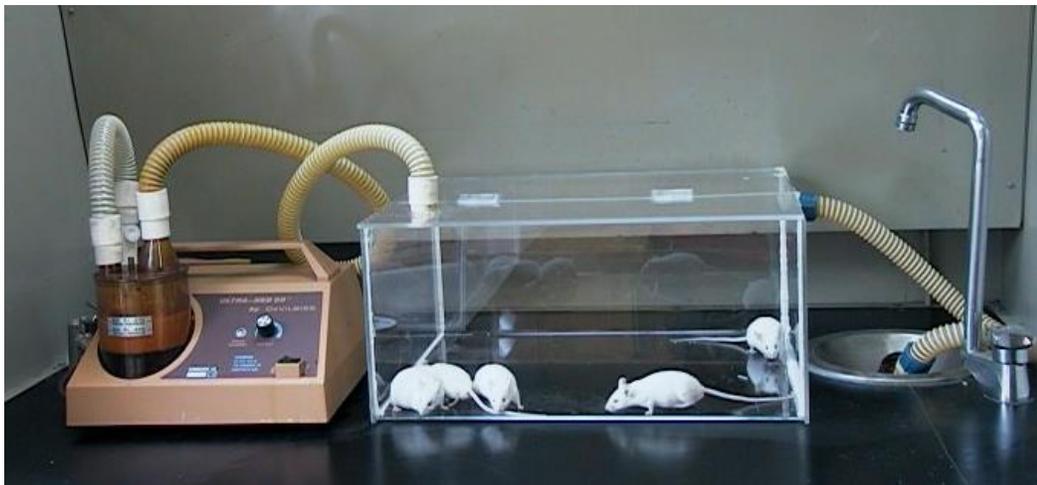


Figura 3. Cámara de gases para pruebas de toxicidad en ratones, vía inhalación
(Foto proporcionada por la Dra. Liliana V.R. Saldívar y Osorio).



3.7. Manganese

El manganeso es el doceavo elemento más abundante en la corteza terrestre, y está presente de forma natural en rocas, suelo, agua y alimentos. Es un elemento esencial para los humanos, animales y plantas; ya que es indispensable para el crecimiento, desarrollo y mantenimiento de la salud de éstos (Santamaria, 2008).

En los humanos tiene una gran variedad de funciones metabólicas, incluyendo aquellas involucradas en el desarrollo del sistema óseo, la energía metabólica, la activación de algunas enzimas, funciones de los sistemas nervioso e inmunológico y de la hormona reproductiva. También es un antioxidante que protege a las células del daño causado por los radicales libres. Juega un rol de suma importancia en la regulación de la energía celular, en el crecimiento de los huesos y tejido conectivo, y para la coagulación de la sangre. En el cerebro es un importante cofactor para una gran variedad de enzimas (Santamaria, 2008).

Existen dos formas de manganeso en el medio ambiente. Los compuestos inorgánicos, son empleados en la producción de acero, baterías, cerámica y en suplementos alimenticios. También son generados como productos de la combustión de vehículos de motor y plantas industriales que queman carbón. La otra forma son los compuestos orgánicos de manganeso, los cuales son empleados en algunos pesticidas, fertilizantes y en un aditivo de la gasolina llamado tricarbonil (metilciclopentadienil) manganeso (Gad, 2005).

El Mn es un elemento que siempre se encuentra presente en el medio ambiente, por lo que todos los humanos están expuestos a él. Así mismo es un componente natural del cuerpo humano, donde los niveles más altos de Mn se encuentran en hígado, páncreas y riñones, mientras que los más bajos están en huesos y grasa. Su excreción se da principalmente en la bilis (Gad, 2005).



Se encuentra de forma natural en los alimentos, donde las concentraciones más altas se han determinado en nueces, cereales, leguminosas, frutas, vegetales, granos, productos lácteos, carnes, pescado y huevo. Incluso está presente en bajas cantidades en el agua potable (Santamaria, 2008 y Gad, 2005).

La fuente antropogénica primaria de Mn en el aire, es la industria, como las plantas de producción de aleaciones con hierro, fundidoras de acero, plantas de energía, entre otras (Santamaria, 2008).

Aunque es muy rara la deficiencia de Mn en humanos, si se ha llegado a reportar y a caracterizar por anormalidades óseas y convulsiones (Gad, 2005).

Los mayores niveles de exposición ambiental de manganeso ocurren generalmente, dentro o en las zonas cercanas a minas, fábricas y fundidoras; donde se emiten polvos de manganeso al aire, los cuales son inhalados tanto por los trabajadores de estos lugares como por la población aledaña. Las inhalaciones consisten principalmente de dióxido y tetraóxido de manganeso (MnO_2 y Mn_3O_4) (Gad, 2005 y Santamaria, 2008). Algunos compuestos de Mn son fácilmente solubilizados, por lo que también pueden ocurrir exposiciones significativas por la ingestión de agua contaminada. En el suelo, el Mn puede migrar en forma de partículas, al aire o al agua. La ingestión es la vía de exposición principal para la mayoría de la gente (Gad, 2005).

La dosis de Mn en humanos muestra generalmente grandes variaciones regionales, dependiendo de los niveles de Mn presentes en sus diferentes fuentes (alimentos, agua y aire). En general, la dosis oral total de referencia se estableció en 0.14mg kg^{-1} al día. El agua potable no parece ser una fuente importante de Mn, ya que generalmente se reportan concentraciones por debajo de la dosis de referencia de $400\mu\text{g l}^{-1}$. Las concentraciones en el aire también varían mucho dependiendo la zona geográfica, con valores que van desde



0.001 $\mu\text{g m}^{-3}$, hasta valores cercanos a 0.05 $\mu\text{g m}^{-3}$. La absorción de Mn varía igualmente, de acuerdo al órgano que lleve a cabo este proceso. Siendo de entre 2% y 5% para el tracto digestivo y de hasta aproximadamente 70% al realizarse a través de los pulmones (Yazbeck, 2011).

El Mn como elemento tóxico, provoca una respuesta inflamatoria en los pulmones, que puede llegar a neumonitis. Cuando es crónica, causa deficiencia de hierro, cirrosis hepática, una enfermedad llamada manganismo, la cual presenta síntomas parecidos al parkinson (temblores, falta de coordinación, rigidez muscular, dificultades para respirar y tragar) y otros problemas neuromusculares. Igualmente se producen anomalías mentales (confusión, alucinaciones, ansiedad y pánico) (Gad, 2005).

3.8. Vanadio

El Vanadio es el 22° elemento más abundante en la corteza terrestre y se encuentra en alrededor de 65 minerales diferentes (García, 2006 y Gad, 2005).

Está clasificado como un elemento de transición y puede encontrarse en seis estados de oxidación diferentes (-1, 0, +2, +3, +4 y +5), de los cuales, los más comunes son +3, +4 y +5 (Gummow, 2011).

La mayor parte de la producción de vanadio, proviene de la formación de subproductos o coproductos de otros elementos como hierro, fósforo y uranio (Gummow, 2011). Es usado como un aditivo en aleaciones de acero, titanio, cobre y aluminio. También es empleado como catalizador en la producción de caucho sintético, plásticos, productos químicos y en cerámica (Gad, 2005).

No ha sido comprobado que el vanadio sea esencial para los seres humanos (ya que su concentración biológica es insignificante), pero sí para otras especies animales, en las



cuales, su deficiencia produce problemas de reproducción, alteraciones del metabolismo lipídico, anormalidades físicas y esqueléticas y aumento de la glucosa en la sangre (García, 2006 y Gad, 2005).

Es un elemento con importancia farmacológica, ya que se emplea en el tratamiento terapéutico de la diabetes y como un potente agente anticancerígeno (Gad, 2005).

Las fuentes naturales de vanadio en el aire incluyen erosión del suelo (54%), acción volcánica (20%) e incendios forestales y fuentes biogénicas, como los aerosoles marinos (<5%) (Gummow, 2011). La liberación natural de V al agua y al suelo ocurre principalmente como resultado del intemperismo que afecta a las rocas y por medio de la erosión del suelo (Gad, 2005).

Las fuentes antropogénicas de emisión, incluyen la quema de combustibles fósiles (asociadas generalmente con fuentes industriales, como refinerías de petróleo y plantas eléctricas que emplean petróleo y carbón enriquecido con este metal), al igual que su deposición, tanto cercana o lejana de los centros que lo producen. Otras fuentes antropogénicas incluyen lixiviados provenientes de residuos mineros, aguas negras y algunos fertilizantes (Gad, 2005).

Los niveles en el ambiente dependen de las condiciones climáticas, la posición geográfica y las condiciones de urbanización, entre otros factores (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).

La principal vía de exposición de V, para la población en general, se debe a la ingestión de alimentos ricos en este metal, sobretodo de hongos, mariscos, semillas de eneldo, perejil y pimienta negra (Gummow, 2011 y García, 2006). También puede deberse a la ingestión de productos alimenticios contaminados por suelos, fertilizantes o lodos que lo contengan en altos niveles (Gad, 2005).



La exposición a niveles superiores de vanadio, se da por vía de su inhalación (en forma de VO_2 , V_2O_3 y V_2O_5 (Gummow, 2011)), donde los principales afectados son los trabajadores de industrias en donde se emplean y procesan compuestos de vanadio y en menor grado, áreas urbanas donde son quemadas grandes cantidades de combustóleo (Gad, 2005).

Este elemento no se metaboliza en el cuerpo humano, por lo que circula como un polivanadato (isopolianiones de vanadio pentavalente) en sangre oxigenada y permanece como un catión vanadilo (forma catiónica del vanadio tetravalente) en los tejidos; distribuyéndose a bajos niveles en riñones e hígado y a menores cantidades en cerebro y corazón. Los mayores niveles se han encontrado en cabello, huesos y dientes. La mayor parte del vanadio es excretado por los riñones dentro de las primeras 24 horas después de la administración, principalmente en la orina; aunque también se desecha por las heces y la bilis (Gad, 2005).

Diariamente consumimos alrededor de $1\mu\text{g}$ de V proveniente del aire, 11 a $30\mu\text{g}$ provenientes de los alimentos y de 1 a $30\mu\text{g l}^{-1}$ del agua potable; lo cual da un total de 10 a $70\mu\text{gV día}^{-1}$ (García, 2006).

La toxicidad del vanadio aumenta conforme lo hace su grado de oxidación, siendo el pentóxido de vanadio el más tóxico de todos. En general, el vanadio tiene una muy baja toxicidad oral y dermal, mientras que por la ruta de inhalación, es moderada. (Gad, 2005).

Una exposición oral aguda da como resultado calambres en el abdomen, diarrea, heces negras y un revestimiento negro verdoso en la lengua. Al ser inhalado, el vanadio es tóxico para los macrófagos alveolares y por ende perjudica la resistencia a infecciones pulmonares. Una aguda exposición a inhalaciones puede resultar en la irritación de los pulmones, tos, jadeo, dolor de pecho, hemorragias nasales, rinitis atrófica, faringitis, traqueítis, enfermedades de tipo asmático, irritación de los ojos y un sabor metálico en la



boca. La exposición de la piel puede resultar en dermatitis, lesiones alérgicas y una coloración verde (Gad, 2005).

Una dosis fatal puede resultar en una depresión del sistema nervioso central con temblores, dolores de cabeza y tinnitus. Una intoxicación crónica de vanadio suele ser rara, pero cuando sucede, puede producir vasoconstricción periférica de pulmones, bazo, riñones e intestinos. Igualmente puede provocar arritmias y bradicardia (Gad, 2005).

3.9. Espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una de las técnicas analíticas más importantes utilizadas en la actualidad para la determinación de concentraciones de diversos elementos (especialmente en el rango de trazas y ultratrazas), para realizar análisis isotópicos, poder determinar las estructuras de compuestos orgánicos, entre otras aplicaciones. Todo esto es posible realizarlo gracias a su alta sensibilidad, bajos límites de detección y la posibilidad de analizar volúmenes de muestra muy pequeños (Becker, 2007).

Una de las principales características de la espectrometría de masas, que le dan una gran ventaja en comparación con otras técnicas, es que ofrece la posibilidad de determinar relaciones isotópicas con una alta precisión y exactitud para todo tipo de muestras (Becker, 2007).

3.9.1. Fundamento teórico de la espectrometría de masas

Cada elemento de la tabla periódica está compuesto de átomos, que a su vez se componen de un núcleo (mezcla de protones y neutrones) y electrones. Como protones y electrones tienen cargas asociadas entre sí (protón con carga positiva / electrón con carga negativa) el átomo es normalmente neutro, igual número de cada uno de ellos. Sin embargo, es



posible para un mismo elemento tener diferentes masas, pues la cantidad de neutrones que existen en el núcleo puede variar, lo cual da lugar a la existencia de diferentes isótopos (Dean, 2005).

La ionización es el proceso mediante el cual un electrón puede ser removido de un átomo neutro aplicando energía de una fuente externa (fuente de iones), dando como resultado la formación de un ión cargado positivamente, el cual tiene la misma masa atómica que el isótopo original del elemento, pues la masa de un electrón es despreciable comparada con la de un protón o un neutrón. La energía requerida es llamada Energía de Ionización (Dean, 2005), la cual se define como la cantidad de energía que debe absorber un átomo en estado gaseoso para poder desprender el electrón que esté unido más débilmente al núcleo. Si más energía es aplicada, es posible seguir liberando más electrones, por lo que un átomo puede tener varias energías de ionización (Petrucci et al., 2006).

Todos los espectrómetros de masas son capaces de separar iones en función de su relación masa/carga (m/z), es decir la masa atómica del elemento (m) dividida por su carga (z), la cual generalmente es medida como un número adimensional. Una importante característica de un espectrómetro de masas es su capacidad de separar iones con relaciones masa/carga similares, es decir su resolución (Dean, 2005).

3.9.2. Funcionamiento general

Todos los sistemas de espectrometría de masas para el análisis de compuestos orgánicos e inorgánicos emplean el mismo principio básico (Becker, 2007).

La muestra que será analizada (gas, líquido o sólido) se introduce en la fuente de iones (la cual opera en condiciones de alto vacío, baja presión o presión atmosférica), donde se vaporiza, atomiza e ioniza. Los iones cargados positivamente son extraídos y acelerados



hasta el analizador de masas, donde son separados de acuerdo a su relación masa/carga (m/z). Posteriormente, son registrados con un sistema de detección de iones (Becker, 2007).



Figura 4. Esquema general del funcionamiento de un equipo de ICP-MS (Editada de: Becker, 2007).

3.10. Espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente

La Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS, por sus siglas en inglés, Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry) es, sin duda, la técnica de análisis de elementos traza de más rápido crecimiento en la actualidad. Desde su comercialización en 1983, miles de sistemas han sido instalados alrededor de todo el mundo, siendo usados para variadas y diversas aplicaciones, dentro de las que pueden incluirse en su mayoría, análisis ambientales, geológicos, de semiconductores, biomédicos, nucleares, entre otros. La principal razón de su crecimiento es su capacidad para llevar a cabo rápidas determinaciones multielementales a niveles ultratraza (Thomas, 2004).



Técnica	Metales	Rango aproximado de límite de detección	Ventajas	Desventajas
ICP-MS	La mayoría de los metales y no metales	ppt	Rápida, sensible, multielemental, amplio rango dinámico, buen control de interferencias	Limitada tolerancia al total de sólidos disueltos
ICP-OES	La mayoría de los metales y algunos no metales	ppm - ppb	Rápida, multielemental, alta tolerancia al total de sólidos disueltos	Interferencias complejas, relativamente poca sensibilidad
GFAA	La mayoría de los metales (comúnmente: Pb, Ni, Cd, Co, Cu, As y Se)	ppb	Sensible, pocas interferencias	Técnica de un solo elemento, limitado rango dinámico

Tabla 2. Comparación entre algunas técnicas de espectrometría atómica
(Editada de: Agilent Technologies, 2005).

Aun cuando puede determinar de manera general el mismo conjunto de elementos que otras técnicas, como son Absorción Atómica en Flama, Atomización Electrotérmica y Espectroscopia de Emisión Óptica con Plasma Acoplado Inductivamente (FAA, ETA e ICP-OES, por sus siglas en inglés respectivamente), el ICP-MS tiene claras ventajas en sus características multielementales, velocidad de análisis, límites de detección y capacidad isotópica (Thomas, 2004), detectando incluso elementos a niveles de partes por trillón con buenos valores de exactitud y precisión (Dean, 2005).

Así mismo, una amplia gama de diseños de espectrómetros de masas pueden ser empleados para la técnica de ICP-MS (Dean, 2005).

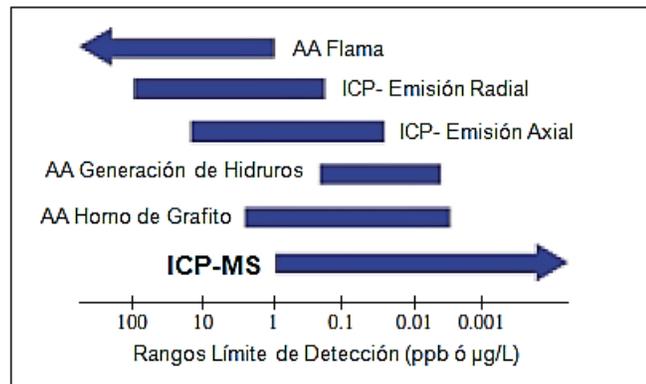


Figura 5. Rangos del límite de detección de las principales técnicas de espectroscopia atómica (Editada de: PerkinElmer, 2004).

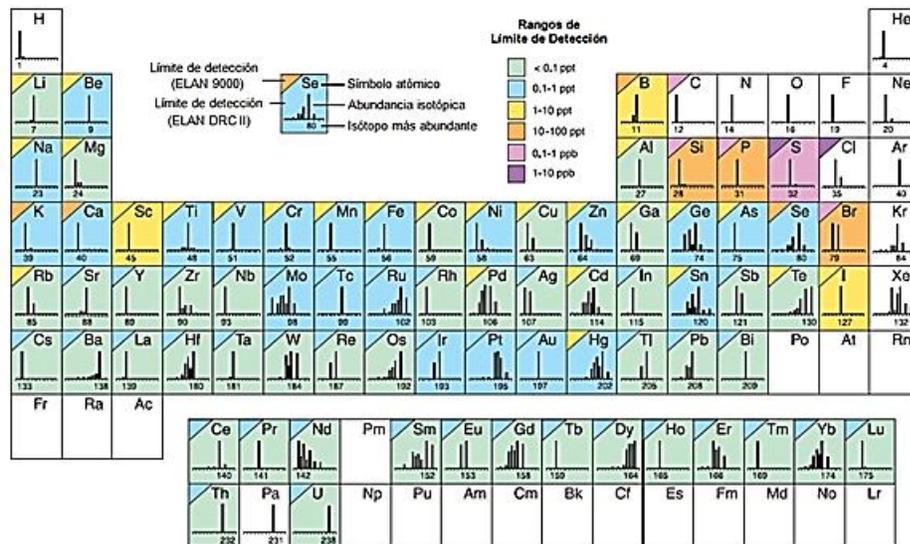


Figura 6. Capacidad del límite de detección en un equipo de ICP-MS (Editada de: PerkinElmer, 2003).

3.10.1. Componentes del espectrómetro de masas-plasma acoplado por inducción

En la actualidad hay diferentes diseños de ICP-MS disponibles, los cuales comparten entre sí componentes similares, tales como nebulizador, cámara de nebulización (o de “spray”), antorcha de plasma y detector; pero pueden diferir de forma bastante significativa en el



diseño de la interfase, en el sistema de enfoque iónico, en el dispositivo de separación de masas y en la cámara de vacío (Thomas, 2004).

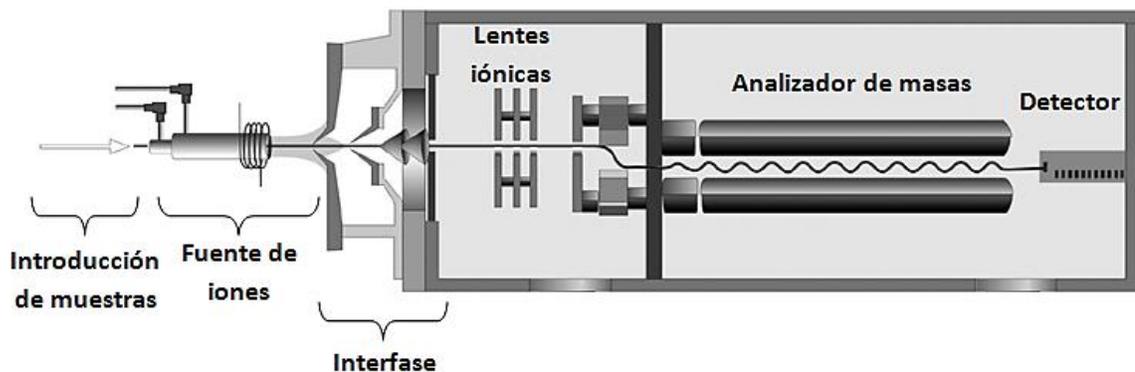


Figura 7. Componentes generales de un ICP-MS (Editada de: Košler y Sylvester, 2003).

A. Sistema de introducción de muestra

Es crucial que la introducción de una muestra en el ICP sea eficiente para la detección de elementos a diferentes concentraciones. Sin embargo, aunque la introducción de muestra ha sido una de las áreas más investigadas de la tecnología del ICP, las limitaciones en su eficacia siguen siendo evidentes (Dean, 2005) por lo que el área de introducción de muestra es considerada el componente más débil del instrumento, pues solamente del 1 al 2% del aerosol se logra dirigir hacia el plasma (Thomas, 2004).

La mayoría de las aplicaciones del ICP-MS actuales involucran el análisis de muestras líquidas, a pesar de que la técnica se ha adaptado, a lo largo de los años, para manejar sólidos y suspensiones. Existen diferentes maneras para introducir un líquido, pero todas básicamente consiguen el mismo resultado, que es, generar un aerosol fino de la muestra, para que pueda ser ionizado eficientemente en el plasma (Thomas, 2004).

El mecanismo de introducción de muestras líquidas puede ser considerado como dos eventos separados: la generación del aerosol mediante el uso de un nebulizador y



posteriormente, la selección de las gotas por medio de una cámara de nebulización (Thomas, 2004).

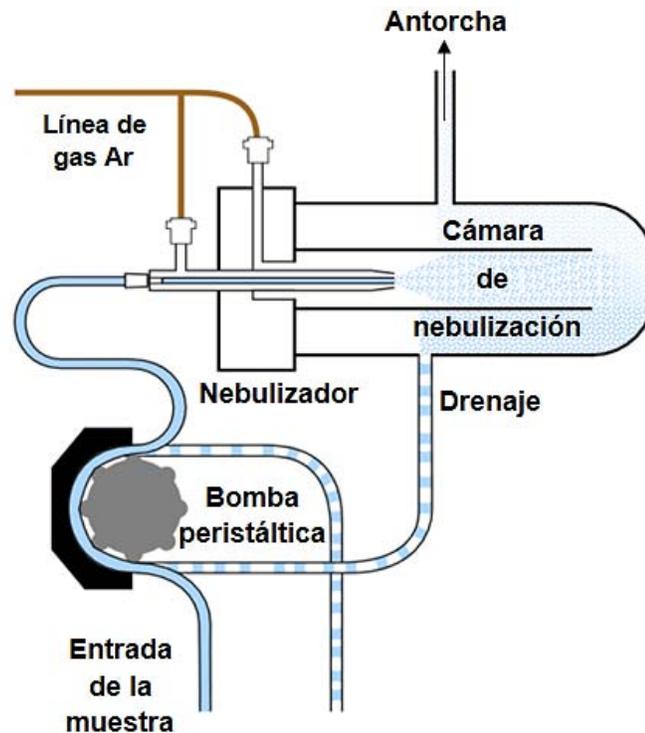


Figura 8. Componentes generales de un sistema de introducción de muestras (Editada de: Dunnivant y Ginsbach, 2009).

i. Bomba peristáltica

Es una pequeña bomba con una gran cantidad de mini rodillos que giran a la misma velocidad. El constante movimiento y presión de los rodillos en el tubo de la bomba alimenta a la muestra hacia el nebulizador a aproximadamente 1mL/min. La ventaja del uso de una bomba peristáltica es que garantiza un flujo constante de líquido, independientemente de las diferencias de viscosidad entre muestras, estándares y blancos (Thomas, 2004).

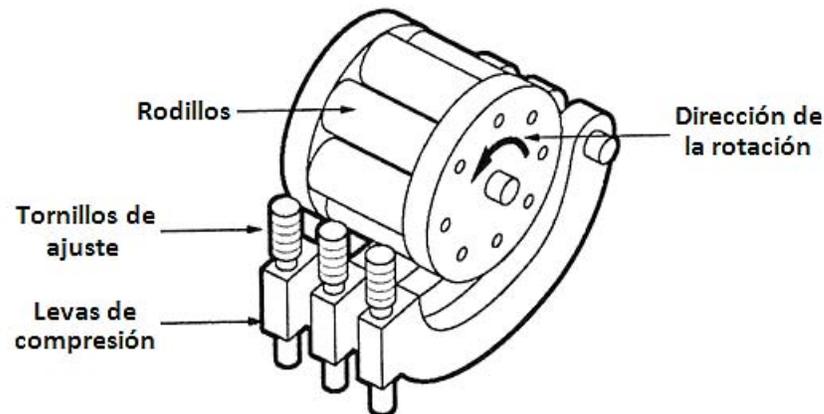


Figura 9. Esquema general de una bomba peristáltica (Editada de: PerkinElmer, 2008).

ii. Nebulizador

Existen diferentes tipos de nebulizadores, pero su principio de funcionamiento es esencialmente el mismo (Dean, 2005).

Generalmente están hechos de vidrio, aunque se están volviendo más usados los de diferentes tipos de polímeros (Thomas, 2004).

Entre los más comunes se encuentran el neumático concéntrico, el de flujo cruzado y el ultrasónico (Thomas, 2004).

El nebulizador de flujo cruzado es usado para muestras que contienen una matriz pesada o pequeñas cantidades de materia sin disolver (Thomas, 2004). Consiste de dos agujas capilares posicionadas a 90° entre sí, sin tocarse, donde la muestra líquida y el gas argón interactúan. El gas argón acarreador fluye hacia un tubo capilar, mientras que a través del otro capilar, se bombea la muestra líquida. En el punto de salida, la fuerza de escape del gas acarreador es suficiente para destruir la muestra en un aerosol grueso (Dean, 2005).

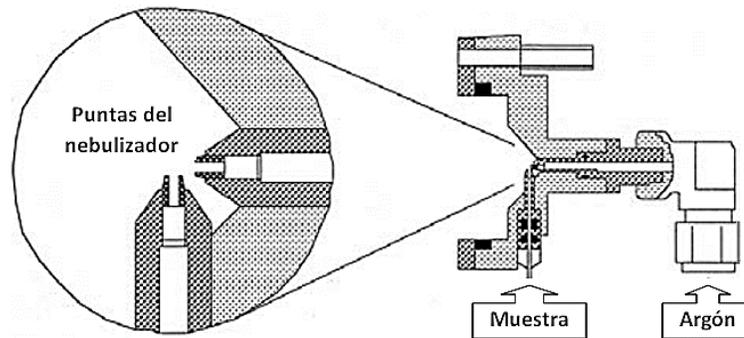


Figura 10. Esquema general de un nebulizador de flujo cruzado (Editada de: Thomas, 2004).

iii. Cámara de nebulización

La introducción del aerosol grueso, generado por los nebulizadores, directamente en la fuente de plasma extinguiría o enfriaría el plasma, conduciendo a severas interferencias de matriz. La inclusión de una cámara de nebulización produce un aerosol que es más apropiado para introducirse al plasma, ya que tiene los siguientes efectos (Dean, 2005):

- Reduce la cantidad de aerosol que llega al plasma
- Disminuye la turbulencia asociada con el proceso de nebulización
- Reduce el tamaño de partícula del aerosol

Se ha determinado que el tamaño de partícula ideal para que el proceso del plasma se lleve a cabo (atomización), seguido ya sea por excitación/emisión o ionización, es alrededor de $10\mu\text{m}$ (Dean, 2005).

Una cámara de nebulización ideal debería tener todas las siguientes características (Dean, 2005):

- Gran área de superficie, para inducir colisiones y fragmentación del aerosol grueso
- Volumen muerto mínimo, para evitar la dilución de la muestra
- Fácil eliminación de la muestra condensada a los residuos, sin provocar pulsos de presión



Varios diseños de cámaras de nebulización se encuentran disponibles, siendo las principales la de doble paso, la ciclónica y la de un solo paso o cilíndrica (Dean, 2005).

La cámara de doble paso o también llamada de tipo Scott, es la más común; está compuesta de dos tubos concéntricos, una entrada para el nebulizador, una salida para el aerosol más fino y un drenaje de residuos. Está colocada de manera que permita que el exceso de líquido fluya a los residuos. El aerosol generado en el nebulizador es introducido en el tubo interior y sale después de haber revertido su dirección (180°) hacia la antorcha del ICP. La interacción del aerosol grueso con las superficies internas de la cámara de nebulización de doble paso conduce a la producción de un aerosol más fino (con el consiguiente exceso de líquido yendo a los residuos). El diseño de este tipo de cámara también reduce la turbulencia del aerosol generado por el nebulizador, lo que conduce a una mayor estabilidad de la señal (Dean, 2005).

Algunas cámaras de nebulización, adicionalmente, se enfrían externamente para estabilizar térmicamente a la muestra y reducir al mínimo la cantidad de disolvente que entra en el plasma, lo cual tiene varios efectos benéficos, siendo los más importantes, la reducción de especies óxido y la habilidad de aspiración de solventes orgánicos (Thomas, 2004).

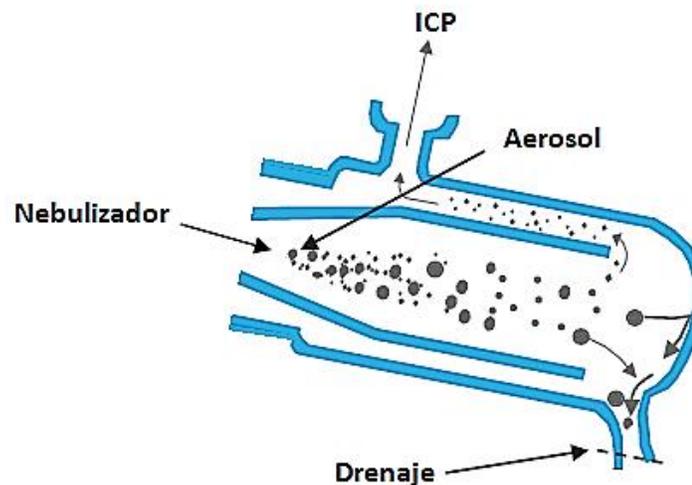


Figura 11. Esquema general de una cámara de nebulización tipo Scott (Editada de: Agilent Technologies, 2005).



B. Fuente de ionización

La fuente de iones es un componente esencial de todos los espectrómetros de masas para poder llevar a cabo la ionización de la muestra, sea ésta líquida, sólida o gaseosa. En la espectrometría de masas inorgánica, diversas fuentes de iones, basadas en diferentes procesos de vaporización e ionización, se han empleado con diferentes propósitos. Entre éstos se encuentra el plasma acoplado inductivamente, el cual en los últimos años se ha vuelto de gran importancia (Becker, 2007).

Un requerimiento importante para realizar análisis de cualquier tipo de muestra, mediante un espectrómetro de masas, es poder producir un haz de iones constante y de suficiente intensidad, por lo que debe hacerse una cuidadosa elección de la apropiada fuente de ionización de acuerdo a los componentes y características de la muestra (Becker, 2007).

Los procesos principales que ocurren en la fuente de iones son: evaporación de muestras sólidas o desolvatación y vaporización de líquidos, atomización de los compuestos gaseosos e ionización de los átomos y moléculas.

Generalmente para propósitos analíticos, en la espectrometría de masas inorgánica, solamente se emplean los iones atómicos del analito con una sola carga positiva (Becker, 2007).

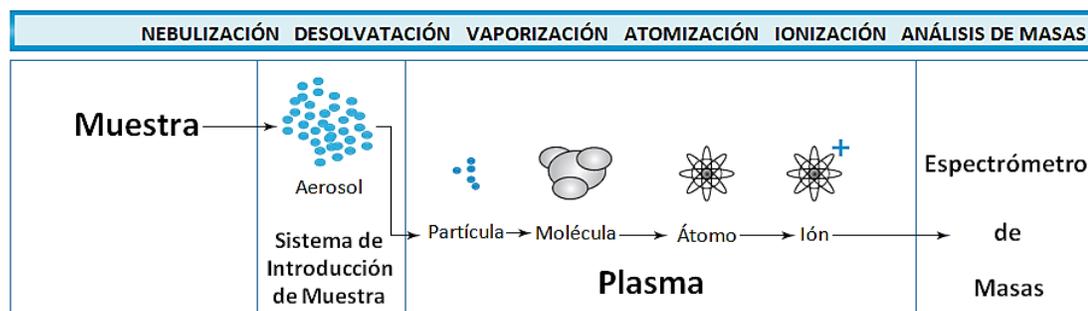


Figura 12. Procesos principales que ocurren en la fuente de ionización
(Editada de: Agilent Technologies, 2005).



Una vez que los iones son producidos en el plasma, es necesaria una región de interfase (formada por dos conos metálicos llamados muestreador y discriminador) y un sistema de lentes iónicas, para poder trasportarlos y dirigirlos hacia el espectrómetro de masas (Thomas, 2004).

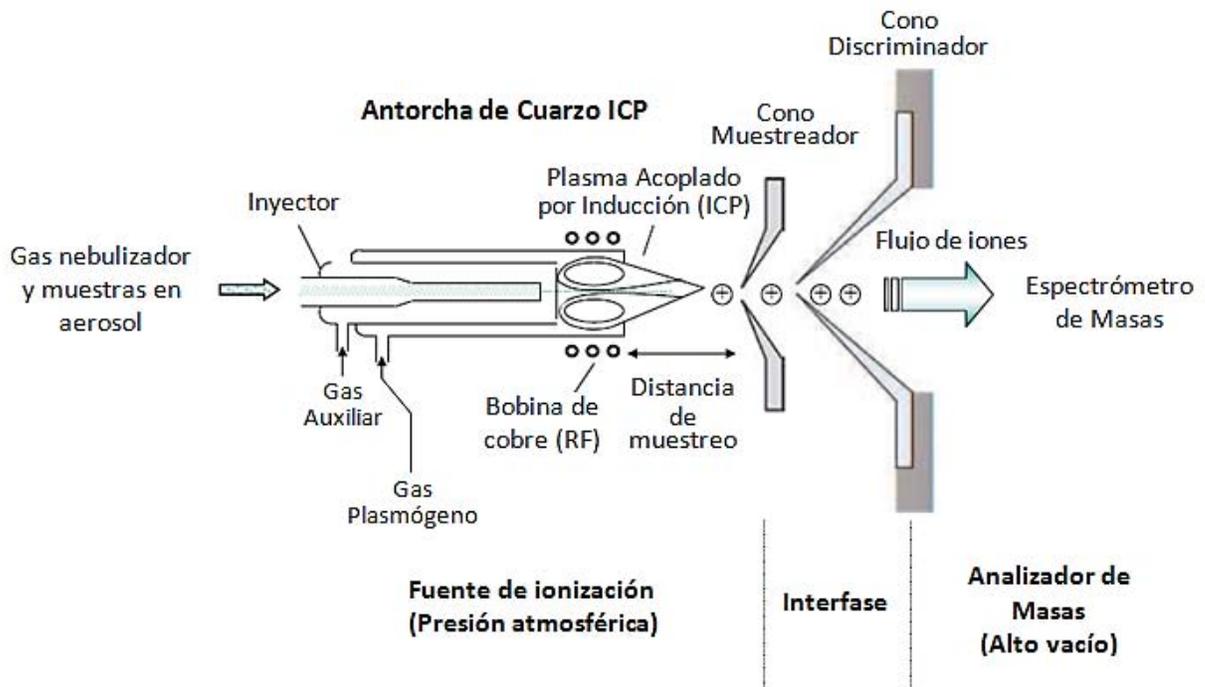


Figura 13. Esquema general de la fuente de ionización (Editada de: Becker, 2007).

i. Plasma acoplado por inducción

Un plasma es un gas altamente ionizado, eléctricamente neutro, compuesto de iones, electrones y partículas neutras (Rodríguez, 2001), formado a presión atmosférica en un entorno químicamente inerte (Becker, 2007). Generalmente se emplea gas argón de la más alta pureza (Thomas, 2004).

Los componentes básicos usados para generar una fuente de plasma son: una antorcha, una bobina de radiofrecuencia (RF) y una fuente de energía (Thomas, 2004).



La antorcha de plasma consiste de tres tubos concéntricos de diferentes diámetros, normalmente hechos de cuarzo (Thomas, 2004). Los tubos externo e intermedio se encuentran dispuestos tangencialmente al tubo interno (Dean, 2005). A través del tubo externo circula el gas plasmógeno (Ar), a una velocidad de flujo de ~12-17 L/min, este gas es el responsable de formar el plasma y enfriar la antorcha. Por el tubo intermedio fluye el gas auxiliar (igualmente Ar), a ~1L/min, el cual es aplicado para empujar el plasma sobre la parte superior del tubo interno y así prevenir que se sobrecaliente. Finalmente un tercer flujo de gas argón (nebulizador), igualmente a ~1L/min, fluye a través del tubo interno (inyector) trayendo la muestra en forma de un aerosol de finas gotas (Thomas, 2004).

Una fuente de ICP opera a una radiofrecuencia de 27 ó 40 MHz y a una potencia de 1-2 kW. La fuente de energía de la radiofrecuencia conduce la corriente a través de una bobina de inducción (hecha de cobre, la cual envuelve al tubo externo de la antorcha en forma de espiral) por la cual se recircula agua o aire (Becker, 2007). La potencia introducida provoca la inducción de un campo magnético oscilante (Dean, 2005).

Para poder encender el plasma, se provoca momentáneamente una chispa de alto voltaje (fuente de electrones), gracias a una bobina de Tesla, causando que los electrones en el plasma se aceleren debido al campo magnético oscilante y colisionen con los átomos y moléculas con el fin de ionizar los componentes del plasma (Becker, 2007).

El argón, los iones de argón y electrones coexisten en los confines de la antorcha, sobresaliendo de la parte superior en forma de una bala luminosa de color blanco y brillante (Dean, 2005).

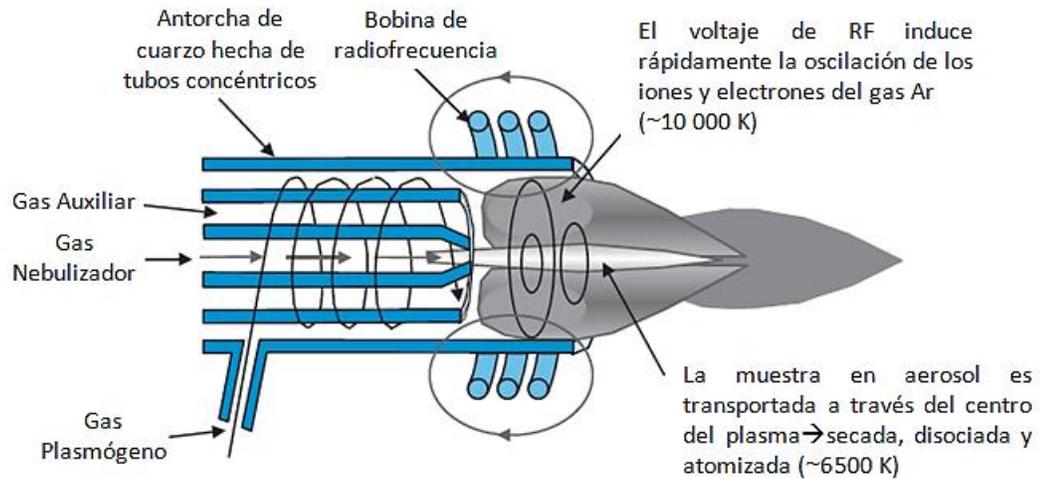


Figura 14. Esquema general de la antorcha del ICP (Editada de: Agilent Technologies, 2005).

La temperatura del plasma y la densidad de electrones están en función de los parámetros experimentales aplicados (radiofrecuencia, velocidad de flujo del gas nebulizador, diseño de la antorcha, entre otros). Normalmente, el ICP opera a una temperatura de aproximadamente 5 000 - 8 000 K, mientras que la temperatura de los átomos excitados es menor (entre 4 000 y 6 000 K) y la de los electrones es de entre 8 000 y 10 000 K con una densidad electrónica de $1\text{-}3 \cdot 10^{15} \text{ cm}^{-3}$ (Becker, 2007).

ii. Ionización de la muestra

Durante el recorrido de la muestra a través de las diferentes zonas de calentamiento del plasma, le ocurren diferentes cambios físicos. Comienza en la zona de precalentamiento, pasando posteriormente a la zona de radiación y finalmente por la zona analítica, de donde sale como un ión cargado positivamente. Dependiendo del estado en que se encuentre la muestra, serán los pasos que ocurrirán en el plasma, los cuales incluyen desolvatación, vaporización y formación de átomos en estado basal, los cuales finalmente se convertirán en iones, gracias principalmente, a colisiones entre electrones de argón energéticos y



átomos en estado basal. Los iones que emergen del plasma son dirigidos hacia la región de interfase, de donde serán transportados al analizador (Thomas, 2004).

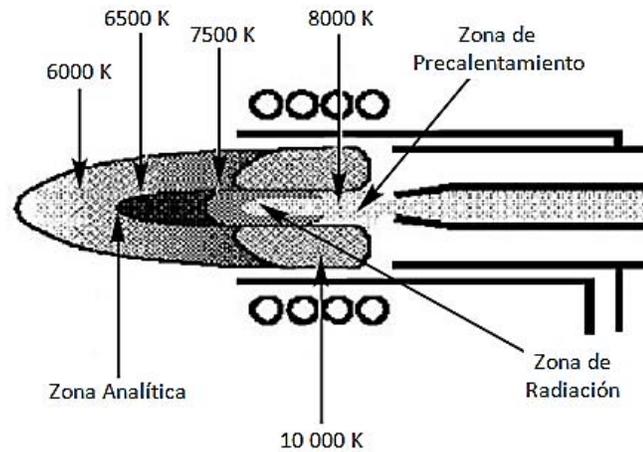


Figura 15. Zonas de calentamiento del plasma (Editada de: Thomas, 2001).

La eficiencia de ionización de una fuente de ICP depende de la energía de ionización (E_i) del elemento que desea ser analizado. Elementos con una energía de ionización menor a 8eV pueden ser ionizados con un rendimiento cercano al 100%. Pero si las primeras energías de ionización incrementan, la eficiencia de ionización disminuye (Becker, 2007).

iii. Región de interfase

La interfase consiste de dos conos metálicos con orificios muy pequeños, los cuales se mantienen a un vacío de ~1-2 Torr gracias a una bomba mecánica rotatoria de alta velocidad (Becker, 2007).

Su papel es transportar a los iones generados, de manera eficiente, consistente y con su integridad eléctrica, desde la región del plasma, que trabaja a presión atmosférica (760 Torr) hasta el analizador del espectrómetro de masas, que se encuentra al vacío (aproximadamente 10^{-6} Torr) (Thomas, 2004).



Después de que los iones son generados en el plasma, el diferencial de presión creado por el primer cono (muestreador) es tal que éstos, junto con el propio gas plasmático, son atraídos hacia la región de presión más baja a través del pequeño orificio del cono (0.8-1.2 mm). Como el flujo de gas a través del cono es muy grande, un segundo cono (discriminador) es colocado lo bastante cerca como para permitir que la porción central del flujo creciente de gas plasmático e iones pasen a través de su orificio, que es aún más pequeño (0.4-0.8 mm) (Dean, 2005 Thomas, 2004). Ambos conos están hechos usualmente de níquel, pero pueden ser igualmente de otros materiales como el platino, que es más resistente a líquidos corrosivos (Thomas, 2004).

Los iones extraídos son posteriormente enfocados por medio de una serie de lentes electrostáticas hacia el espectrómetro de masas (Dean, 2005).

El principal problema de la interconexión de un plasma de acoplamiento inductivo con un espectrómetro de masas es que la interfase debe permitir el acoplamiento entre el ICP atmosférico y el alto vacío del espectrómetro de masas, manteniendo al mismo tiempo un alto grado de sensibilidad (Dean, 2005).

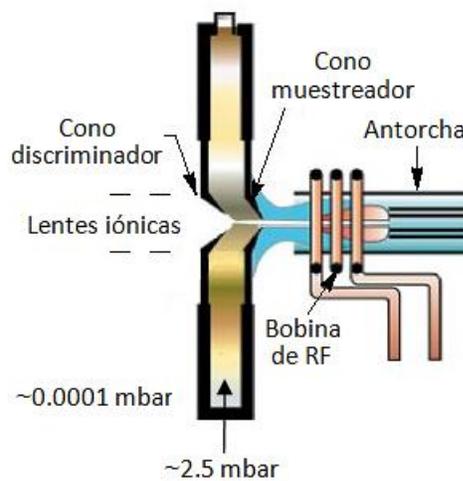


Figura 16. Esquema de la región de interfase (Editada de: Share PDF).



C. Sistema de enfoque de iones

Las lentes iónicas se encuentran posicionadas entre el cono discriminador y el dispositivo separador de iones y consisten de una o más lentes electrostáticas mantenidas a un vacío de aproximadamente 10^{-3} Torr, gracias a una bomba turbomolecular. Están compuestas de una serie de láminas, barras o cilindros metálicos a los cuales se les aplica un cierto voltaje. Su función es transportar el número máximo de iones de analito desde la región del plasma (a presión atmosférica), a través de la interfase y hasta llegar al dispositivo separador de masas (al alto vacío) (Thomas, 2004).

D. Sistema analizador de iones

Este dispositivo, componente esencial de un ICP-MS, tiene como objeto separar los iones del analito con una relación particular de masa/carga y filtrar todo lo que interfiera (Thomas, 2004).

i. Analizador de masas cuadrupolar

El analizador cuadrupolar consiste de cuatro rodillos metálicos rectos posicionados paralelamente en forma equidistante respecto a un eje central. Dos de ellos están cargados positivamente y dos negativamente. Los pares opuestos son sometidos a una combinación de voltajes de corriente directa y de radiofrecuencia, de tal forma que cambian su polaridad continuamente y, por ende, los iones que entran están sometidos a trayectorias oscilatorias, a través del eje del cuadrupolo. Seleccionando los voltajes apropiados de radiofrecuencia y corriente directa, solamente los iones con una relación masa/carga dada, serán capaces de atravesar la longitud de las barras y emerger en el otro extremo. Los otros iones se



pierden dentro, pues al ser sus trayectorias oscilatorias demasiado grandes e inestables, colisionan con los rodillos y son neutralizados (Dean, 2005).

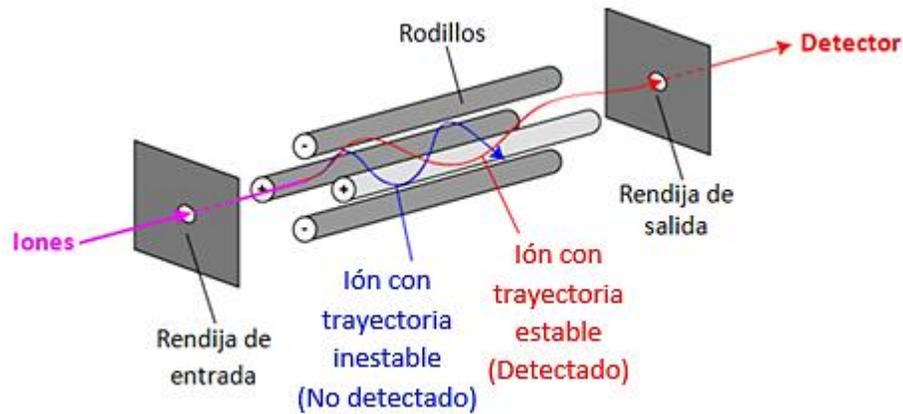


Figura 17. Analizador de masas cuadrupolar (Editada de: Gates, 2008).

El ICP-MS puede ser operado en dos modalidades claramente diferentes, es decir, con el filtro de masas transmitiendo solamente una relación masa/carga (para el monitoreo individual de iones) o con los valores de corriente directa y radiofrecuencia siendo cambiados continuamente (para el análisis multielemental). En el monitoreo individual de iones todos los datos se obtienen a partir de una sola relación masa/carga, mientras que para el análisis multielemental, es requerido un barrido de ambos voltajes. Este monitoreo y por tanto la adquisición de datos, pueden llevarse a cabo de tres modos diferentes (Dean, 2005):

- Un solo barrido continuo: la relación masa/carga es cambiada continuamente en un solo barrido, sin embargo, con el fin de reducir las fluctuaciones de iones e incrementar la precisión es mejor si la relación masa/carga se escanea de forma repetitiva.
- Salto de pico: la señal de los iones es medida dependiendo de la relación masa/carga seleccionada en un tiempo de espera determinado, lo que permite un análisis rápido y repetitivo de un conjunto predeterminado de elementos.



- Barrido multicanal: todas las relaciones masa/carga son escaneadas repetitivamente, proporcionando así una “huella digital” completa de la composición de muestras desconocidas.

E. Sistema de detección de iones

Cuando los haces de iones separados salen del sistema analizador de masas, los iones son colectados y detectados empleando un apropiado sistema de detección, que se encuentra dentro del ultra alto vacío del espectrómetro de masas (Becker, 2007). La función de este sistema consiste en convertir las corrientes de iones provenientes del analizador de masas, en señales eléctricas (Thomas, 2004).

Existen diferentes sistemas de detección de iones, siendo uno de los más importantes el multiplicador de electrones secundarios (Thomas, 2004).

i. Multiplicador de electrones secundarios

Es el detector de iones más usado actualmente, gracias a que aumenta la sensibilidad en varios órdenes de magnitud con respecto a otros diseños existentes. Su principio de operación es el siguiente: la corriente de iones positivos que incide sobre el primer plato (o dinodo de conversión), se transforma en una corriente de electrones secundarios, los cuales se aceleran, se enfocan y se hacen reincidir sobre la superficie del siguiente dinodo, del cual nuevamente se generan una gran cantidad de electrones secundarios. Este proceso se repite de 10 a 14 veces, consiguiendo una enorme cantidad de electrones. Con el fin de obtener una gran cantidad de electrones secundarios, los dinodos están conectados a potenciales positivos cada vez más altos. Opera en dos modos diferentes de detección, contador de pulsos e integrador de señales para altas tasas de recuento (Becker, 2007).

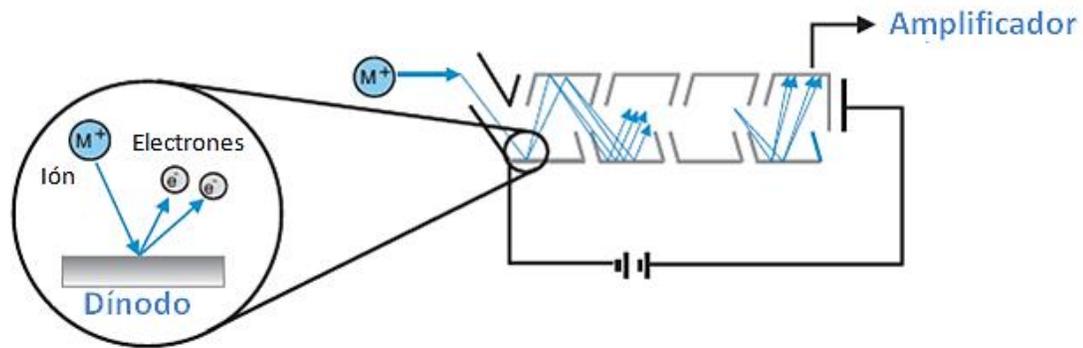


Figura 18. Multiplicador de electrones secundarios (Editada de: Agilent Technologies, 2005).

3.10.2. Problemas en la determinación de metales traza por ICP – MS

Adicionalmente a una multitud de ventajas en el empleo de un ICP-MS, esta técnica también tiene serias desventajas, como por ejemplo, procedimientos de preparación de muestra que consumen mucho tiempo, pérdida de analitos volátiles, gran riesgo de contaminación, pérdidas de analito durante la preparación de la muestra, entre otras que pueden surgir (Becker, 2007).

Dos de los problemas principales son, por un lado las interferencias que pueden afectar la señal del analito de interés y, por otro, la deriva instrumental que tiene el equipo. Sin embargo existen maneras de poder solucionarlos (Thomas, 2004).

A. Interferencias

Las interferencias que pueden ocurrir en el ICP-MS se encuentran clasificadas, de acuerdo a su origen, como espectrales y no espectrales (Dean, 2005). Gracias a la instrumentación moderna y a un buen software, combinado con metodologías analíticas optimizadas, se ha logrado minimizar su impacto negativo en las determinaciones de elementos a niveles traza mediante el ICP-MS (Thomas, 2004).



i. Interferencias espectrales

Son probablemente el tipo más grave de interferencias (Thomas, 2004).

Pueden ocurrir como resultado de la superposición de las masas atómicas de los diferentes elementos (isobáricas), por procesos moleculares (a consecuencia de los ácidos empleados para preparar la muestra y/o por el gas argón del plasma) y por la formación de óxidos, hidróxidos y especies doblemente cargadas (Dean, 2005).

Se dividen en:

- *Poliatómicas o moleculares*: Son producidas por la combinación de dos o más iones, debido a la interacción entre el elemento de interés y varios factores como el gas plasmático, el gas nebulizador empleado, los componentes matriciales de la muestra, los ácidos empleados en la preparación de la muestra o por el arrastre de oxígeno y/o nitrógeno del aire circundante (Dean 2005 y Thomas, 2004). Es probable que los iones poliatómicos se formen dentro de la interfase donde son sometidos a la transferencia, desde la fuente que se encuentra a presión atmosférica hasta el espectrómetro de masas que se encuentra al vacío. Como consecuencia, se puede estar registrando una señal debida no al elemento de interés, sino a la interferencia (Dean, 2005).
- *Óxidos, hidróxidos e hidruros*: Son producidas por la combinación de los elementos de la muestra con iones H^+ , $^{16}O^+$ ó $^{16}OH^+$ (provenientes ya sea del agua o del aire), para formar iones moleculares de hidruros, óxidos e hidróxidos. Este tipo de interferencias son típicamente producidas en las zonas más frías del plasma, inmediatamente antes de la región de la interfase (Thomas, 2004).



- Especies doblemente cargadas: Son especies que se forman cuando un ión es generado con una doble carga positiva, en lugar de una, produciendo en consecuencia un pico isotópico a la mitad de su masa. Como lo que se mide es la relación masa/carga de un isótopo en particular, si la carga (z) se altera (normalmente $z=1$), entonces la relación masa/carga resultante también lo hará; por lo que para una carga de dos ($z=2$), la relación se reducirá a la mitad (Dean, 2005). Al igual que con la formación de óxidos, se relaciona con las condiciones de ionización en el plasma y por lo general puede ser minimizado por optimización cuidadosa del flujo de gas nebulizador, la potencia de la RF y la posición de muestreo dentro del plasma (Thomas, 2004).
- Isobáricas: Son un traslape producido, principalmente, por diferentes isótopos de otros elementos de la muestra que crean interferencias a la misma masa que el analito (Thomas, 2004). Gracias a que aproximadamente el 70% de los elementos de la tabla periódica tienen más de un isótopo, por lo general pueden evitarse mediante la selección de un isótopo alternativo. Lo anterior puede ocasionar que en lugar de seleccionar el isótopo de interés con la mayor abundancia (pero con interferencias), se seleccione uno de menor abundancia que no las tenga, conduciendo potencialmente a una disminución en la sensibilidad si el elemento no se encuentra a una concentración lo suficientemente alta. Sin embargo, existen otras situaciones en las cuales no se tiene este tipo de soluciones (Dean, 2005).

Existen diferentes formas de compensar las interferencias espectrales, como lo son (Thomas, 2004):



- Eliminando la matriz: precipitándola con ayuda de algún agente acomplejante y filtrando posteriormente, o mediante técnicas automatizadas de eliminación de matriz/preconcentración de analito con ayuda de algún equipo de cromatografía.

- Empleando ecuaciones de corrección matemáticas: que corrigen la intensidad del analito cuando existe una especie interferente con la misma masa.

- Aplicando condiciones de plasma en frío: esta tecnología emplea un plasma de baja temperatura para minimizar la formación de ciertas especies poliatómicas (combinación entre el argón y los componentes de la matriz o de los solventes empleados), ya que cambian las condiciones de ionización en el plasma.

- Usando una celda de colisión/reacción (o celda de reacción dinámica): emplea las colisiones y reacciones ión-molécula para limpiar el haz de iones de interferencias poliatómicas y moleculares dañinas, antes de que entren al analizador de masas.

- Mediante analizadores de masas de alta resolución: es la mejor y más eficiente forma de eliminar traslapes, pero se sacrifica la sensibilidad que puede traducirse en una degradación en la capacidad de detección de algunos elementos.

ii. Interferencias no espectrales

También conocidas como interferencias de matriz o matriciales, resultan precisamente de problemas asociados con la matriz de la muestra, no obstante, su origen dentro del sistema puede variar. Su efecto resultante es una pérdida en la sensibilidad de determinados elementos (Dean, 2005).



Se dividen en:

- *Efecto de transporte*: Es una supresión física de la señal del analito debido a una elección incorrecta del mecanismo adecuado para la introducción de la muestra, igualmente puede contribuir el nivel total de sólidos disueltos (límite máximo tolerado de aproximadamente 2000 ppm (Agilent Technologies, 2005)) y la concentración de ácido en la muestra. Las consecuencias son obstrucción tanto en el nebulizador como en la cámara de nebulización y una acumulación de estos sólidos en el cono muestreador de la interfase del ICP-MS (Dean, 2005).

Existen diferentes soluciones que pueden aplicarse (Dean, 2005):

- Seleccionando un nebulizador adecuado
 - Haciendo una dilución acuosa de la matriz de la muestra (que puede conducir a disminuir la sensibilidad del analito de interés)
 - Empleando un flujo de inyección
 - Usando un estándar interno, lo cual compensa las fluctuaciones en la respuesta de la señal
 - Empleando estándares ajustados a la matriz
 - Aplicando un método de adiciones estándar
 - Acoplado en línea el ICP-MS con una técnica de separación por cromatografía
-
- *Problemas asociados con el espectrómetro de masas*: Aunque los efectos de la discriminación de las masas, que generalmente resultan en una menor sensibilidad, se pueden observar experimentalmente en el espectrómetro de masas, su mecanismo exacto no se conoce (Dean, 2005).



B. Deriva instrumental

Es la variación de las intensidades de señal, surgida cuando la respuesta del instrumento cambia con el transcurso del tiempo. Está asociada al efecto de las variaciones de la temperatura ambiente sobre la estabilidad de los circuitos electrónicos, a cambios en el suministro de corriente eléctrica, a variaciones en la velocidad de introducción de la muestra, a la cantidad de partículas suspendidas en la muestra (Cheatham, Sangrey y White, 1993), las cuales pueden provocar la obturación parcial de los conos debido a la acumulación de material en ellos, al deterioro de las conducciones plásticas por las que circula la muestra, entre otras posibles causas que dependen de las características del equipo y de la muestra a analizar. Para su corrección se emplea el método del estándar interno (E.I., ver punto **3.13**) (Litter, Armienta y Farías, 2009).

3.10.3. Preparación de muestra

No existe una preparación ideal de muestras para su introducción en un equipo de ICP, ya que depende en gran medida del tipo de muestra que se tenga. En general, las muestras líquidas necesitan al menos una filtración, una dilución o una preconcentración y las sólidas una destrucción de la matriz para poder liberar los metales presentes (Dean, 2005).

Para el presente trabajo se considerará solamente el tratamiento para muestras sólidas, por ser de esta naturaleza con las que se trabajó.

A. Muestras sólidas

Para este tipo de muestras también existen diferentes técnicas de tratamiento previo a la introducción en el equipo (Dean, 2005).



Se profundizará en ellas al ser de la misma naturaleza que con las que se trabajó para el presente trabajo:

i. Técnicas de descomposición

Se realiza mediante una digestión ácida, empleando ácidos minerales oxidantes y una fuente externa de calentamiento para poder descomponer la matriz de la muestra. La elección de un solo ácido o de una combinación de varios depende de la naturaleza de la matriz que se quiere descomponer.

Ácido	Punto de ebullición (°C)	Observaciones
Clorhídrico (HCl)	110	Para sales de carbonatos, fosfatos, algunos óxidos y sulfuros. Agente reductor débil, en general, no se emplea para materia orgánica.
Sulfúrico (H₂SO₄)	338	Para la liberación de productos volátiles; buenas propiedades oxidantes para minerales, metales, aleaciones, óxidos e hidróxidos; a menudo empleado en combinación con HNO ₃ .
Nítrico (HNO₃)	122	Ataque oxidante en muchas muestras no disueltas por el HCl; libera elementos traza como sales solubles de nitrato. Usado para la disolución de metales aleaciones y muestras biológicas.
Perclórico (HClO₄)	203	Fuerte agente oxidante para materia orgánica. Las muestras por lo general son previamente tratadas con HNO ₃ .
Fluorhídrico (HF)	112	Para la digestión de materiales a base de sílice; forma SiF ₆ ²⁻ en solución ácida.
Agua Regia (HNO₃/HCl)	---	Se obtiene al mezclar HNO ₃ /HCl a 1:3 V/V, formando el reactivo intermedio NOCl. Usado para metales, aleaciones, sulfuros y otros minerales. Es mejor conocida por su habilidad de disolver Au, Pd y Pt.

Tabla 3. Ejemplos de ácidos empleados para la descomposición por vía húmeda (Editada de: Dean, 2005).



Una vez elegido el ácido, se coloca la muestra en un vaso apropiado para la etapa de descomposición. La elección del vaso depende de la fuente de calentamiento que se vaya a emplear, generalmente se realiza en vasos de vidrio abiertos, empleando como fuente de calentamiento una parrilla o un digestor de muestras múltiple que permite colocar un número determinado de tubos de ebullición para ser digeridos.

ii. Digestión con microondas

El primer reporte de uso de un horno de microondas para la digestión ácida de muestras para análisis de metales fue en 1975. Gracias a los avances tecnológicos actualmente existen dos tipos de sistemas de calentamiento con microondas comercialmente disponibles:

–Abierto: Varias muestras pueden ser calentadas simultáneamente; el ácido y la muestra son introducidos en un contenedor de vidrio con apariencia de tubo de ensayo, también está equipado con un condensador para evitar pérdidas volátiles. Posteriormente es colocado dentro del sistema y calentado. El uso de vasos abiertos para la digestión puede ocasionar algunos problemas asociados con la pérdida por volatilización de algunos elementos, lo cual se puede evitar haciendo una buena elección de los reactivos usados y el tipo de aparato de digestión empleado.

–Cerrado: En este sistema varias muestras pueden ser irradiadas simultáneamente, incluye una función que permite el monitoreo tanto de la presión como de la temperatura y lo más importante, está equipada con una alarma para avisar si se produce una liberación de sustancias tóxicas o inflamables. Todas las muestras se colocan en un



carrusel que se encuentra localizado dentro de la cavidad del microondas para posteriormente llevar a cabo el programa de calentamiento determinado.

iii. Incineración en seco

Es el sistema de descomposición más simple, consiste en el calentamiento de la muestra en un crisol de sílice o de porcelana dentro de una mufla a una temperatura de entre 400 y 800 grados centígrados. El residuo resultante es disuelto en un ácido mineral.

iv. Fusión

Algunas sustancias no son normalmente destruidas por la acción de ácidos minerales, por lo cual es necesaria una alternativa. La fusión implica la adición de un exceso de reactivo (10 veces) a la muestra finamente molida la cual se coloca en un crisol y posteriormente se coloca en una mufla a una temperatura de entre 300 y 1000°C. Después de calentarla durante un lapso específico de tiempo se obtiene una masa transparente fundida, lo cual indica que se logró íntegramente la descomposición. Cuando se haya enfriado puede ser disuelta en un ácido mineral. Algunos de los reactivos empleados para la fusión (fundentes) son: carbonato de sodio, metaborato o tetraborato de litio y piro sulfato de potasio. Dependiendo del fundente empleado será el ácido mineral en el que se disolverá al finalizar la fusión. El problema de esta técnica, es que la adición de un exceso de reactivo, puede conducir a un alto riesgo de contaminación y a problemas para su análisis en el equipo.

3.11. Precauciones para el análisis elemental a niveles traza

Debido a que el riesgo de contaminación es un gran problema al realizar análisis a niveles traza, se requiere tomar en cuenta algunas precauciones necesarias, como son la pureza



de los reactivos químicos que se emplearán en su tratamiento y la limpieza tanto del área de trabajo como de los recipientes que contendrán a las muestras (Dean, 2005).

3.12. Evaluación de un método analítico

Un método analítico es un procedimiento técnico específico para desarrollar una prueba (ensayo) cualitativo o cuantitativo. Se conoce como método de medición cuando es cuantitativo, y se define como la secuencia lógica de operaciones usada para realizar mediciones. Describe clara y exactamente las condiciones y procedimientos necesarios para la medición de uno o más valores de la propiedad, demostrando tener exactitud y precisión de acuerdo con su propósito de uso y que por tal motivo puede ser reproducible (ser usado para evaluar la exactitud de otros métodos por la misma medición) (Cenam, 2008).

La validación de un método es el proceso de verificación de que un método es adecuado a su propósito, o sea, resuelve un problema analítico particular. Un método debe ser validado (al menos en algún grado) cuando sea necesario verificar que sus parámetros de desempeño son adecuados para el uso en un problema analítico específico, como lo son (Eurachem, 2005):

- un nuevo método desarrollado para un problema específico
- un método ya establecido al que se desean incorporar mejoras o extenderlo a otro problema
- un método que ha cambiado con el tiempo
- un método establecido usado en un laboratorio diferente o con diferentes analistas/instrumentación
- demostrar equivalencia entre dos métodos



El alcance de la validación dependerá de la naturaleza de los cambios hechos (Eurachem, 2005).

3.12.1. Parámetros de desempeño

Son elementos (características) del método analítico que necesitan ser evaluados para poder realizar su validación. Al realizar la determinación de estos parámetros, el método es más confiable, disminuyendo el número de fallas y proporcionando mejor calidad en los resultados que se obtengan (García, 2012).

El estudio de los parámetros de desempeño está ligado estrechamente con el desarrollo del método, ya que muchos son evaluados, por lo menos de manera aproximada, como parte de su desarrollo experimental (Eurachem, 2005).

El laboratorio debe decidir cuáles de los parámetros de desempeño del método necesitan caracterizarse. A menudo con una serie específica de experimentos puede obtenerse información sobre varios de ellos, por lo que con una buena planificación se puede obtener la información necesaria (Eurachem, 2005).

A. Límite de detección (LoD)

Conocida también como concentración o valor neto mínimo detectable, es la menor concentración de analito en una muestra, que puede detectarse con certeza razonable por un procedimiento analítico dado, pero no necesariamente cuantificarse bajo las condiciones establecidas en la prueba.

Cuando se realizan mediciones a niveles bajos del analito o de la propiedad relacionada, como en el análisis de trazas, es importante saber cuál es su concentración más baja que puede detectarse confiablemente por el método.



Normalmente, es suficiente proporcionar un indicativo del nivel al cual la detección resulta problemática, por lo cual, la aproximación “blanco + 3s”, usualmente lo es. Donde “blanco” es el promedio de las concentraciones de un grupo de blancos de muestra y “s” es la desviación estándar de la concentración de estos blancos de muestra. En los casos en que sea muy difícil o prácticamente imposible preparar blancos de muestra, se podrá aproximar con blancos reactivos (Eurachem, 2005).

B. Límite de cuantificación (LoQ)

También conocido como límite de reporte o de determinación, es la menor concentración de un analito que puede cuantificarse con valores de precisión, repetibilidad y veracidad aceptables bajo las condiciones experimentales establecidas en la prueba (Vega, 2011).

También se define, por diversas convenciones, como la concentración del analito correspondiente al valor del blanco de muestra más 5, 6 ó 10 desviaciones estándar de la media del blanco (“blanco + 5, 6 ó 10s”), donde igualmente “blanco” es el promedio de las concentraciones de un grupo de blancos de muestra y “s” es la desviación estándar de la concentración de estos blancos de muestra, y en los casos en que sea muy difícil o prácticamente imposible preparar blancos de muestra, se podrá aproximar con blancos reactivos (Eurachem, 2005).

C. Intervalos lineal y de trabajo

Son los intervalos de concentraciones del analito o de los valores de la propiedad relacionada, sobre los cuales el método puede aplicarse (Eurachem, 2005):



–**Lineal:** capacidad de un método analítico para dar resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del analito dentro de un intervalo dado (Vega, 2011). En el extremo o límite inferior del intervalo de concentración, los factores limitantes son los valores del límite de detección y/o cuantificación, y en el extremo superior las limitaciones serán impuestas por varios efectos que dependen del sistema de respuesta del instrumento.

Los cálculos de regresión por sí solos son insuficientes para establecer la linealidad, por lo que puede ser necesario hacer una inspección visual de la línea y de los residuales. En general, las revisiones de linealidad requieren de al menos 10 puntos a diferentes concentraciones o valores de la propiedad relacionada (Eurachem, 2005).

–**Trabajo:** también conocido como intervalo de medición, es el conjunto de valores del mensurando para los que se ha demostrado que el analito es cuantificado con un nivel satisfactorio de repetibilidad, recuperación y linealidad (Vega, 2011). Es obtenido a través de la medición de muestras con diferente concentración de analito, preferentemente más de 6. En el extremo o límite inferior del intervalo de concentración, los factores limitantes son los valores del límite de cuantificación, y en el extremo superior las limitaciones serán impuestas por las características propias de las muestras y el material de referencia certificado (MRC, ver punto 8.1.) empleado (Eurachem, 2005).



D. Exactitud

Es la proximidad o grado de concordancia entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado como verdadero (Eurachem, 2005).

Se determina mediante el porcentaje de error relativo, el cual para ser aceptado, debe ser menor a $\pm 30\%$ (DeSilva, Smith, Weiner, Kelley, Smolec, Lee, Khan, Tacey, Hill y Celniker, 2003).

E. Precisión

Es la proximidad de concordancia entre resultados de pruebas independientes obtenidos bajo condiciones estipuladas. Es una medida de qué tan cercanos están los resultados unos con respecto a otros, expresada generalmente mediante medidas, tal como la desviación estándar (que describe la dispersión de los resultados) (Eurachem, 2005).

La precisión se determina por lo general, mediante el porcentaje de la desviación estándar relativa (%RSD, por sus siglas en inglés) y el método será preciso si su valor es $\leq 20\%$ (European Commission, 2013).

F. Sensibilidad

Es el cambio en la respuesta del instrumento que corresponde a un cambio en la concentración del analito (la pendiente de la curva de respuesta). Se establece dentro del intervalo lineal del método (Eurachem, 2005).

G. Recuperación

Proporción de la cantidad de analito, presente en la porción de la muestra o adicionado a ésta, que es cuantificada por el método de ensayo. Normalmente se emplea su valor en



porcentaje (% de recuperación) de analito presente agregado a una muestra de control de calidad, en donde se evalúa la eficiencia de extracción, proceso de preparación o interferencias que pueden existir al aplicar el método de ensayo (Cenam, 2008).

Una forma de llevar a cabo estos estudios es sobre materiales de referencia adecuados, siempre que provengan de materiales naturales y no sintéticos en los que el analito ha sido agregado (Eurachem, 2005).

H. Selectividad

Capacidad de un método para determinar exacta y específicamente el analito de interés en presencia de otros componentes, en una matriz de muestra, bajo las condiciones de prueba establecidas (Cenam, 2008).

Es una medida que garantiza la confiabilidad de las mediciones en presencia de interferencias. Usualmente se investiga mediante el estudio de su capacidad para medir el analito de interés en porciones de prueba a las cuales deliberadamente se introducen interferencias específicas o, si no se está seguro de que están presentes, se estudia su capacidad de medir el analito comparado con otros métodos o técnicas independientes (Eurachem, 2005).

I. Robustez

Medida de la capacidad del método para permanecer inalterado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método, proporcionando una indicación de su confiabilidad durante su uso normal (Cenam, 2008).



Por lo general se evalúa durante el desarrollo del método dentro del laboratorio para analizar el comportamiento de un proceso analítico cuando se efectúan pequeños cambios en las condiciones ambientales y/o de operación (Eurachem, 2005).

3.13. Método del estándar interno (E.I.)

Este método se aplica principalmente para la medición de muestras simples o complejas, donde el detector del instrumento de medición es sensible a la matriz, y sólo puede aplicarse a aquellas técnicas de medición cuyo sistema de detección es simultáneo (Lucio, 2011).

En este método una cantidad fija de una sustancia pura llamada estándar interno (E.I.) se añade en concentración conocida e igual a todas las muestras y estándares de calibración.

Posteriormente se determinan las respuestas del analito y del E.I., la señal analítica será la señal del analito dividida por la señal del E. I., de esta manera si se varía algún parámetro que afecte a las respuestas medidas, dichas respuestas se deben afectar por igual. Por lo tanto, el cociente de respuestas depende solamente de la concentración de analito.

Con este método se corrigen las fluctuaciones aleatorias de la señal y las variaciones sistemáticas de la señal analítica en muestras y estándares debidas a los efectos de matriz.

Para que un elemento sea prospecto para adicionarse como E.I., debe de ser influido de la misma manera que el analito en estudio dentro del ICP-QMS (naturaleza similar) y además no debe de afectar la determinación (que no genere interferencias isobáricas o poliatómicas), por tal motivo tiene que cumplir con las siguientes características:

- Tener una masa isotópica próxima a la del isótopo analito (lo cual ayuda también a mejorar la precisión)



- Tener una energía de ionización parecida a la del isótopo analito
- Debe ser un metal que no esté presente en la matriz de interés

También es necesario considerar que su concentración debe ser aproximadamente del mismo orden de magnitud que la del analito en la muestra (Litter et al., 2009, PerkinElmer, 2008 y Thomas, 2004).



4. EXPERIMENTACIÓN

4.1. Equipos e instrumentos

- *Estufa de secado*→Heraeus, RB360
- *Equipos de digestión vía húmeda en sistema cerrado*→Milestone Microwave Laboratory Systems, MLS 1200 Mega y CEM Microwave Technology Ltd, MDS 2000
- *Balanza analítica*→Sartorius, BP 221s
- *Espectrómetro de Masas – Plasma Acoplado por Inducción (ICP – MS)*→Perkin Elmer SCIEX, Elan DRC-e, Axial Field Technology
- *Desionizador de agua*→Barnstead, WA 52001

4.2. Reactivos y soluciones

- HNO₃Instra (69,0 - 70,0% V/V) J. T. Baker
- H₂O₂ Ultrex (30% V/V) J. T. Baker
- HNO₃ (Grado R. A) J. T. Baker
- Detergente libre de fosfatos, HYCLIN®
- Agua desionizada (18MΩ/cm; 0ppm de NaCl)
- Estándar de Cu, 1000 mg/L, High Purity Standards
- Estándar de Zn, 1000 mg/L, High Purity Standards
- Estándar de Y, 1000 mg/L, High Purity Standards
- Estándar de Sc, 1008 mg/L, High Purity Standards
- Estándar de Ru, 1000 mg/L, High Purity Standards
- Estándar de Ga, 1010 mg/L, High Purity Standards



- Estándar de Ge, 1000 mg/L, High Purity Standards
- Material de Referencia Certificado (MRC), hígado de bovino 1577c, National Institute of Standards and Technology (NIST). (Ver punto **8.1.**)
- Material de Referencia Certificado (MRC), hígado de bovino en solución, High Purity Standards (HPS), lote: 529004. (Ver punto **8.6.**)
- 7 tanques de argón de Ultra Alta Pureza (UAP) 5.0 mínimo (99.999%)
- Solución “Daily”, Smart tune solution Std ELAN & DRC-e al 1% HNO₃. 10µg L⁻¹ Ba, Be, Ce, Co, In, Mg, Pb, Rh y U. Perkin Elmer Pure, Atomic Spectrometry Standard

4.3. Material

- Charolas de poliestireno (3 x 5cm)
- Matraces aforados de 10 y 5mL
- Espátula
- Papel filtro No. 42, Whatman
- Micropipetas (20 – 200µL, 100 – 1000µL y 500 – 5000µL) con sus respectivas puntas
- Recipientes de plástico de 25, 50 y 100mL
- Gradilla para tubos de ensayo
- Pipetas beral de 3mL
- Embudos de polipropileno para filtración rápida
- Bolsas de plástico con sello hermético
- Vasos de digestión para hornos de microondas (Milestone y CEM)



4.4. Procedimiento experimental general

4.4.1. Lavado de material

Debido a que la contaminación es un gran problema en análisis elementales a niveles traza, esta etapa del procedimiento es un paso de suma importancia para poder obtener resultados confiables, pues el material (vidrio o plástico) debe encontrarse limpio, ya que está en contacto con las muestras, el material de referencia y los reactivos. Por esta razón, se recomienda llevar a cabo un tratamiento de limpieza previo a su empleo, que incluya el uso de un detergente, un ácido y agua desionizada que ayuden a su descontaminación (Dean, 2005):

1. Ya sea material nuevo o usado anteriormente, se enjuaga con abundante agua de la llave, en caso de haber etiquetas o marcador se remueve con una esponja y detergente.
2. Se coloca en una solución de detergente neutro libre de fosfatos HYCLIN® al 15 %V/V (o se usa algún detergente de la misma naturaleza) y se deja reposar por 8 horas.
3. Se saca de la solución y se enjuaga nuevamente con abundante agua de la llave, para remover todos los residuos del detergente.
4. Posteriormente se pasa a un baño de ácido nítrico (HNO_3 , Grado R.A.) al 30% V/V durante 8 horas.
5. Se saca del baño de ácido y se realiza un último enjuague, 10 veces con agua desionizada (calidad grado 18M Ω).
6. Se deja secar en un lugar limpio y protegido del ambiente.
7. Cuando se encuentre seco, se almacena en bolsas de polietileno herméticas en un lugar limpio.



Los conos muestreador y discriminador del equipo de ICP-MS se lavaron con jabón libre de fosfatos y enjuagados con agua desionizada después de cada sesión de trabajo.

4.4.2. Tratamiento del material de referencia certificado y de las muestras

A. Descripción y procedencia

i. Material de Referencia Certificado

Hígado de bovino 1577c, adquirido del National Institute of Standards and Technology (NIST).

Element	Unit	Mass Fraction	Element	Unit	Mass Fraction
Ag ^(A,B,b,C)	µg/kg	5.9 ± 1.6	Mn ^(A,a,b,D,d)	mg/kg	10.46 ± 0.47
As ^(C)	µg/kg	19.6 ± 1.4	Mo ^(A,a,b,C,D,d)	mg/kg	3.30 ± 0.13
Ca ^(A,a,D,d)	mg/kg	131 ± 10	Na ^(A,a,d)	%	0.2033 ± 0.0064
Cd ^(C,E)	µg/kg	97.0* ± 1.4	Ni ^(B,b,c)	µg/kg	44.5 ± 9.2
Co ^(A,a,b)	mg/kg	0.300 ± 0.018	Pb ^(E)	µg/kg	62.8 ± 1.0
Cr ^(A)	µg/kg	53 ± 14	S ^(a,D,d,F)	%	0.749 ± 0.034
Cu ^(A,a,C,D,d)	mg/kg	275.2 ± 4.6	Se ^(A,E)	mg/kg	2.031 ± 0.045
Fe ^(A,a,D)	mg/kg	197.94 ± 0.65	Sr ^(B,b,d)	µg/kg	95.3 ± 4.2
K ^(A,a,d,F)	%	1.023 ± 0.064	V ^(c,d,G)	µg/kg	8.17 ± 0.66
Mg ^(A,a,D,d)	mg/kg	620 ± 42	Zn ^(A,a,D,E,h)	mg/kg	181.1 ± 1.0

Figura 19. Concentraciones certificadas de algunos metales presentes en el MRC Hígado de bovino (ver punto 8.1.), (NIST 1577c, 2009).

ii. Muestras

Tejidos de órganos de ratones macho: bazo, hígado, pulmón, riñón, testículo y timo; conservados en formol dentro de viales de vidrio o plástico. Fueron proporcionados por la Dra. Teresa Fortoul Van der Goes y su equipo, de la Facultad de Medicina (UNAM).



B. Tratamiento físico

i. Material de Referencia Certificado

Debido a que se encuentra disponible en el mercado como un polvo fino y seco, no se le tiene que hacer un tratamiento físico previo, por lo que solamente debe de mantenerse bien cerrado, en un lugar seco y a temperatura ambiente. (NIST, 2009).

ii. Muestras

Para su tratamiento, las muestras fueron decantadas del formol y se colocaron en charolas de poliestireno limpias, las cuales fueron introducidas a la estufa de secado (Heraeus) a una temperatura de 80°C hasta encontrarse a peso constante, tiempo que se estableció de una semana, gracias a que se realizó un monitoreo del peso de diversas muestras y a las respectivas curvas de secado que se obtuvieron (ver punto **8.2.**).

C. Tratamiento químico

Posteriormente tanto a las muestras como al MRC se les aplicó un tratamiento químico, realizando un proceso de digestión vía húmeda en sistema cerrado, utilizando un equipo de microondas, para así destruir la matriz de la muestra y liberar los metales presentes en forma de sales solubles (nitratos de cobre y zinc en este caso, por haber usado ácido nítrico).

i. Material de Referencia Certificado

- 1) En la balanza analítica, sobre charolas de poliestireno limpias, se pesan 0.5 g de MRC.
Se realizan 4 réplicas.



- 2) Se colocan las masas del MRC en los vasos de teflón pertenecientes al horno de microondas MILESTONE.
- 3) Se agregan por medio de pipetas beral, 2mL de HNO₃ (70% V/V, INSTRA) y 1mL de H₂O₂ (30% V/V, ULTREX).
- 4) Se preparan dos blancos reactivos, en dos vasos de teflón, agregando las mismas cantidades de HNO₃ (70% V/V, INSTRA) y H₂O₂ (30% V/V, ULTREX) que se agregaron al MRC, esto nos servirá para poder conocer si los reactivos aportan alguna cantidad de los analitos en estudio a la concentración final (Mesko et al., 2011, Becker, 2007 y Pozebon, Dressler, Becker, Matusch, Zoriy y Becker, 2008).
- 5) Se colocan los vasos en sus respectivos lugares del carrusel del microondas y se lleva a cabo la digestión con un programa previamente determinado (ver punto **8.3.**).
- 6) Posteriormente se dejan enfriar los vasos hasta que se encuentren a temperatura ambiente (aproximadamente 20 minutos).
- 7) Se filtra la solución obtenida (papel filtro Whatman, no. 42) en matraces aforados de 10mL y se llevan al aforo con agua desionizada.
- 8) Las soluciones se trasvasan a recipientes de plástico limpios y se refrigeran hasta su posterior tratamiento.

ii. Muestras

- 1) Cuando ya están secas las muestras, se retiran de la estufa y se registra su peso.
- 2) Se colocan las muestras en cada uno de los vasos de teflón pertenecientes al horno de microondas, dejando un vaso sin muestra para preparar el blanco de reactivos.
- 3) Al ser muestras únicas y encontrarse en muy escasa cantidad, para llevar a cabo su digestión, fue necesario su completo uso, por lo que se estipuló una discriminación de



éstas para determinar las cantidades de reactivos que se agregarían dependiendo de un rango de peso marcado:

- a. Si la muestra tiene una masa mayor a 0.4g, se agregan 2mL de ácido nítrico (INSTRA) y 1mL de peróxido de hidrógeno (ULTREX).
- b. Si la muestra tiene menor masa que 0.4g, se agregan solamente la mitad de los reactivos, lo que quiere decir 1mL de ácido nítrico (INSTRA) y 0.5mL de peróxido de hidrógeno (ULTREX).

Se busca que todas las muestras de la serie que se van a introducir en el horno de microondas tengan pesos similares para que su blanco reactivo contenga las mismas cantidades de reactivos que se plantearon anteriormente y sea representativo.

- 4) Se colocan los vasos de teflón en el carrusel del horno de microondas y se selecciona el programa de digestión adecuado al horno a emplear (ver punto **8.3.**).
- 5) Se dejan enfriar a temperatura ambiente.
- 6) Se filtra (papel filtro Whatman, no. 42) y se afora con agua desionizada en matraces volumétricos. Igualmente, si la muestra tiene una masa inferior a 0.4g el aforo se realiza a 5mL, y si es mayor a 0.4g se afora a 10mL.
- 7) Se trasvasan a recipientes de plástico limpios y se refrigeran para su posterior tratamiento y análisis.

4.4.3. Diluciones gravimétricas

La dilución del MRC y las muestras se realiza con el fin de corregir los efectos de matriz que pueden provocar la aparición de interferencias no espectrales. Aunque este procedimiento disminuye la sensibilidad del equipo de ICP-MS, incrementando los límites de detección de los analitos (Rodríguez, 2001).



Las diluciones se preparan de manera gravimétrica, ya que tiene ciertas ventajas sobre la volumétrica, que han hecho que en la actualidad sea más comúnmente empleada en los laboratorios, como son (Kelly, Mac Donald y Guthrie, 2008, Cenam, 2008 y León, 2013):

- Reduce el tiempo de preparación
- Aporta incertidumbres pequeñas (0.1mg o menos), ya que la balanza analítica es un instrumento analítico de alta precisión y sensibilidad
- Mayor control sobre los volúmenes agregados
- Mayor precisión y exactitud

Se realiza considerando que la densidad de todas las disoluciones acuosas utilizadas es igual a $\rho=1\text{g / mL}$, de tal manera que se pueden conocer los factores de dilución, necesarios para conocer la concentración de los analitos de interés al llevar a cabo la determinación en el equipo de ICP-MS.

Con base en los valores de concentración reportados en la literatura para los analitos de interés, se decidió realizar la preparación de las diluciones siguientes:

A. Material de Referencia Certificado: 1:50 y 1:100

B. Muestras: 1:2, 1:10 y 1:50

C. Solución stock multielemental de estándares internos (Sc, Ga, Ge, Y y Ru):

Debido a que se emplea el método analítico del estándar interno, es necesario que todas las diluciones que se analizarán contengan la misma concentración de la solución stock multielemental de estándares internos (preparada igualmente de



forma gravimétrica), que para nuestro caso se determinó que tuviera un valor de $20\mu\text{g/L}$, esto debido a que se estima un valor que se encuentre en la media de resultados reportados en la bibliografía para los analitos que se están estudiando y también considerando los valores de concentración reportados en el certificado del material de referencia a emplear.

Debe tenerse especial cuidado en preparar una cantidad suficiente de cada solución que será introducida en el ICP-MS, ya que son necesarios por lo menos 5mL para poder llevar a cabo la cuantificación de los analitos de manera correcta, evitando así obtener resultados erróneos.

4.4.4. Curva de calibración

Se prepararon de forma gravimétrica 10 soluciones, en un rango de concentraciones de 1-150 $\mu\text{g/L}$ a partir de soluciones stock multielementales de analitos (Cu y Zn) preparadas previamente a 0.2 y 10 mg/L de concentración y HNO_3 al 1%V/V.

Cada punto de la curva debe:

- Tener la cantidad suficiente de la solución stock multielemental de los estándares internos, para que cada E.I. propuesto se encuentre a una concentración de $20\mu\text{g/L}$
- Estar a una concentración de HNO_3 de 1%V/V



Punto de la curva	Concentración (µg/L)
1	0
2	1
3	5
4	10
5	20
6	40
7	60
8	90
9	120
10	150

Tabla 4. Puntos de la curva de calibración.

4.4.5. Condiciones analíticas

A. Elección de los isótopos analitos

Para la elección de los isótopos de los analitos que cuantificaría el ICP-MS fue necesario que éstos cumplieran con las siguientes características:

- Tener una abundancia lo más alta posible

Elemento	Isótopo	% Abundancia
Cu	63	69.15
	65	30.85
Zn	64	49.17
	66	27.73
	67	4.04
	68	18.45
	70	0.61

Tabla 5. Abundancias de los isótopos analitos (Berglund y Wieser, 2011).



- Tener la menor cantidad posible de interferencias: isobáricas y poliatómicas (Ver inciso **A** del punto **3.10.2.**)
- Contar con formas de eliminar o corregir dichas interferencias de manera fácil (Ver inciso **A** del punto **3.10.2.**)

En el caso del cobre se eligieron sus dos únicos isótopos: ^{63}Cu y ^{65}Cu y en el caso del zinc, de sus cinco isótopos, se eligieron los dos que tuvieran mayor abundancia y menor cantidad de interferencias: ^{64}Zn y ^{66}Zn .

B. Elección de los estándares internos

Para la elección de los estándares internos se buscó que cumplieran las siguientes características (PerkinElmer, 2008, Litter, 2009 y Becker, 2007):

- Tener un comportamiento analítico similar al del analito para corregir las variaciones en la respuesta instrumental, asumiendo que son afectados, por la deriva instrumental y las interferencias matriciales, de la misma manera:
 - Masa cercana
 - Energía de ionización parecida
 - Concentración del mismo orden de magnitud
- Ser una sustancia pura
- No estar presente en la matriz de estudio
- No interferir en la cuantificación del analito
- Estar a una concentración constante en todas las disoluciones de estudio (curva de calibración, blancos, MRC y muestras)
- No reaccionar con los elementos presentes en las disoluciones de estudio



Los elementos propuestos como estándares internos fueron los siguientes:

E.I. Propuesto	1ª Energía de Ionización (KJ/mol)	Masa Atómica (u.m.a.)
Ga	578.8	69.723
Ge	762.1	72.64
Sc	631	44.956
Y	616	88.906
Ru	711	101.07

Tabla 6. Energías de ionización y masas atómicas de los diferentes E.I. propuestos (Spencer et al., 2000 y Merck Millipore, 2013).

Una vez elegidos los elementos a emplearse como estándares internos, para la selección de sus isótopos a ser analizados en el ICP-MS, se consideró que cumplieran con los mismos aspectos tomados en cuenta para los isótopos analitos:

- Tener una abundancia lo más alta posible

E.I. Propuesto	Isótopos (u.m.a.)	Abundancia Relativa (%)
Ga	69	60.11
	71	39.89
Ge	70	20.57
	72	27.45
	73	7.75
	74	36.50
	76	7.73
Sc	45	100
Y	89	100
Ru	96	5.54
	98	1.87
	99	12.76
	100	12.60
	101	17.06
	102	31.55
	104	18.62

Tabla 7. Abundancias de los isótopos E. I. propuestos (Berglund y Wieser, 2011).



- Tener la menor cantidad posible de interferencias: isobáricas y poliatómicas (Ver inciso **A** del punto **3.10.2.**)
- Contar con formas de eliminar o corregir dichas interferencias de manera fácil (Ver inciso **A** del punto **3.10.2.**)

Finalmente se eligieron:

Galio: ^{69}Ga y ^{71}Ga

Itrio: ^{89}Y

Germanio: ^{72}Ge y ^{74}Ge

Rutenio: ^{102}Ru y ^{104}Ru

Escandio: ^{45}Sc

C. Interferencias poliatómicas e isobáricas

Para los metales que se estudian en el presente trabajo, las interferencias isobáricas que existen para los diferentes isótopos analitos y estándares internos son:

Elemento	Isótopos	Abundancia Relativa (%)	Interferencias Isobáricas	Abundancia Relativa de la Interferencia (%)	Ecuación de corrección
Zn	64	49.17	Ni	0.93	$^{64}\text{Zn} = ^{64}\text{Zn} - 0.4117 ^{60}\text{Ni}$
	70	0.61	Ge	20.57	No reportada
Ge	70	20.57	Zn	0.61	No reportada
	74	36.50	Se	0.89	$^{74}\text{Ge} = ^{74}\text{Ge} - 0.1385 ^{82}\text{Se}$
	76	7.73	Se	9.37	No reportada
Ru	96	5.54	Zr / Mo	2.80 / 16.67	
	98	1.87	Mo	24.39	
	100	12.60	Mo	9.82	
	102	31.55	Pd	1.02	
	104	18.62	Pd	11.14	

Tabla 8. Interferencias isobáricas reportadas para los isótopos analitos y E. I. (Berglund y Wieser, 2011, Proyecto de Norma Mexicana, 2008 y Kmetov, Stefanova, Hristozov, Georgieva y Canals, 2003).



Así mismo, a continuación se presentan las interferencias poliatómicas que presentan los diferentes isótopos seleccionados:

Elemento	Isótopo	Interferencias
Cu	63	$^{31}\text{P}^{16}\text{O}_2^+$, $^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}^+$, $^{47}\text{Ti}^{16}\text{O}^+$, $^{23}\text{Na}^{40}\text{Ca}^+$, $^{46}\text{Ca}^{16}\text{O}^+\text{H}^+$, $^{36}\text{Ar}^{12}\text{C}^{14}\text{N}^+\text{H}^+$, $^{14}\text{N}^{12}\text{C}^{37}\text{Cl}^+$, $^{16}\text{O}^{12}\text{C}^{35}\text{Cl}^+$
	65	$^{49}\text{Ti}^{16}\text{O}^+$, $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^{21}\text{H}^+$, $^{40}\text{Ar}^{25}\text{Mg}^+$, $^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}^+\text{H}^+$, $^{36}\text{Ar}^{14}\text{N}_2^+\text{H}^+$, $^{32}\text{S}^{33}\text{S}^+$, $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^{17}\text{O}^+$, $^{33}\text{S}^{16}\text{O}_2^+$, $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{37}\text{Cl}^+$, $^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{35}\text{Cl}^+$, $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^{18}\text{O}^+$, $^{32}\text{S}_2^+\text{H}^+$, $^{14}\text{N}^{16}\text{O}^{35}\text{Cl}^+$, $^{48}\text{Ca}^{16}\text{O}^+\text{H}^+$
Zn	64	$^{32}\text{S}^{16}\text{O}_2^+$, $^{48}\text{Ti}^{16}\text{O}^+$, $^{31}\text{P}^{16}\text{O}_2^+\text{H}^+$, $^{48}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$, $^{32}\text{S}_2^+$, $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^{17}\text{O}^+$, $^{34}\text{S}^{16}\text{O}_2^+$, $^{36}\text{Ar}^{14}\text{N}_2^+$, $^{36}\text{Ar}^{12}\text{C}^{16}\text{O}^+$, $^{38}\text{Ar}^{12}\text{C}^{14}\text{N}^+$
	66	$^{50}\text{Ti}^{16}\text{O}^+$, $^{34}\text{S}^{16}\text{O}_2^+$, $^{33}\text{S}^{16}\text{O}_2^+\text{H}^+$, $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^{18}\text{O}^+$, $^{32}\text{S}^{17}\text{O}_2^+$, $^{33}\text{S}^{16}\text{O}^{17}\text{O}^+$, $^{32}\text{S}^{34}\text{S}^+$, $^{33}\text{S}_2^+$, $^{48}\text{Ca}^{18}\text{O}^+$
	67	$^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}_2^+$, $^{33}\text{S}^{34}\text{S}^+$, $^{34}\text{S}^{16}\text{O}_2^+\text{H}^+$, $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^{18}\text{O}^+\text{H}^+$, $^{33}\text{S}^{34}\text{S}^+$, $^{34}\text{S}^{16}\text{O}^{17}\text{O}^+$, $^{33}\text{S}^{16}\text{O}^{18}\text{O}^+$, $^{32}\text{S}^{17}\text{O}^{18}\text{O}^+$, $^{33}\text{S}^{17}\text{O}_2^+$, $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}_2^+$, $^{32}\text{S}^{34}\text{S}^+\text{H}^+$, $^{33}\text{S}_2^+\text{H}^+$, $^{48}\text{Ca}^{18}\text{O}^+\text{H}^+$, $^{14}\text{N}^{16}\text{O}^{37}\text{Cl}^+$
	68	$^{36}\text{S}^{16}\text{O}_2^+$, $^{34}\text{S}^{16}\text{O}^{18}\text{O}^+$, $^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}_2^+$, $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^{17}\text{O}^+$, $^{34}\text{S}_2^+$, $^{36}\text{Ar}^{32}\text{S}^+$, $^{34}\text{S}^{17}\text{O}_2^+$, $^{33}\text{S}^{17}\text{O}^{18}\text{O}^+$, $^{32}\text{S}^{18}\text{O}_2^+$, $^{32}\text{S}^{36}\text{S}^+$
	70	$^{35}\text{Cl}^{35}\text{Cl}^+$, $^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}^{16}\text{O}^+$, $^{35}\text{Cl}^{17}\text{O}^{18}\text{O}^+$, $^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}^{17}\text{O}^+$, $^{34}\text{S}^{18}\text{O}_2^+$, $^{36}\text{S}^{16}\text{O}^{18}\text{O}^+$, $^{36}\text{S}^{17}\text{O}_2^+$, $^{34}\text{S}^{36}\text{S}^+$, $^{36}\text{Ar}^{34}\text{S}^+$, $^{38}\text{Ar}^{32}\text{S}^+$
Ga	69	$^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^{18}\text{O}^+$, $^{35}\text{Cl}^{17}\text{O}_2^+$, $^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}_2^+$, $^{36}\text{Ar}^{33}\text{S}^+$, $^{33}\text{S}^{18}\text{O}_2^+$, $^{34}\text{S}^{18}\text{O}_2^+\text{H}^+$, $^{34}\text{S}^{17}\text{O}^{18}\text{O}^+$, $^{36}\text{S}^{16}\text{O}^{17}\text{O}^+$, $^{33}\text{S}^{36}\text{S}^+$, $^{32}\text{S}^{18}\text{O}_2^+\text{H}^+$, $^{34}\text{S}_2^+\text{H}^+$
	71	$^{35}\text{Cl}^{18}\text{O}_2^+$, $^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}^{18}\text{O}^+$, $^{37}\text{Cl}^{17}\text{O}_2^+$, $^{36}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$, $^{36}\text{S}^{17}\text{O}^{18}\text{O}^+$, $^{38}\text{Ar}^{33}\text{S}^+$, $^{40}\text{Ar}^{31}\text{P}^+$, $^{34}\text{S}^{18}\text{O}_2^+\text{H}^+$
Ge	70	$^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}^{16}\text{O}^+$, $^{35}\text{Cl}^{17}\text{O}^{18}\text{O}^+$, $^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}^{17}\text{O}^+$, $^{34}\text{S}^{18}\text{O}_2^+$, $^{36}\text{S}^{16}\text{O}^{18}\text{O}^+$, $^{36}\text{S}^{17}\text{O}_2^+$, $^{34}\text{S}^{36}\text{S}^+$, $^{36}\text{Ar}^{34}\text{S}^+$, $^{38}\text{Ar}^{32}\text{S}^+$, $^{35}\text{Cl}_2^+$
	72	$^{36}\text{Ar}_2^+$, $^{37}\text{Cl}^{17}\text{O}^{18}\text{O}^+$, $^{35}\text{Cl}^{37}\text{Cl}^+$, $^{36}\text{S}^{18}\text{O}_2^+$, $^{36}\text{S}_2^+$, $^{36}\text{Ar}^{36}\text{S}^+$, $^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}^+$, $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}_2^+$, $^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}_2^+$, $^{40}\text{Ar}^{32}\text{S}^+$
	73	$^{36}\text{Ar}_2^+\text{H}^+$, $^{37}\text{Cl}^{18}\text{O}_2^+$, $^{36}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$, $^{38}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$, $^{40}\text{Ar}^{33}\text{S}^+$, $^{35}\text{Cl}^{37}\text{Cl}^+\text{H}^+$, $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}_2^+\text{H}^+$
	74	$^{40}\text{Ar}^{34}\text{S}^+$, $^{36}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^+$, $^{37}\text{Cl}^{37}\text{Cl}^+$, $^{38}\text{Ar}^{36}\text{S}^+$
	76	$^{36}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$, $^{38}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^+$, $^{40}\text{Ar}^{36}\text{S}^+$
Sc	45	$^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2^+\text{H}^+$, $^{28}\text{Si}^{16}\text{O}^+\text{H}^+$, $^{29}\text{Si}^{16}\text{O}^+$, $^{14}\text{N}_2^{16}\text{O}^+\text{H}^+$, $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2^+$
Y	89	
Ru	96	
	98	No Reportadas
	99	
	100	
	101	$^{40}\text{Ar}^{61}\text{Ni}^+$, $^{64}\text{Ni}^{37}\text{Cl}^+$
	102	
104	No Reportadas	

Tabla 9. Interferencias poliatómicas reportadas para los isótopos analitos y E. I. (Editada de: May y Wiedmeyer, 1998, Dean, 2005, Agilent Technologies, 2005).



4.4.6. Uso del ICP-MS

Para poder trabajar en el equipo de ICP-MS, es necesario llevar a cabo una serie de pasos, que incluyen su encendido, estabilización, programación, introducción de las diferentes muestras y apagado (ver punto 8.4.).

Siempre que se desee trabajar con el ICP-MS es necesario, después de haber encendido el equipo, analizar una solución llamada "Daily", la cual contiene los elementos químicos necesarios para poder determinar las condiciones instrumentales de análisis óptimas para llevar a cabo la determinación de los isótopos seleccionados (Becker, 2007).

En el informe de lectura del daily se obtienen las intensidades para las señales causadas por ^{140}Ce , ^{156}CeO , ^{138}Ba y $^{69}\text{Ba}^{2+}$. Además se obtienen las desviaciones relativas típicas (RSD, por sus siglas en inglés) y las intensidades de señal para ^{24}Mg , ^{115}In y ^{238}U (León, 2013 y Litter, 2009):

- **Señales de Cerio:** El cociente de señales de óxidos de cerio 156 y cerio 140 ($^{156}\text{CeO}/^{140}\text{Ce}$) es una medida de los óxidos totales. Se toma como un valor aceptable una relación con valor menor o igual a 0.03 con lo cual se asegura que se han minimizado las interferencias poliatómicas. Para minimizar los óxidos totales y como consecuencia las interferencias poliatómicas se hacen variaciones del flujo del gas nebulizador (León, 2013).
- **Señales de Bario:** Del cociente de las señales producidas por ^{138}Ba y $^{69}\text{Ba}^{2+}$ se puede tener idea de la cantidad de especies doblemente cargadas con respecto a las monocargadas. El ICP-MS es sensible a las diferentes relaciones masa sobre carga (m/z), así que si las especies se ionizan doblemente en el plasma, entonces esta



relación se hace diferente y por tanto se obtienen diferentes lecturas. Para que se pueda realizar la lectura con el ICP-MS se recomienda que las especies doblemente cargadas no rebasen el 3%, es decir, que la relación $69\text{Ba}^{2+}/138\text{Ba}$ no sea mayor a 0.03 (León, 2013).

- **Intensidades de señal de los isótopos ^{24}Mg , ^{115}In y ^{238}U** (León, 2013):
 - ^{24}Mg : capacidad del ICP-MS para detectar relaciones masa sobre carga (m/z) pequeñas, este parámetro debe ser mayor a 5000 para poder llevar a cabo lecturas.
 - ^{115}In : capacidad del ICP-MS para detectar relaciones masa sobre carga (m/z) intermedias, este parámetro debe ser mayor a 25000 para poder realizar lecturas.
 - ^{238}U : capacidad del ICP-MS para detectar especies con relaciones masa sobre carga (m/z) grandes, este parámetro debe ser mayor a 20000 para poder realizar lecturas.

- **Desviaciones típicas relativas (RSD)**: Indican la variación que se tuvo entre cada réplica de la lectura, estos parámetros deben ser menores al 2% para que las lecturas realizadas sean confiables (León, 2013).



4.4.7. Tratamiento de datos

Los resultados que se obtienen del equipo de ICP-MS son valores de las intensidades de señal de cada uno de los isótopos analizados (analitos y E.I.), expresados en cuentas por segundo (cps).

Con estos valores de intensidad de señal y conociendo las concentraciones de cada sustancia agregada (gracias a su preparación gravimétrica) es posible elaborar las curvas de calibración de los analitos con los diferentes E.I. y conocer la concentración de los analitos en estudio, tanto en el MRC como en las muestras.



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se llevaron a cabo 7 sesiones experimentales empleando el equipo de ICP-MS con el fin de:

- Seleccionar las condiciones instrumentales adecuadas
- Elegir los isótopos de estándares internos y analitos a determinar con el equipo de ICP-MS
- Realizar las curvas de calibración
- Determinar la concentración de los analitos en el MRC y las muestras
- Evaluar los diferentes parámetros de desempeño analítico del método

5.1. Condiciones instrumentales de análisis

Teniendo como base los parámetros instrumentales señalados anteriormente (ver punto 4.4.6.), las mejores condiciones encontradas para realizar el análisis fueron:

Descripción	Parámetro
Conos de Níquel	
Nebulizador de flujo cruzado	
Presión de vacío	9.6e-006 Torr
Flujo del gas nebulizador	0.8 L/min
Potencia de radiofrecuencia del ICP	1100 Watts
Voltaje de lentes	6 volts
Voltaje análogo	-1850 volts
Voltaje pulsos	950 volts
Flujo gas auxiliar	1.2 L/min
Flujo de gas plasmógeno	15.10 L/min

Tabla 10. Condiciones instrumentales del ICP-MS elegidas para realizar el análisis.



5.2. Optimización de la metodología analítica

Una vez que se contó con las condiciones instrumentales de análisis, se procedió a optimizar la metodología analítica. Esto con el fin de que al emplear el equipo de ICP-MS, se determinaran los isótopos (analitos y E.I.) que mejor respuesta tuvieran y, así mismo, que permitieran obtener los mejores resultados.

Por tal motivo, se determinaron las curvas de calibración correspondientes a cada isótopo analito con sus respectivos isótopos E.I., y se calcularon las concentraciones de los analitos en una serie de muestras de MRC. Esto con el fin de seleccionar únicamente un isótopo analito para cada elemento de interés (Cu y Zn) y un isótopo E.I. para cada uno de los anteriores (pudiendo ser el mismo para ambos).

Por lo tanto, los factores que se tomaron en cuenta para dicha selección, fueron:

- Coeficiente de correlación (R^2)
- Ángulo de la pendiente de la curva de calibración (θ°)
- Porcentaje de error relativo (%ER)

Aunque posteriormente se analizan los parámetros de desempeño analítico, esta sección se presenta en este orden, pues de esta manera se realizó el trabajo en el laboratorio.



5.2.1. Curvas de calibración

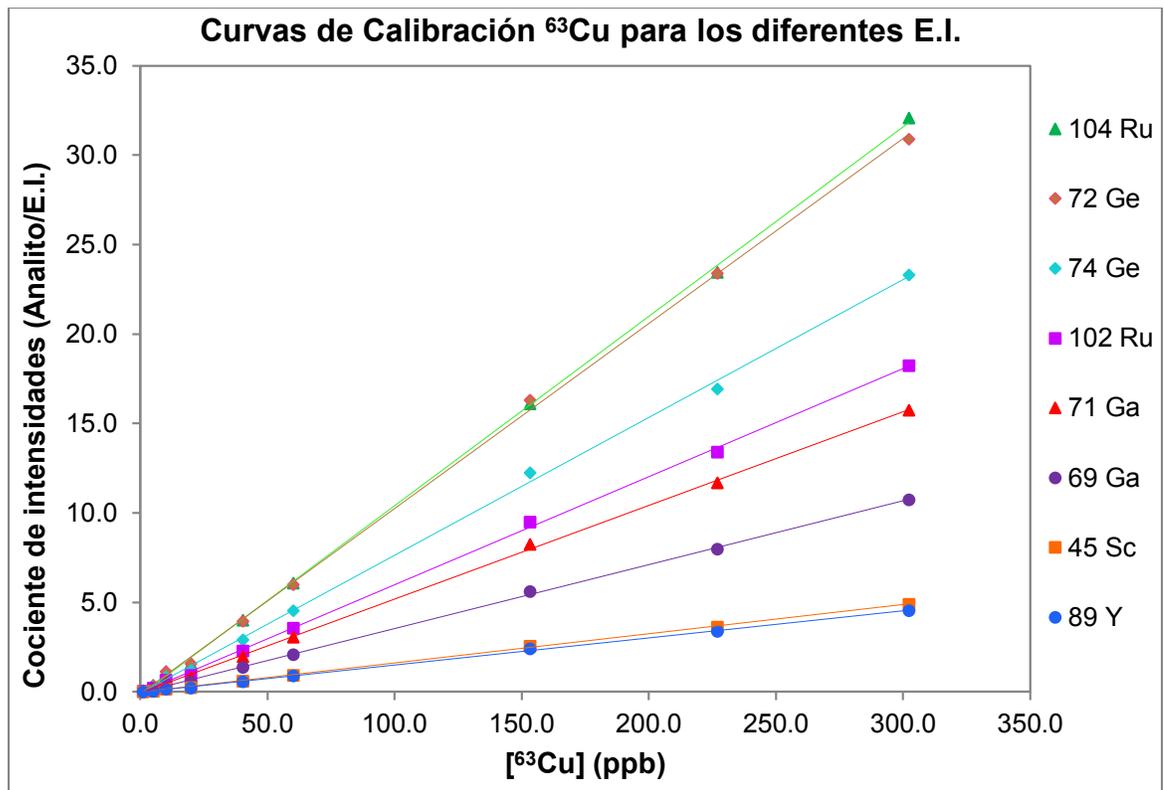
Como primer paso, se realizaron las curvas de calibración para cada isótopo analito elegido en el punto **4.4.5.A.** (^{63}Cu , ^{65}Cu , ^{64}Zn y ^{66}Zn), con los respectivos isótopos estándares internos elegidos en el punto **4.4.5.B.** (^{45}Sc , ^{89}Y , ^{102}Ru , ^{104}Ru , ^{74}Ge , ^{72}Ge , ^{71}Ga y ^{69}Ga).

De tal forma que se grafican:

- Abscisas: Concentración del elemento en estudio
- Ordenadas: Cociente de las intensidades de los isótopos:

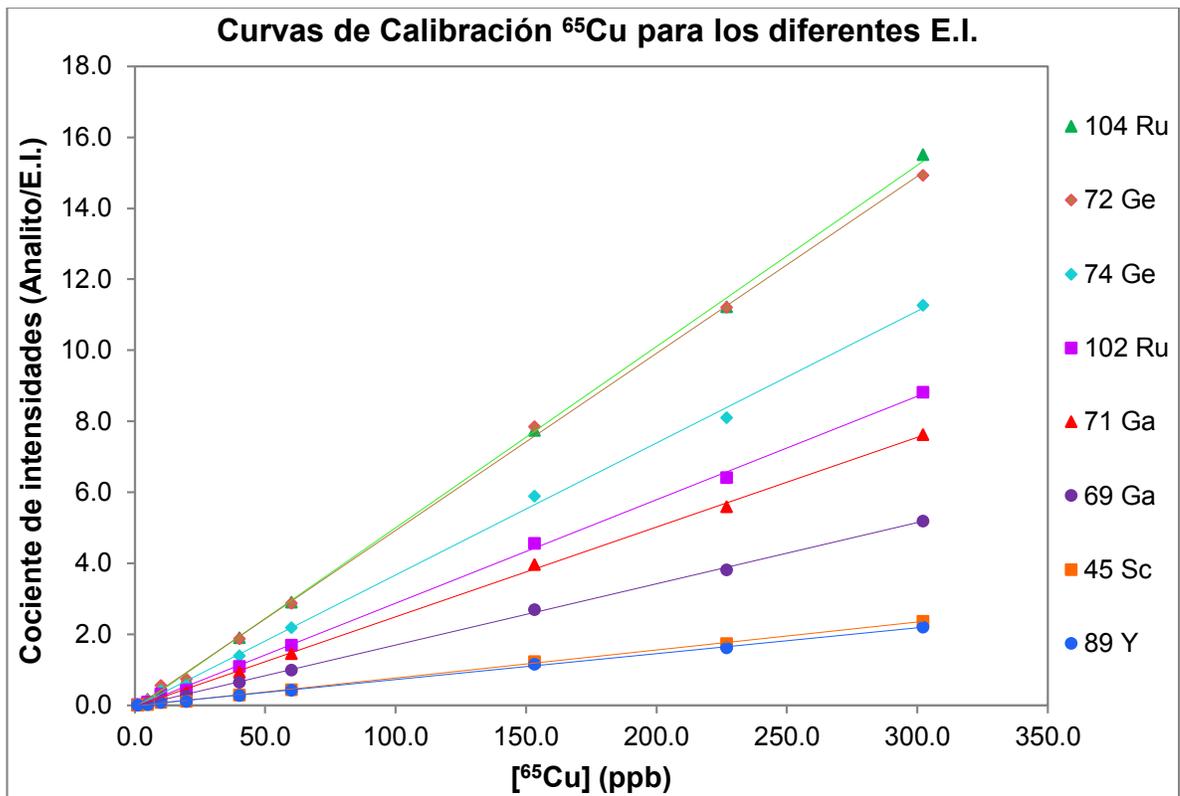
$$\text{Cociente de Intensidades} = \left(\frac{I_{\text{Analito}}}{I_{\text{E.I.}}} \right) \dots \dots [1]$$

A continuación se presentan dichas curvas, con sus ecuaciones lineales, coeficientes de correlación (R^2) y valores de los ángulos de las pendientes:

Gráfica 1. Curva de calibración del isótopo ^{63}Cu con los diferentes E.I.

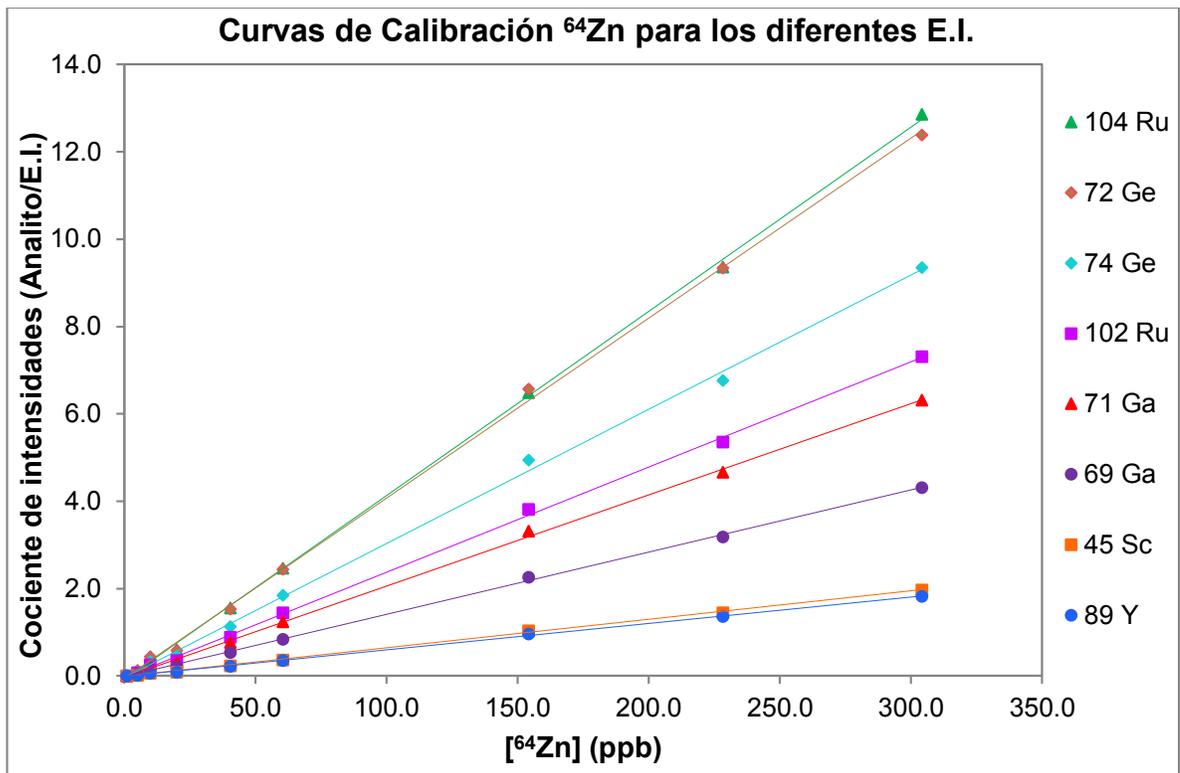
Isótopo Analito	Estándar Interno	Ecuación Lineal	R^2	θ°
^{63}Cu	^{104}Ru	$y = 0.1059 x - 0.1898$	0.9996	41.0
	^{72}Ge	$y = 0.1034 x - 0.1005$	0.9994	39.0
	^{74}Ge	$y = 0.0771 x - 0.0762$	0.9989	30.0
	^{102}Ru	$y = 0.0605 x - 0.0669$	0.9994	24.5
	^{71}Ga	$y = 0.0524 x - 0.0629$	0.9995	21.5
	^{69}Ga	$y = 0.0358 x - 0.0362$	0.9995	15.0
	^{45}Sc	$y = 0.0164 x - 0.0274$	0.9994	7.0
	^{89}Y	$y = 0.0152 x - 0.0149$	0.9994	6.5

Tabla 11. Ecuación Lineal y R^2 para el isótopo ^{63}Cu y los diferentes E.I. elegidos.

Gráfica 2. Curva de calibración del isótopo ^{65}Cu con los diferentes E.I.

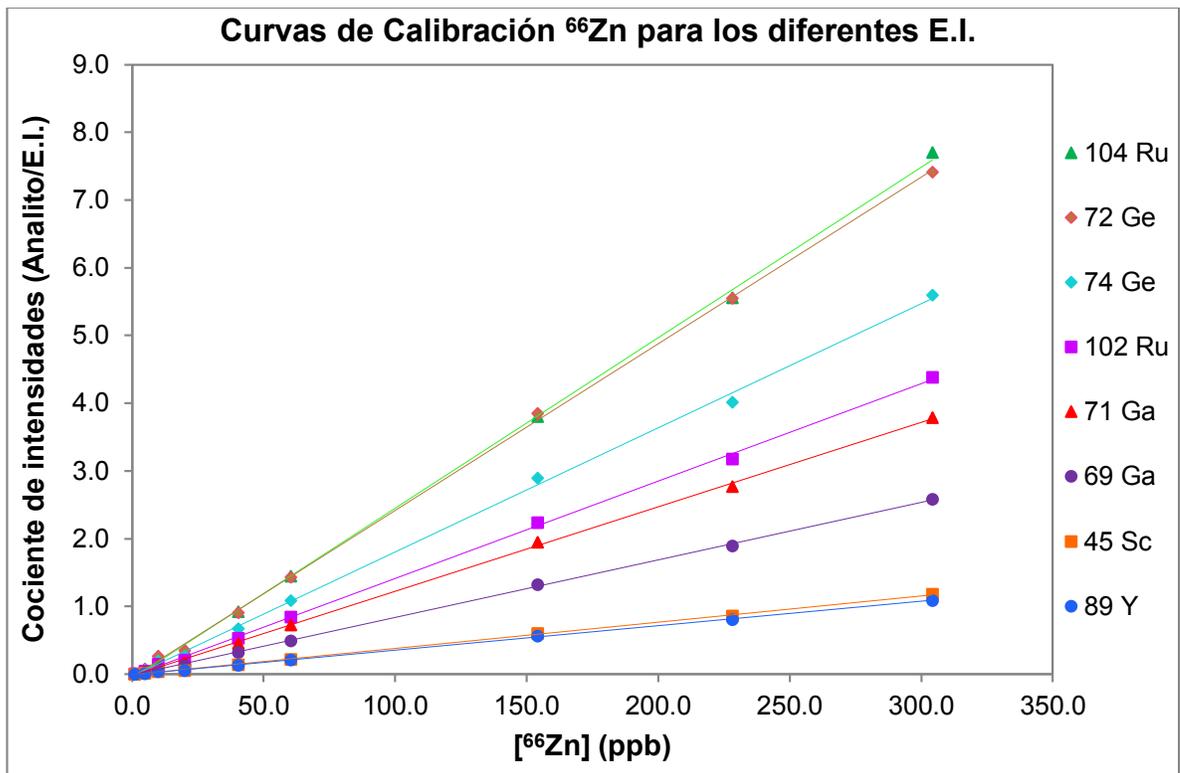
Isótopo Analito	Estándar Interno	Ecuación Lineal	R^2	θ°
^{65}Cu	^{104}Ru	$y = 0.0511 x - 0.1071$	0.9994	35.0
	^{72}Ge	$y = 0.0499 x - 0.0637$	0.9994	33.0
	^{74}Ge	$y = 0.0372 x - 0.0481$	0.9987	26.0
	^{102}Ru	$y = 0.0292 x - 0.0413$	0.9993	21.0
	^{71}Ga	$y = 0.0253 x - 0.0380$	0.9994	18.0
	^{69}Ga	$y = 0.0172 x - 0.0228$	0.9994	13.0
	^{45}Sc	$y = 0.0079 x - 0.0156$	0.9993	6.0
	^{89}Y	$y = 0.0073 x - 0.0094$	0.9994	5.5

Tabla 12. Ecuación Lineal y R^2 para el isótopo ^{65}Cu y los diferentes E.I. elegidos.

Gráfica 3. Curva de calibración del isótopo ^{64}Zn con los diferentes E.I.

Isótopo Analito	Estándar Interno	Ecuación Lineal	R ²	θ°
^{64}Zn	^{104}Ru	$y = 0.0422 x - 0.0952$	0.9995	35.0
	^{72}Ge	$y = 0.0413 x - 0.0592$	0.9992	32.0
	^{74}Ge	$y = 0.0307 x - 0.0433$	0.9986	26.0
	^{102}Ru	$y = 0.0241 x - 0.0377$	0.9992	21.0
	^{71}Ga	$y = 0.0209 x - 0.0340$	0.9992	18.0
	^{69}Ga	$y = 0.0143 x - 0.0211$	0.9993	13.0
	^{45}Sc	$y = 0.0065 x - 0.0130$	0.9992	6.0
	^{89}Y	$y = 0.0061 x - 0.0087$	0.9992	5.0

Tabla 13. Ecuación Lineal y R² para el isótopo ^{64}Zn y los diferentes E.I. elegidos.

Gráfica 4. Curva de calibración del isótopo ^{66}Zn con los diferentes E.I.

Isótopo Analito	Estándar Interno	Ecuación Lineal	R ²	θ°
^{66}Zn	^{104}Ru	$y = 0.0252 x - 0.0648$	0.9993	33.0
	^{72}Ge	$y = 0.0246 x - 0.0432$	0.9996	31.0
	^{74}Ge	$y = 0.0183 x - 0.0320$	0.9988	24.0
	^{102}Ru	$y = 0.0144 x - 0.0271$	0.9993	19.0
	^{71}Ga	$y = 0.0125 x - 0.0244$	0.9994	17.0
	^{69}Ga	$y = 0.0085 x - 0.0153$	0.9995	12.0
	^{45}Sc	$y = 0.0039 x - 0.0094$	0.9994	5.5
	^{89}Y	$y = 0.0036 x - 0.0063$	0.9995	5.0

Tabla 14. Ecuación Lineal y R² para el isótopo ^{66}Zn y los diferentes E.I. elegidos.



A. Coeficientes de correlación (R^2)

Para fines de este trabajo, se consideran aceptables las curvas de calibración con un coeficiente de correlación ≥ 0.9990 , de tal forma que observamos que la mayoría cumplen con este requisito, al estar por encima de este valor.

A continuación se presentan los mejores valores del coeficiente de correlación, encontrados para los diferentes isótopos analitos, empleando los diferentes isótopos E.I.:

Isótopo Analito	Isótopo E.I.	R^2
^{63}Cu	^{104}Ru	0.9996
	^{71}Ga ^{69}Ga	0.9995
^{65}Cu	^{89}Y ^{104}Ru ^{72}Ge ^{71}Ga ^{69}Ga	0.9994
^{64}Zn	^{104}Ru	0.9995
	^{69}Ga	0.9993
^{66}Zn	^{72}Ge	0.9996
	^{89}Y ^{69}Ga	0.9995

Tabla 15. Mejores coeficientes de correlación para las curvas de calibración de los diferentes isótopos (analitos y E.I.).

De los cuales, los isótopos E.I. que presentan mejores resultados de R^2 y coinciden para la mayoría de los isótopos analitos estudiados, son ^{69}Ga y ^{104}Ru .



B. Ángulos de las pendientes

Una curva de calibración ideal, es la que tiene un ángulo de la pendiente (θ°) con valor de 45° o una pendiente ($\tan\theta^\circ$) con valor de 1, pues cualquier variación en uno de los ejes, dará como resultado una variación proporcional en el otro.

Pero debido a que se trabajó con el método del estándar interno, el valor de la pendiente que proporciona la ecuación de la curva, no es equivalente al que se puede apreciar visualmente (formado por las rectas de la regresión con respecto al eje de las abscisas); pues en el eje de las ordenadas se graficaron cocientes de intensidades (Analito/E.I.) y por ende, la pendiente que da la ecuación, es un cociente de intensidades también.

Por tal motivo se eligió comparar simplemente, los valores de los ángulos que forman las diferentes líneas de regresión lineal (con respecto al eje de las abscisas), que es lo que visualmente puede observarse y medirse sin la necesidad de hacer cálculos.

En el presente trabajo, los ángulos de las pendientes que se obtuvieron (para las curvas de calibración de los isótopos analitos, con respecto a los diferentes isótopos E.I.), se encontraron en un rango de 5° a 41° , donde los valores más cercanos a 45° fueron los siguientes:

Isótopo Analito	Isótopo E.I.	θ°
^{63}Cu	^{104}Ru	41.0
	^{72}Ge	39.0
^{65}Cu	^{104}Ru	35.0
	^{72}Ge	33.0
^{64}Zn	^{104}Ru	35.0
	^{72}Ge	32.0
^{66}Zn	^{104}Ru	33.0
	^{72}Ge	31.0

Tabla 16. Mejores ángulos (θ°) de las pendientes para las curvas de calibración de los diferentes isótopos (analitos y E.I.).



Como se puede apreciar, los ángulos más cercanos al valor ideal, se obtuvieron con los isótopos E.I. ^{104}Ru y ^{72}Ge .

5.2.2. Concentración de analitos en el MRC con los diferentes E.I. y su porcentaje de error relativo (%ER)

Con ayuda de un lote de digestión de muestras de MRC (1577c, NIST) se procedió a:

- a. Cuantificar las concentraciones de Cu y Zn para cada uno de los isótopos, calculadas a partir de las intensidades de señal determinadas por el ICP-MS (ver punto 8.5.).
- b. Calcular el %ER (Skoog, West, Holler y Crouch, 2006):

La exactitud es un término que nos indica qué tan cercana se encuentra una medición experimental de su valor verdadero o aceptado, y se expresa en términos de Error (Eurachem, 2005).

Los valores experimental y de referencia, son las concentraciones de cada uno de los analitos; siendo la concentración experimental, la calculada a partir de la introducción de la solución digerida y diluida de MRC al ICP-MS ($C_{\text{Experimental}}$), y la concentración de referencia, la concentración reportada en el certificado del MRC ($C_{\text{Certificada}}$).

$$\text{Error} = C_{\text{Experimental}} - C_{\text{Certificada}} \dots \dots [2]$$



El %ER de una medición, es el error dividido entre el valor de la concentración de referencia:

$$\%ER = \left[\frac{Error}{C_{Certificada}} \right] * 100 \dots \dots [3]$$

Sustituyendo [2] en [3]:

$$\%ER = \left[\frac{C_{Experimental} - C_{Certificada}}{C_{Certificada}} \right] * 100 \dots \dots [4]$$

Para que se pueda aceptar el valor del %ER, debe ser menor a $\pm 30\%$ (DeSilva et al., 2003).

Si el valor es positivo (+) indica que se obtuvo una concentración más alta que la de referencia (emitida en el certificado del MRC) y por el contrario, si el valor es negativo (-) indica que el valor experimental está por debajo del aceptado.

Las concentraciones certificadas para el MRC 1577c, NIST Bovine Liver son:

Elemento	$C_{Certificada}$ (mg/kg)
Cu	275.2 ± 4.6
Zn	181.1 ± 1.0

Tabla 17. Concentraciones certificadas de los analitos en el MRC (1577c, NIST).



A continuación se presentan los resultados obtenidos para el lote de muestras de MRC analizado (RHD15):

Isótopo Analito	Isótopo E.I.	Lote RHD15	
		C _{Experimental} (mg/kg)	%ER
⁶³Cu	⁴⁵ Sc	273.49	-0.62
	⁸⁹ Y	262.18	-4.73
	¹⁰² Ru	273.33	-0.68
	¹⁰⁴ Ru	269.82	-1.95
	⁷⁴ Ge	265.20	-3.63
	⁷² Ge	266.50	-3.16
	⁷¹ Ga	264.87	-3.75
	⁶⁹ Ga	268.16	-2.56
⁶⁵Cu	⁴⁵ Sc	274.59	-0.22
	⁸⁹ Y	264.02	-4.06
	¹⁰² Ru	273.87	-0.48
	¹⁰⁴ Ru	270.44	-1.73
	⁷⁴ Ge	265.83	-3.40
	⁷² Ge	267.06	-2.96
	⁷¹ Ga	265.31	-3.59
	⁶⁹ Ga	269.93	-1.91
⁶⁴Zn	⁴⁵ Sc	172.55	-4.72
	⁸⁹ Y	163.29	-9.83
	¹⁰² Ru	171.63	-5.23
	¹⁰⁴ Ru	169.37	-6.48
	⁷⁴ Ge	166.54	-8.04
	⁷² Ge	166.84	-7.87
	⁷¹ Ga	166.03	-8.32
	⁶⁹ Ga	167.87	-7.31
⁶⁶Zn	⁴⁵ Sc	171.15	-5.49
	⁸⁹ Y	164.68	-9.07
	¹⁰² Ru	170.96	-5.60
	¹⁰⁴ Ru	168.80	-6.79
	⁷⁴ Ge	166.29	-8.18
	⁷² Ge	166.71	-7.95
	⁷¹ Ga	165.22	-8.77
	⁶⁹ Ga	168.08	-7.19

Tabla 18. Concentraciones de analitos y valores del porcentaje de error relativo, para el lote de muestras de MRC (1577c, NIST), calculados para todos los isótopos (analitos y E.I.).



Como se puede ver, todos los valores del %ER se encuentran dentro del aceptado ($\pm 30\%$).

Los isótopos E.I. con los que se obtienen los mejores valores del %ER, para los diferentes isótopos analitos, son:

Isótopo Analito	Isótopo E.I.	Lote RHD15	
		C _{Experimental} (mg/kg)	%ER
⁶³Cu	⁴⁵ Sc	274.59	-0.62
	¹⁰² Ru	273.33	-0.68
	¹⁰⁴ Ru	269.82	-1.95
⁶⁵Cu	⁴⁵ Sc	273.49	-0.22
	¹⁰² Ru	273.87	-0.48
	¹⁰⁴ Ru	270.44	-1.73
⁶⁴Zn	⁴⁵ Sc	172.55	-4.72
	¹⁰² Ru	171.63	-5.23
	¹⁰⁴ Ru	169.37	-6.48
⁶⁶Zn	⁴⁵ Sc	171.15	-5.49
	¹⁰² Ru	170.96	-5.60
	¹⁰⁴ Ru	168.80	-6.79

Tabla 19. Selección de los isótopos (analitos y E.I.) que arrojan los menores valores de error relativo.

Se obtuvieron los menores valores del %ER, al emplear como isótopos E.I. ⁴⁵Sc, ¹⁰²Ru y ¹⁰⁴Ru.

Aunque el ⁴⁵Sc y ¹⁰²Ru proporcionan valores más cercanos al de la concentración certificada, la diferencia con el ¹⁰⁴Ru también es pequeña, pues también se encuentra dentro de los valores aceptados.

5.2.3. Elección de los isótopos analitos y E.I.

Para poder seleccionar a los isótopos analitos y E.I. se comparan los mejores resultados obtenidos para cada uno de los factores calculados:



- Coeficientes de Correlación (R^2)
- Ángulos de las Pendientes (θ°)
- Porcentajes de Errores Relativos (%ER)

Isótopo Analito	R^2	θ°	%ER
^{63}Cu	^{104}Ru ^{69}Ga	^{104}Ru ^{72}Ge	^{45}Sc ^{102}Ru ^{104}Ru
^{65}Cu	^{89}Y ^{104}Ru ^{72}Ge ^{71}Ga ^{69}Ga	^{104}Ru ^{72}Ge	^{45}Sc ^{102}Ru ^{104}Ru
^{64}Zn	^{104}Ru ^{69}Ga	^{104}Ru ^{72}Ge	^{45}Sc ^{102}Ru ^{104}Ru
^{66}Zn	^{72}Ge ^{89}Y ^{69}Ga	^{104}Ru ^{72}Ge	^{45}Sc ^{102}Ru ^{104}Ru

Tabla 20. Mejores isótopos analitos y E.I. para las pruebas de R^2 , θ y %ER.

Observamos que para la mayoría de los casos, los isótopos con los que se obtienen los mejores valores de R^2 , θ° y %ER fueron:

- **Isótopos Analitos:** ^{63}Cu y ^{64}Zn
- **Isótopo E.I.:** ^{104}Ru

La selección de los anteriores isótopos analitos y E.I. (que son con los que se obtienen mejores respuestas), se hizo para que las siguientes sesiones sólo éstos fueron determinados con ayuda del ICP-MS; de tal manera que el tiempo de lectura de las muestras, por el equipo, disminuyera y fuera posible la introducción de un número más grande de éstas, por sesión.



5.3. Parámetros de desempeño

En seguida se presentan los resultados obtenidos de la evaluación de los parámetros de desempeño: límite de detección, límite de cuantificación, intervalo lineal, intervalo de trabajo, exactitud (veracidad y precisión), sensibilidad, recuperación, selectividad y robustez. Los cálculos se realizaron de acuerdo a como se mencionó en los antecedentes de este documento (ver punto 3.12.1.).

Además se presenta un estudio de la deriva instrumental.

Todos los cálculos que se presentan en los siguientes puntos, se realizaron a partir de los datos obtenidos de las intensidades de señal reportadas por el equipo de ICP-MS, empleando como isótopos analitos ^{63}Cu y ^{64}Zn y como E.I. ^{104}Ru .

5.3.1. Límite de detección (LoD) y límite de cuantificación (LoQ)

Se determinaron las concentraciones de los analitos Cu y Zn en los blancos reactivos (BR) de las series que contenían muestras de MRC (1577c, NIST).

En la guía Eurachem se propone que las lecturas deben realizarse sobre blancos de muestras, que en este caso deberían ser las matrices de los tejidos de ratón (bazo, hígado, pulmón, riñón, testículo y timo) pero que no contuvieran los analitos en estudio. El problema es que es prácticamente imposible, pues tanto el Cu como el Zn tienen funciones biológicas de gran importancia (tanto para el organismo de los humanos como para el de los ratones), por lo que encontrar un tejido que no los contenga no es viable. La misma guía Eurachem menciona que de no ser posible contar con esos blancos de muestras, se puede aproximar



el LoD y el LoQ calculándolos a partir de la lectura de los blancos reactivos. También se sugiere un mínimo de 6 blancos reactivos diferentes (Eurachem, 2005).

NOTA:

Para la evaluación del LoD, LoQ, recuperación, sesgo y veracidad, se emplearon lotes de digestión de MRC (1577c, NIST) digeridos en el horno de microondas para digestión en sistema cerrado MILESTONE. El porcentaje de recuperación, calculado en muestras de MRC digeridas en los dos sistemas de digestión (MILESTONE y CEM), se presenta más adelante para las pruebas de robustez.

A continuación se presentan las concentraciones de los analitos Cu y Zn en los blancos reactivos (BR) de tres lotes de digestión de MRC diferentes (RHD13, RHD14 y RHD15), con sus respectivos promedios ($Promedio_{BR}$) y desviaciones estándar (s):

Muestra	Tipo	[Cu] ($\mu\text{g/L}$)
RHD13-1	Blanco	3.092
RHD13-2	Blanco	3.079
RHD14-1	Blanco	3.060
RHD14-2	Blanco	3.157
RHD15-1	Blanco	3.204
RHD15-2	Blanco	3.095
$Promedio_{BR}$ ($\mu\text{g/L}$)		3.115
s		0.055

Tabla 21. Concentración de Cu en diferentes blancos reactivos.



Muestra	Tipo	[Zn] (µg/L)
RHD13-1	Blanco	7.340
RHD13-2	Blanco	7.923
RHD14-1	Blanco	6.279
RHD14-2	Blanco	7.824
RHD15-1	Blanco	6.594
RHD15-2	Blanco	6.077
Promedio_{BR} (µg/L)		7.006
s		0.798

Tabla 22. Concentración de Zn en diferentes blancos reactivos.

Con base en los datos obtenidos en las tablas anteriores, se calculan los límites de detección (LoD) y cuantificación (LoQ), de acuerdo a las ecuaciones sugeridas por la guía Eurachem:

$$LoD = Promedio_{BR} + 3 s \dots \dots [5]$$

$$LoQ = Promedio_{BR} + 10 s \dots \dots [6]$$

En seguida se muestran los límites de detección y cuantificación, calculados para ambos analitos:

Analito	Promedio _{BR} (µg/L)	s	LoD (µg/L)	LoQ (µg/L)
Cu	3.115	0.055	3.278	3.661
Zn	7.006	0.798	8.497	10.810

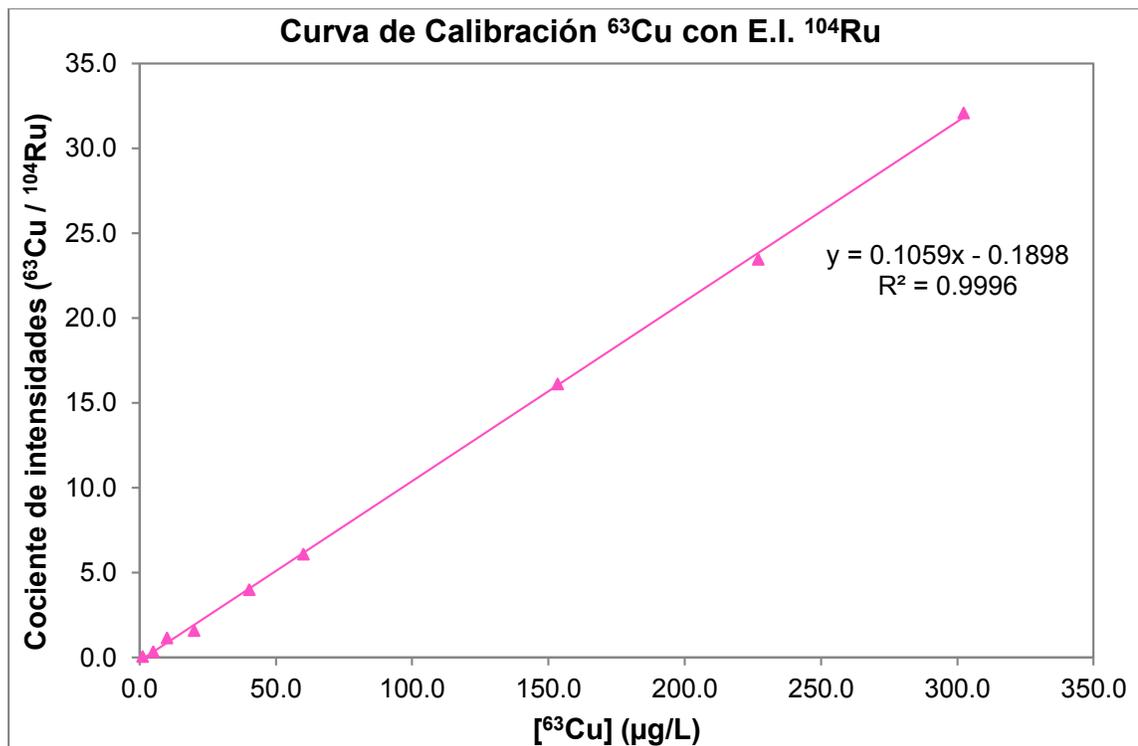
Tabla 23. LoD y LoQ para los analitos Cu y Zn.



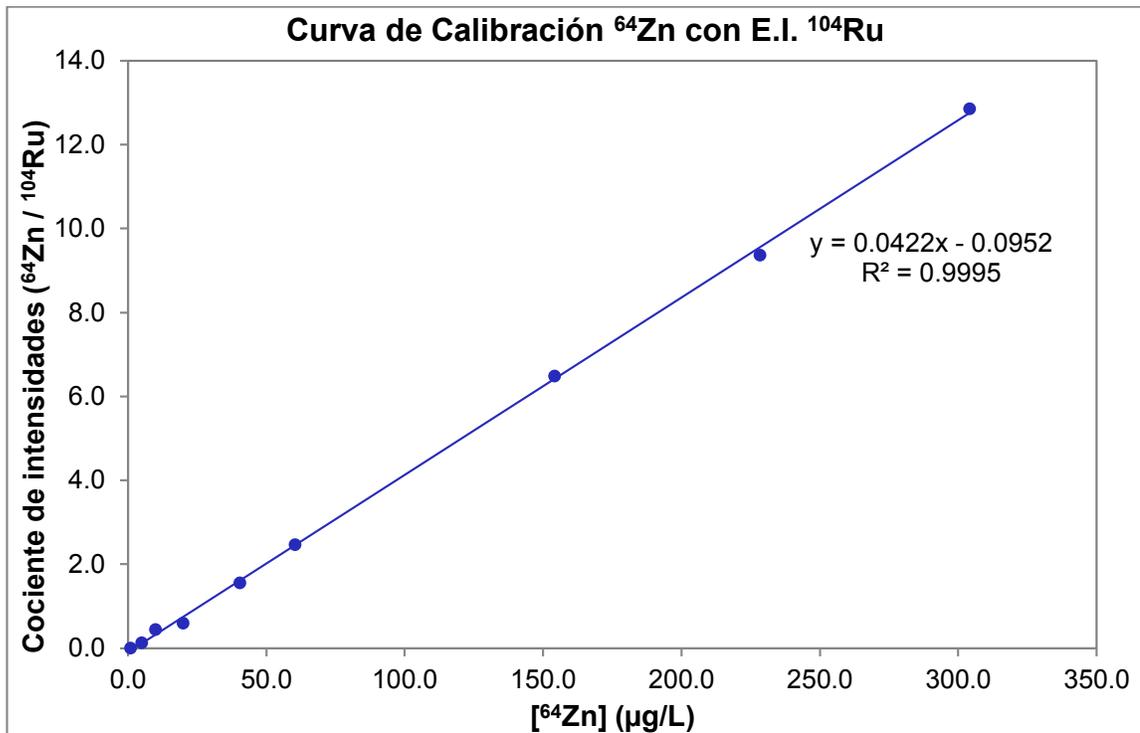
5.3.2. Intervalo lineal

Para evaluar este parámetro, se utilizaron las curvas de calibración calculadas en el punto 5.2.1., con un rango de concentraciones de $0\mu\text{g/L}$ a $300\mu\text{g/L}$, y empleando como estándar interno el isótopo ^{104}Ru , el cual fue seleccionado en el punto 5.2.3., como mejor E.I. junto con los isótopos analitos ^{63}Cu y ^{64}Zn .

A continuación se muestran las curvas de calibración y sus respectivas ecuaciones lineales y coeficientes de correlación (R^2):



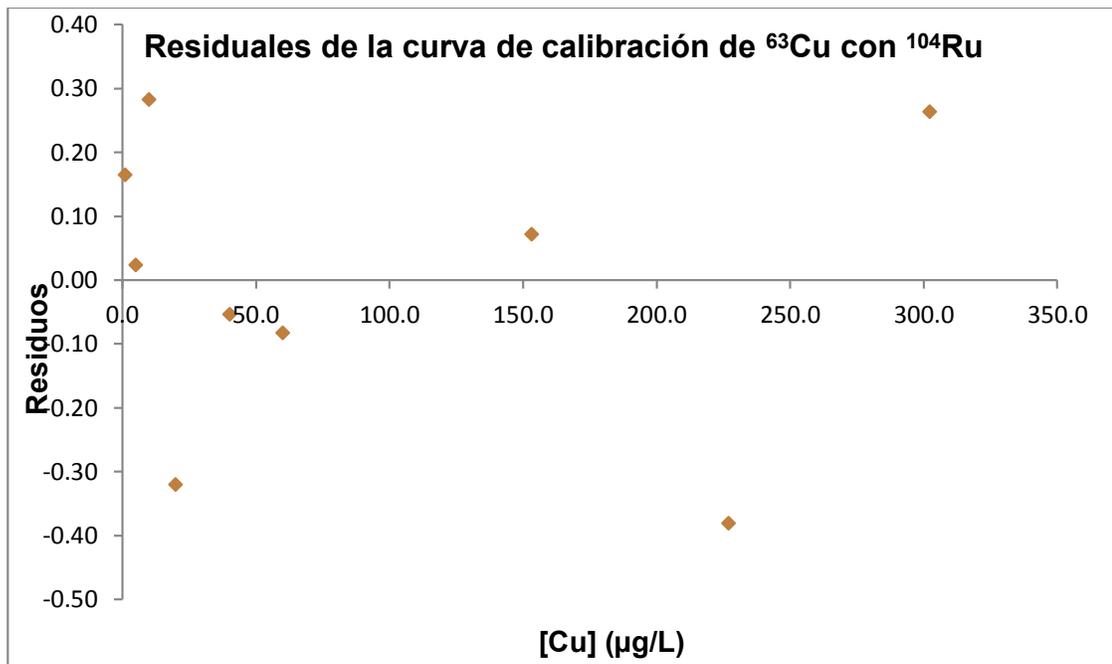
Gráfica 5. Curva de calibración del isótopo analito ^{63}Cu con el isótopo E.I. ^{104}Ru .



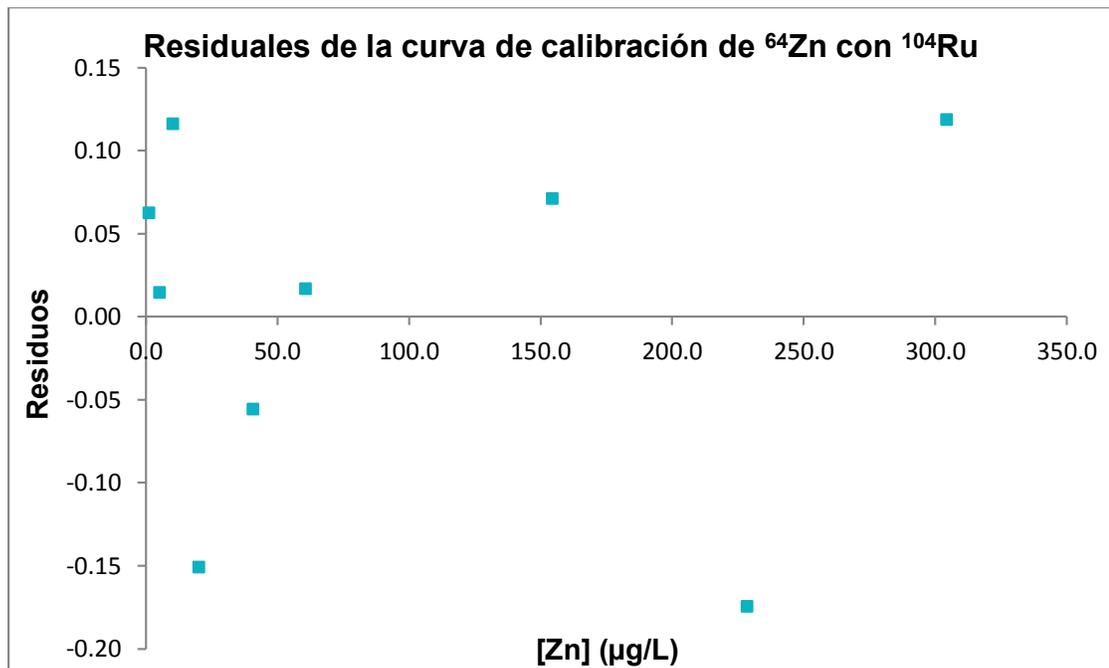
Gráfica 6. Curva de calibración del isótopo analito ^{64}Zn con el isótopo E.I. ^{104}Ru .

Como puede apreciarse, el comportamiento es lineal a lo largo de todo el intervalo de concentraciones, lo cual se corrobora por los coeficientes de correlación (R^2) obtenidos.

Así mismo, la guía Eurachem sugiere realizar un análisis de los residuos para tener una visión conjunta del comportamiento lineal de las curvas de calibración; por lo que a continuación se presentan las gráficas de residuales para cada una de las curvas de calibración anteriores (^{63}Cu con ^{104}Ru y ^{64}Zn con ^{104}Ru):



Gráfica 7. Residuales de la curva de calibración del isótopo analito ^{63}Cu con el isótopo E.I. ^{104}Ru .



Gráfica 8. Residuales de la curva de calibración del isótopo analito ^{64}Zn con el isótopo E.I. ^{104}Ru .



Para poder considerar que un modelo de línea recta es válido, en el gráfico de residuales se deben observar las siguientes características (Riu y Boqué, 2003):

- El número de residuales positivos debe ser aproximadamente igual al número de residuales negativos
- Los residuales deben estar distribuidos aleatoriamente
- Todos los residuales deben tener aproximadamente el mismo valor absoluto
- Los residuales no deben mostrar tendencias

Por lo tanto, podemos decir que los errores de preparación de la curva de calibración son aleatorios, pues no se muestra una tendencia en las gráficas de residuales para ninguno de los dos analitos.

Finalmente, con base en los valores de los coeficientes de correlación (R^2) y el análisis de residuales, se puede afirmar que los analitos se comportan de manera lineal dentro de los intervalos de concentraciones mostrados en la siguiente tabla:

Analito	Intervalo Lineal ($\mu\text{g/L}$)
Cu	3.278 – 302.262
Zn	8.497 – 304.262

Tabla 24. Intervalo lineal para los analitos Cu y Zn.

Donde los límites inferiores para cada analito, son sus respectivos límites de detección (LoD) y los límites superiores son las concentraciones hasta las cuales se exploró el comportamiento de los analitos en el ICP-MS.



5.3.3. Intervalo de trabajo

El intervalo de trabajo para cada analito se definió de la siguiente manera:

- Límites inferiores: límites de cuantificación (LoQ) de los analitos (Cu y Zn)
- Límites superiores: el doble de las concentraciones ya diluidas, encontradas para los analitos (Cu y Zn) en el MRC (NIST 1577c)

A continuación se muestran los intervalos de trabajo para cada uno de los analitos:

Analito	Intervalo de Trabajo (µg/L)
Cu	3.661 – 282.217
Zn	10.810 – 195.056

Tabla 25. Intervalo de trabajo para los analitos Cu y Zn.

5.3.4. Recuperación

Los estudios de recuperación sobre materiales de referencia adecuados, se realizan para conocer qué tan exitoso ha sido el método desarrollado para extraer al analito de la matriz, determinando así la eficiencia de cuantificación. Generalmente se emplea su valor en porcentaje.

Se calcula de la forma siguiente:

$$\%Recuperación = \left[\frac{C_{Experimental}}{C_{Certificada}} \right] * 100 \dots \dots [7]$$

Donde $C_{Experimental}$ es la concentración del analito determinada experimentalmente y $C_{Certificada}$ es la concentración reportada en el certificado del MRC.



A continuación se muestran las concentraciones obtenidas de Cu y Zn (cuantificadas empleando como E.I. ^{104}Ru) en dos lotes de muestras (RHD14 y RHD15) de MRC (NIST 1577c), con sus respectivos promedios y desviaciones estándar:

Cu				
Clave Muestra	Tipo	C _{Certificada} (µg/L)	C _{Experimental} (mg/kg)	% Recuperación
RHD14-3	MRC	275.2	270.070	98.14
RHD14-4			261.281	94.94
RHD14-5			263.363	95.70
RHD14-6			265.266	96.39
RHD15-3			275.212	100.00
RHD15-4			269.924	98.08
RHD15-5			263.631	95.80
RHD15-6			270.505	98.29
Promedio				97.17
s				1.72

Tabla 26. Concentraciones de Cu y sus respectivos porcentajes de recuperación, para las muestras de dos lotes de digestión (RHD14 y RHD15), empleando como E.I. ^{104}Ru .

Zn				
Clave Muestra	Tipo	C _{Certificada} (µg/L)	C _{Experimental} (mg/kg)	% Recuperación
RHD14-3	MRC	181.1	169.695	93.70
RHD14-4			165.667	91.48
RHD14-5			167.528	92.51
RHD14-6			166.457	91.91
RHD15-3			172.409	95.20
RHD15-4			170.157	93.96
RHD15-5			166.185	91.76
RHD15-6			168.738	93.17
Promedio				92.96
s				1.28

Tabla 27. Concentraciones de Zn y sus respectivos porcentajes de recuperación, para las muestras de dos lotes de digestión (RHD14 y RHD15), empleando como E.I. ^{104}Ru .



En seguida se reporta el porcentaje de recuperación, como un promedio con su respectiva desviación estándar expandida (factor de cobertura ($k=2$) para un nivel de confianza del 95%):

$$\%Recuperación = \bar{R} \pm 2s \dots \dots [8]$$

Donde:

\bar{R} = Promedio de %Recuperación

s = Desviación Estándar de %Recuperación

Analito	E.I.	% Recuperación
Cu	¹⁰⁴Ru	97.17 ± 3.44
Zn		92.96 ± 2.56

Tabla 28. Porcentaje de recuperación promedio para Cu y Zn con el E.I. ¹⁰⁴Ru (Factor de cobertura $k=2$, para un nivel de confianza del 95%).

5.3.5. Selectividad

Debido a que la selectividad de un método se investiga mediante el estudio de su capacidad para medir el analito de interés, una prueba objetiva de que el analito está siendo cuantificado de forma adecuada, es el valor del porcentaje de recuperación calculado en el punto anterior (punto 5.3.4.).

De acuerdo con la AOAC (Association of Official Agricultural Chemists), los límites de recuperación con respecto al orden en que se encuentran las concentraciones son (AOAC, 2002):

- Partes por millón: ppm (mg/kg) → 80 – 115 %
- Partes por billón: ppb (µg/kg) → 70 – 125 %



Teniendo en cuenta los porcentajes de recuperación calculados anteriormente (en ppm):

- Cu → 97.17 %
- Zn → 92.96 %

Se puede ver que se encuentran dentro de los límites permitidos. De tal forma que se afirma que el método analítico es selectivo, pues los analitos (Cu y Zn) se cuantificaron satisfactoriamente.

5.3.6. Exactitud

Como ya se mencionó en el inciso b del punto 5.2.2. y empleando la ecuación <4>, se calculó el %ER del promedio de las concentraciones de cada uno de los analitos, obtenidas para los lotes de MRC NIST 1577c (RHD14 y RHD15).

A continuación se muestran las tablas con los resultados obtenidos para cada analito:

Cu				
Clave Muestra	Tipo	C _{Certificada} (µg/L)	C _{Experimental} (mg/kg)	%ER
RHD14-3	MRC	275.2	270.070	-2.83
RHD14-4			261.281	
RHD14-5			263.363	
RHD14-6			265.266	
RHD15-3			275.212	
RHD15-4			269.924	
RHD15-5			263.631	
RHD15-6			270.505	
Promedio			267.407	
s			4.731	

Tabla 29. Concentraciones de Cu y su %ER, en las muestras de dos lotes de digestión (RHD14 y RHD15), empleando como E.I. ¹⁰⁴Ru.



Zn				
Clave Muestra	Tipo	C _{Certificada} (µg/L)	C _{Experimental} (mg/kg)	%ER
RHD14-3	MRC	275.2	169.695	-7.04
RHD14-4			165.667	
RHD14-5			167.528	
RHD14-6			166.457	
RHD15-3			172.409	
RHD15-4			170.157	
RHD15-5			166.185	
RHD15-6			168.738	
Promedio			168.354	
s			2.325	

Tabla 30. Concentraciones de Zn y su %ER, en las muestras de dos lotes de digestión (RHD14 y RHD15), empleando como E.I. ¹⁰⁴Ru.

Como ya también se mencionó, para que el valor del %ER sea aceptado, debe ser menor a $\pm 30\%$, de tal forma que observando los valores obtenidos para ambos analitos (Cu y Zn), se afirma que se encuentran dentro del rango permitido.

5.3.7. Precisión

Se determina a través del cálculo del porcentaje de desviación estándar relativa (%RSD):

$$\%RSD = \left(\frac{s}{Promedio_{MRC}} \right) * 100 \dots \dots [9]$$

Donde:

$Promedio_{MRC}$ = Promedio de las concentraciones experimentales obtenidas para el MRC

s = Desviación Estándar de las concentraciones experimentales obtenidas para el MRC



A continuación se muestran las tablas con los valores de %RSD para cada uno de los analitos, en los lotes de digestión de MRC NIST 1577c (RHD14 y RHD15):

Cu				
Clave Muestra	Tipo	C _{Certificada} (µg/L)	C _{Experimental} (mg/kg)	%RSD
RHD14-3	MRC	275.2	270.070	1.77
RHD14-4			261.281	
RHD14-5			263.363	
RHD14-6			265.266	
RHD15-3			275.212	
RHD15-4			269.924	
RHD15-5			263.631	
RHD15-6			270.505	
Promedio			267.407	
s			4.731	

Tabla 31. Concentraciones de Cu y su %RSD, para las muestras de dos lotes de digestión (RHD14 y RHD15), empleando como E.I. ¹⁰⁴Ru.

Zn				
Clave Muestra	Tipo	C _{Certificada} (µg/L)	C _{Experimental} (mg/kg)	%RSD
RHD14-3	MRC	275.2	169.695	1.38
RHD14-4			165.667	
RHD14-5			167.528	
RHD14-6			166.457	
RHD15-3			172.409	
RHD15-4			170.157	
RHD15-5			166.185	
RHD15-6			168.738	
Promedio			168.354	
s			2.325	

Tabla 32. Concentraciones de Cu y su %RSD, para las muestras de dos lotes de digestión (RHD14 y RHD15), empleando como E.I. ¹⁰⁴Ru.



El valor esperado de la precisión está en función de la concentración del analito, por lo que tanto para el Cu como para el Zn (que se encuentran en el mismo orden de magnitud), el %RSD debe tener un valor de aproximadamente 5.3% (AOAC, 2012), aunque entre más pequeño será mejor.

5.3.8. Sensibilidad

La sensibilidad es el cambio en la respuesta del instrumento correspondiente a un cambio en la concentración del analito, lo cual se conoce como la pendiente (m) de la curva de calibración de cada uno de los analitos.

Sin embargo, debido a que se trabajó con el método del estándar interno, lo que se graficó fue la concentración del analito en el eje de las abscisas y en el eje de las ordenadas el cociente de intensidades Analito/E.I.; dando como resultado una ecuación de regresión en la cual, el valor de la pendiente es un cociente de intensidades.

Para conocer la sensibilidad existen dos formas de calcularla, las cuales son esencialmente iguales:

- 1) A partir del valor de la pendiente de la curva de calibración empleada para reportar el intervalo lineal, la cual tiene la forma:

$$m = \frac{\Delta I_{\text{Analito}}}{\bar{I}_{E.I.} * \Delta[\text{Analito}]} \dots \dots [10]$$

Donde:

$\Delta I_{\text{Analito}}$ = Cambio en la intensidad de señal provocada por el analito

$\Delta[\text{Analito}]$ = Cambio en la concentración del analito

$\bar{I}_{E.I.}$ = Promedio de intensidades de señal provocadas por el E.I.



Se emplea el promedio de las intensidades de señal provocadas por el E.I., debido a que la pendiente es un parámetro que caracteriza a toda la línea recta y no exclusivamente a un punto de la misma.

De la ecuación anterior, se puede apreciar que la relación que en realidad indica la sensibilidad es:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\Delta I_{\text{Analito}}}{\Delta[\text{Analito}]} \dots \dots [11]$$

Por lo que la multiplicación de la pendiente de una curva de calibración, por el promedio de intensidades de señal provocadas por el E.I., sería la forma adecuada de encontrar el verdadero valor de la sensibilidad que el ICP-MS tiene para cada analito:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\Delta I_{\text{Analito}}}{\bar{I}_{E.I.} * \Delta[\text{Analito}]} * \bar{I}_{E.I.} = m * \bar{I}_{E.I.} \dots \dots [12]$$

2) A través de la gráfica de I_{Analito} vs $[\text{Analito}]$, es decir, sin emplear el E.I., donde la pendiente obtenida de la ecuación de regresión, sería directamente el valor de la sensibilidad.

El problema que se presenta al realizarlo de esta manera, es que la curva de calibración no necesariamente tendría un comportamiento lineal, gracias a la deriva instrumental que existe y la cual se corrige precisamente con el uso de un E.I..

En este trabajo se calculó la sensibilidad de acuerdo al inciso 1 (o sea, empleando la ecuación 12), por lo que en seguida se muestran los valores calculados para cada uno de los analitos (Cu y Zn) empleando como el isótopo analito ^{104}Ru :



Analito	E.I.	$\bar{I}_{E.I.}$	m	Sensibilidad (cps*L/ μ g)
Cu	¹⁰⁴Ru	5205.320	0.1059	551.243
Zn			0.0422	219.664

Tabla 33. Valores de sensibilidad para los analitos Cu y Zn usando el E.I. ¹⁰⁴Ru.

5.3.9. Robustez

Para la evaluación de la robustez, siguiendo la guía Eurachem, se deben aplicar variaciones de manera deliberada al método, con el fin de estudiar su efecto sobre la precisión y la exactitud (pruebas de robustez). Dichas variaciones deben hacerse sobre los puntos que son más importantes durante el procedimiento analítico.

Un momento crucial en la aplicación del presente método analítico, es el proceso de digestión de muestras; por lo que se evaluó la digestión del MRC (Bovine Liver Solution, High Purity Standards, lote: 529004 (ver punto 8.6.) en dos hornos de microondas diferentes (MILESTONE y CEM), empleando los mismos programas de digestión que se utilizaron para las muestras (Ver punto 8.3.).

Las concentraciones certificadas para el MRC 529004, HPS Bovine Liver son:

Elemento	C _{Certificada} (μ g/mL)
Cu	2.0
Zn	1.5

Tabla 34. Concentraciones de los analitos en el MRC (529004, HPS).



En seguida se muestra una tabla con las concentraciones promedio de cada uno de los analitos en el MRC (529004, HPS), determinadas experimentalmente para las muestras:

Horno	Promedio $C_{\text{Experimental}}$ ($\mu\text{g/mL}$)	
	Cu	Zn
MILESTONE	1.766	1.397
CEM	1.594	1.464

Tabla 35. Concentraciones experimentales promedio de los analitos en las muestras de MRC (529004, HPS) digeridas con los dos hornos de microondas.

A continuación se muestran los porcentajes de recuperación promedio calculadas para las concentraciones promedio, presentadas en la tabla anterior:

Horno	%Recuperación Promedio	
	Cu	Zn
MILESTONE	88.30	93.10
CEM	79.70	97.60

Tabla 36. Recuperaciones promedio de los analitos en las muestras de MRC (529004, HPS) digeridas con los dos hornos de microondas.

Con los resultados mostrados anteriormente, es posible afirmar que el uso de diferentes hornos de microondas para llevar a cabo el proceso de digestión, no afecta en la determinación de los analitos por el equipo de ICP-MS, ya que los valores de la concentración promedio y del porcentaje de recuperación son bastante similares entre sí.



Las tablas siguientes, muestran los resultados para el cálculo de la exactitud (a través del valor del %ER) y de la precisión (por medio del valor del %RSD), al determinar los analitos Cu y Zn en el MRC (529004, HPS), digerido con ambos hornos de microondas (MILESTONE y CEM):

Horno	%ER	
	Cu	Zn
MILESTONE	-11.70	-6.87
CEM	-20.30	-2.40

Tabla 37. Porcentajes de error relativo en las muestras de MRC (529004, HPS), digeridas con los dos hornos de microondas.

Horno	%RSD	
	Cu	Zn
MILESTONE	1.13	12.17
CEM	6.90	16.39

Tabla 38. Porcentajes de desviación estándar relativa en las muestras de MRC (529004, HPS), digeridas con los dos hornos de microondas.

Los valores del %ER calculados para ambos analitos (considerando los dos hornos), tienen en general magnitudes similares, siendo un poco más grandes para el caso del Cu. El que sean negativos se debe a una deficiencia en la cuantificación de los analitos.

En el caso de la precisión, es posible afirmar que los valores obtenidos para el %RSD son aceptables para ambos hornos de microondas empleados, ya que se encuentran dentro del valor permitido de $\leq 20\%$. También cabe mencionar que dichos valores tienen un orden de



magnitud similar para ambos hornos, siendo ligeramente más pequeños (en la mayoría de los casos) para el horno MILESTONE. Aun así, con el horno CEM también se obtienen valores para la precisión adecuados.

5.3.10. Deriva instrumental

Se preparó una dilución de los elementos en estudio Cu y Zn, más el E.I. Ru, la cual fue introducida en el ICP-MS, varias veces y en diferentes tiempos, durante el transcurso de una sesión de trabajo con el equipo. Esto con el objetivo de evaluar el comportamiento de las señales de los analitos, como función del tiempo.

A continuación se muestran las concentraciones de cada uno de los elementos, en la disolución preparada para el monitoreo:

Elemento	Concentración (µg/L)
Cu	30.32
Zn Ru	20.38

Tabla 39. Concentración de cada elemento en la solución de monitoreo de la deriva instrumental.

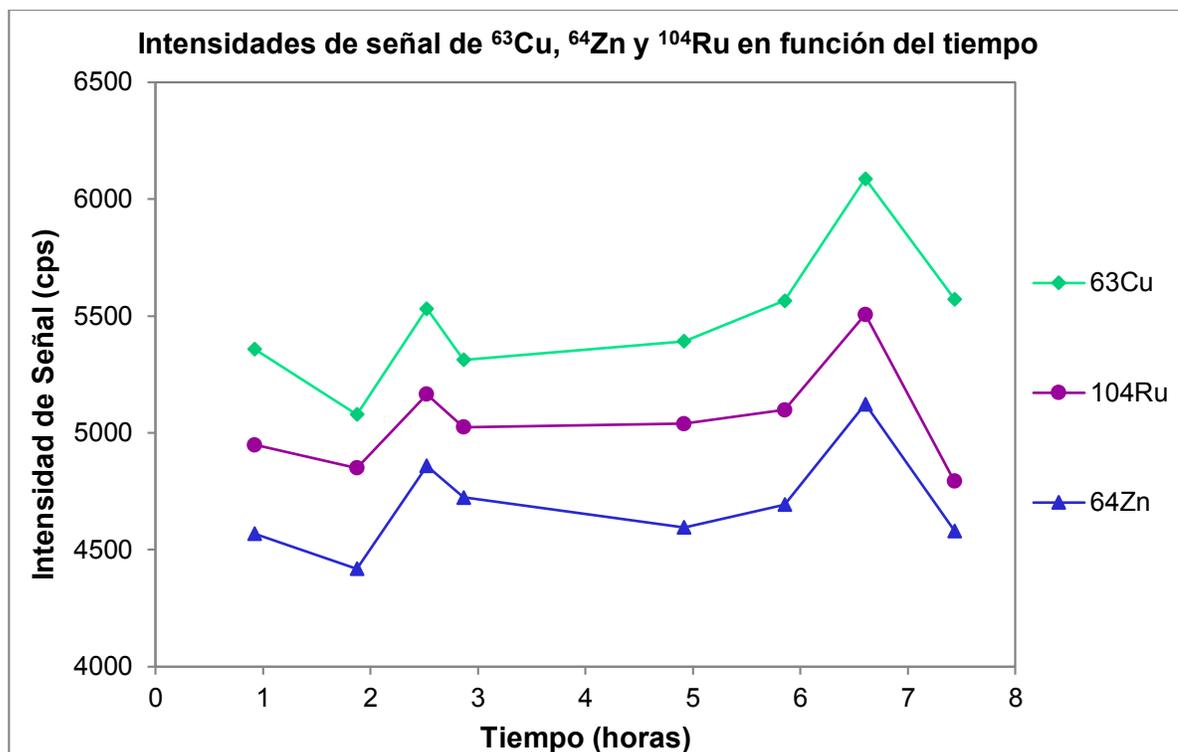
Como puede verse, las concentraciones son diferentes, esto debido a que cada sustancia genera una intensidad de señal muy diferente dentro del equipo de ICP-MS, por lo que para poder realizar una comparación que fuera efectiva entre los isótopos E.I. y sus respectivos isótopos analitos, se agregaron las cantidades adecuadas para obtener intensidades de señal parecidas o que al menos tuvieran el mismo orden de magnitud.



En seguida se muestran las intensidades de señal de cada uno de los isótopos analitos (^{63}Cu y ^{64}Zn) y el isótopo E.I. (^{104}Ru) en función del tiempo y su respectiva gráfica:

Tiempo (horas)	Intensidades de Señal (cps)		
	^{63}Cu	^{104}Ru	^{64}Zn
0.9	5357.246	4948.851	4568.376
1.9	5079.085	4849.298	4418.69
2.5	5531.015	5164.638	4858.64
2.9	5311.885	5023.889	4723.546
4.9	5391.932	5039.566	4596.181
5.9	5565.704	5097.932	4692.815
6.6	6086.881	5506.672	5122.773
7.4	5572.041	4792.934	4581.539

Tabla 40. Intensidades de señal para cada isótopo en función del tiempo.



Gráfica 9. Intensidades de señal de los isótopos ^{63}Cu , ^{64}Zn y ^{104}Ru en función del tiempo.



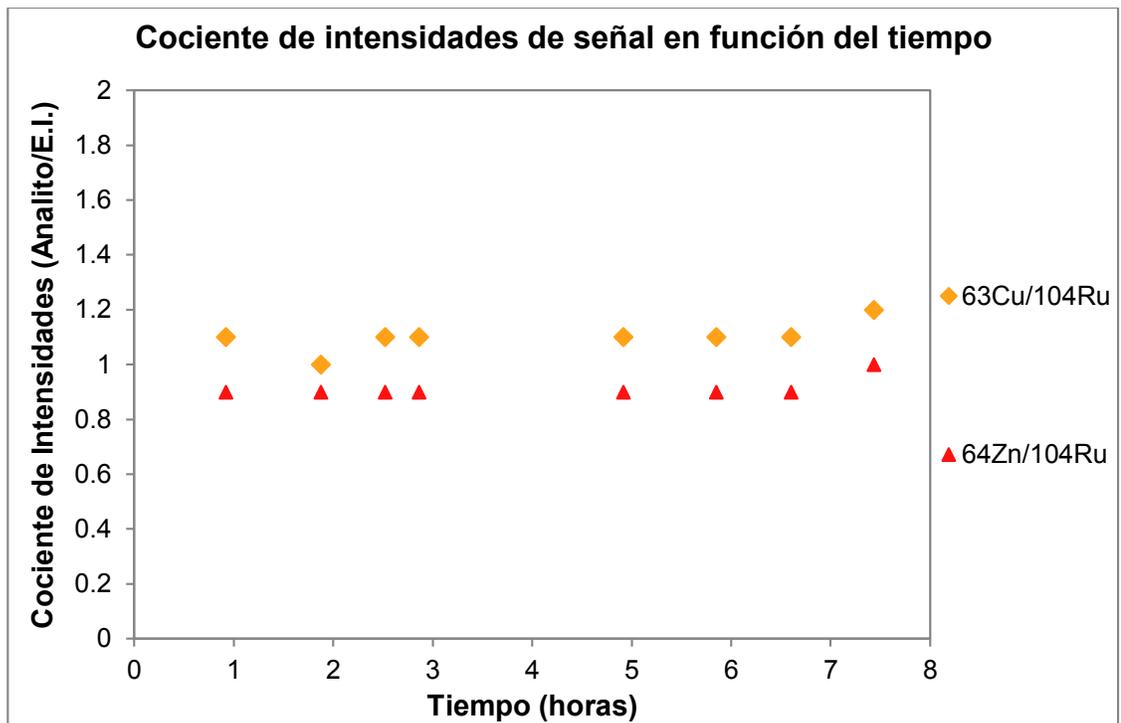
Como se puede observar, el aumento o disminución de la intensidad de señal en función del tiempo (deriva instrumental), es igual para todos los isótopos, lo cual quiere decir que se comportan de manera similar dentro del equipo de ICP-MS.

Por lo tanto, se concluye que el ^{104}Ru es un buen E.I. tanto para la cuantificación de Cu como de Zn, ya que al realizar el cociente de intensidades (Analito/E.I.), su valor se mantiene prácticamente constante a lo largo del tiempo.

A continuación se presentan los cocientes de señales para cada isótopo analito (^{63}Cu y ^{64}Zn) con respecto al isótopo E.I. (^{104}Ru) en función del tiempo, y su respectiva gráfica:

Tiempo (horas)	Cociente de Intensidades (Analito/E.I.)	
	$^{63}\text{Cu}/^{104}\text{Ru}$	$^{64}\text{Zn}/^{104}\text{Ru}$
0.9	1.1	0.9
1.9	1.0	0.9
2.5	1.1	0.9
2.9	1.1	0.9
4.9	1.1	0.9
5.9	1.1	0.9
6.6	1.1	0.9
7.4	1.2	1.0

Tabla 41. Cociente de intensidades (Analito/E.I.) en función del tiempo.



Gráfica 10. Cociente de intensidades (Analito/E.I.) en función del tiempo.

5.3.11. Resumen de los parámetros de desempeño

En seguida se presenta un resumen de todos los parámetros de desempeño calculados, para la metodología desarrollada:

Parámetro de Desempeño	Analito	
	Cobre	Zinc
<i>Límite de Detección</i> (µg/L)	3.278	8.497
<i>Límite de Cuantificación</i> (µg/L)	3.661	10.810
<i>Intervalo Lineal</i> (µg/L)	3.278 – 302.262	8.497 – 304.262



Parámetro de Desempeño		Analito	
		Cobre	Zinc
<i>Intervalo de Trabajo</i> ($\mu\text{g/L}$)		3.661 – 282.217	10.810 – 195.056
<i>Recuperación</i> (%)		97.17 \pm 3.44	92.96 \pm 2.56
<i>Exactitud</i>	%ER	-2.83	-7.04
<i>Precisión</i>	%RSD	1.77	1.38
<i>Sensibilidad</i> (cps*L/ μg)		551.243	219.664
<i>Selectividad</i> (%)		97.17	92.96
<i>Robustez</i>	%Recuperación	Ambos sistemas de digestión (MILESTONE y CEM) funcionan adecuadamente	
	%ER	Dentro de los valores aceptados	
	%RSD		

Tabla 42. Resumen de parámetros de desempeño para los analitos Cu y Zn.

5.4. Aplicación del método analítico desarrollado a muestras reales

Finalmente, después de la optimización de la metodología, se procedió a determinar los analitos de interés en las muestras reales de tejidos de ratón.

A las muestras se les realizaron previamente, los tratamientos físico y químico descritos en los puntos 4.4.2.2. y 4.4.2.3. respectivamente. Igualmente fueron diluidas gravimétricamente, de acuerdo al procedimiento descrito en el punto 4.4.3., antes de ser introducidas en el ICP-MS para su lectura.



Aplicación a muestras reales	
Técnica	Espectrometría de masas
Equipo	Espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS)
Tejidos de ratón (♂)	Bazo, hígado, pulmón, riñón, testículo y timo
Tratamiento físico	Decantación y secado (punto 4.4.2.2.)
Tratamiento químico	Digestión vía húmeda en sistema cerrado (punto 4.4.2.3.)
Diluciones gravimétricas	1:2, 1:10 y 1:50
Isótopos analitos	^{63}Cu y ^{64}Zn
Isótopos E.I.	^{104}Ru

Tabla 43. Aplicación de la metodología analítica desarrollada a muestras reales.

Para su introducción en el ICP-MS se comenzó por los blancos reactivos de cada serie, seguidos de las soluciones de las muestras reales (primero las más diluidas y al final las más concentradas).

5.4.1. Concentraciones de analitos obtenidas y su relación en las diferentes muestras

Las concentraciones de cada elemento en estudio (Cu y Zn), fueron calculadas a partir de las intensidades de señal determinadas por el ICP-MS empleando los isótopos analitos ^{63}Cu , ^{64}Zn y el isótopo E.I. ^{104}Ru , los cuales resultaron ser los mejores isótopos para llevar a cabo la determinación, como ya se explicó en puntos anteriores de este trabajo (punto 5.2).



En el punto **8.5**, se presenta un ejemplo de la manera de realizar los cálculos para conocer las concentraciones de los analitos Cu y Zn en los tejidos de ratón.

De las tres diluciones que se prepararon (1:2, 1:10 y 1:50) para ser introducidas al ICP-MS, se observó que la que funcionaba de manera más adecuada para la cuantificación de ambos analitos en la mayoría de las muestras, fue la de 1:10 y solamente en algunos casos se empleó la de 1:2 y con menor frecuencia aún, la de 1:50.

A continuación se presentan los intervalos de concentraciones encontradas para cada uno de los tejidos de acuerdo a sus respectivos rangos de pesos:

Tejido	Intervalo de Pesos (g)	Intervalo de Concentraciones (mg/kg)	
		[Cu]	[Zn]
Bazo	0.0160 – 0.1217	4.47 – 43.97	33.10 – 198.35
Hígado	0.0084 – 0.6847	5.88 – 27.78	10.28 – 258.07
Pulmón	0.0089 – 0.0670	2.90 – 12.74	3.68 – 122.75
Riñón	0.0232 – 0.8110	0.40 – 24.03	1.46 – 120.59
Testículo	0.0139 – 0.0733	3.45 – 19.75	14.99 – 118.09
Timo	0.0027 – 0.0263	2.38 – 11.11	12.33 – 173.86

Tabla 44. Intervalo de concentraciones de cada uno de los analitos en los diferentes tejidos de ratón, con respecto a su intervalo de pesos.

Al analizar los valores de las concentraciones, calculadas para ambos analitos (Cu y Zn) en las muestras, en general se observa que para el Zn son mayores que para de Cu; relación contraria a la presentada en los MRC utilizados (NIST 1577c y 529004 HPS), hechos de hígado de bovino y en donde el Cu aparece en mayor concentración que el Zn.



En seguida se muestran los valores reportados en la literatura, para los analitos Cu y Zn, determinados en algunos de los tejidos de ratón que se estudiaron en el presente trabajo:

Bibliografía	Equipo empleado	Tejido	Concentraciones		Unidades
			[Cu]	[Zn]	
Church, S.J. et al., 2008.	ICP-MS	Hígado	106	467	$\mu\text{mol} / \text{kg}$
Wang, Z. et al., 2014.	Espectrometría de absorción atómica	Hígado	3.96 ± 0.35	30.2 ± 5.7	$\mu\text{g} / \text{g}$
		Bazo	1.27 ± 0.26	27.9 ± 17.8	
		Riñón	4.03 ± 0.26	26.1 ± 9.8	
Bhatnagar, M. et al., 2003.	Espectrometría de absorción atómica	Hígado	1.13 ± 0.05	16.05 ± 0.71	mg / kg
		Riñón	1.97 ± 0.12	17.93 ± 1.04	
Cobbina, S.J. et al., 2015.	ICP-OES	Hígado	8.62 ± 1.29	59.96 ± 9.92	$\mu\text{g} / \text{g}$
		Riñón	15.61 ± 0.40	78.63 ± 5.50	

Tabla 45. Concentraciones de Cu y Zn en algunos tejidos de ratón, reportados en la literatura con sus respectivas unidades y equipo con el que se realizó la determinación.

A pesar de haberse encontrado poca información en la bibliografía (respecto a las concentraciones de Cu y Zn), los valores reportados presentan mayores cantidades de Zn que de Cu, lo cual confirma la relación encontrada para los tejidos analizados en este trabajo.



El estudio de la relación entre las concentraciones de Cu y Zn, en los tejidos de ratón analizados, no es parte sustancial de esta tesis, sin embargo se hizo una evaluación de manera muy superficial.

A continuación se presentan los promedios de concentración obtenidos para cada analito, en los diferentes tejidos de ratón, y la diferencia entre ellos:

Tejido	Concentración promedio (mg/kg)		Diferencia entre las concentraciones promedio de los analitos
	[Cu]	[Zn]	[Zn] – [Cu]
Bazo	11.48	84.40	72.92
Hígado	9.37	80.01	70.64
Pulmón	6.01	46.10	40.09
Riñón	7.22	37.21	29.99
Testículo	7.67	45.72	38.05
Timo	4.92	87.85	82.93

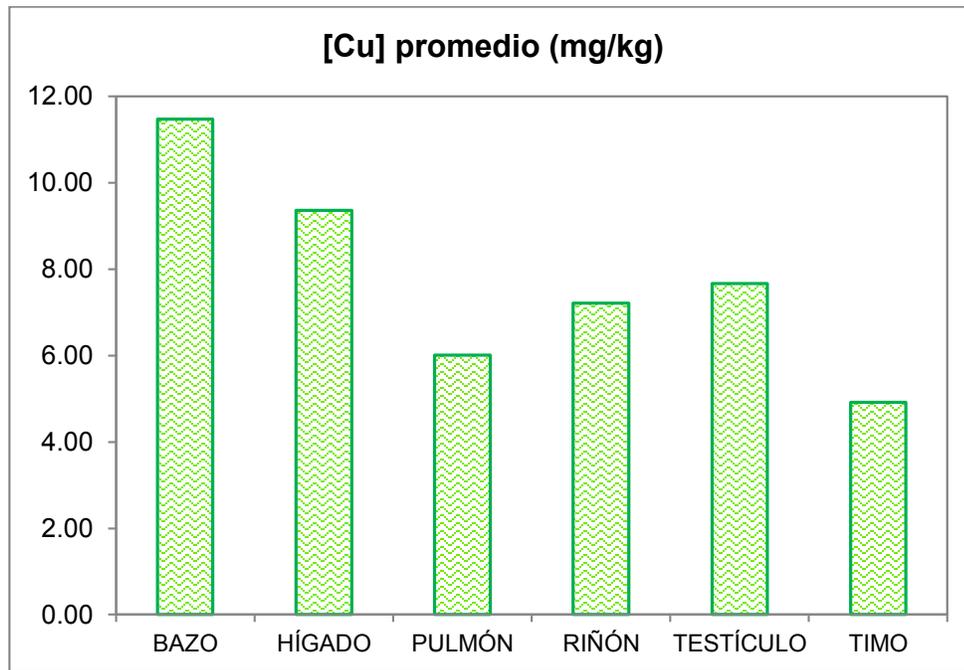
Tabla 46. Concentración promedio de cada uno de los analitos en los diferentes tejidos y su respectiva diferencia.

De esta tabla es posible apreciar que el valor más alto de la concentración promedio de Cu lo tiene el bazo, mientras que el menor lo tiene el timo. En cambio, para el caso de la concentración promedio de Zn, el valor más elevado lo tiene el timo y el más bajo el riñón.

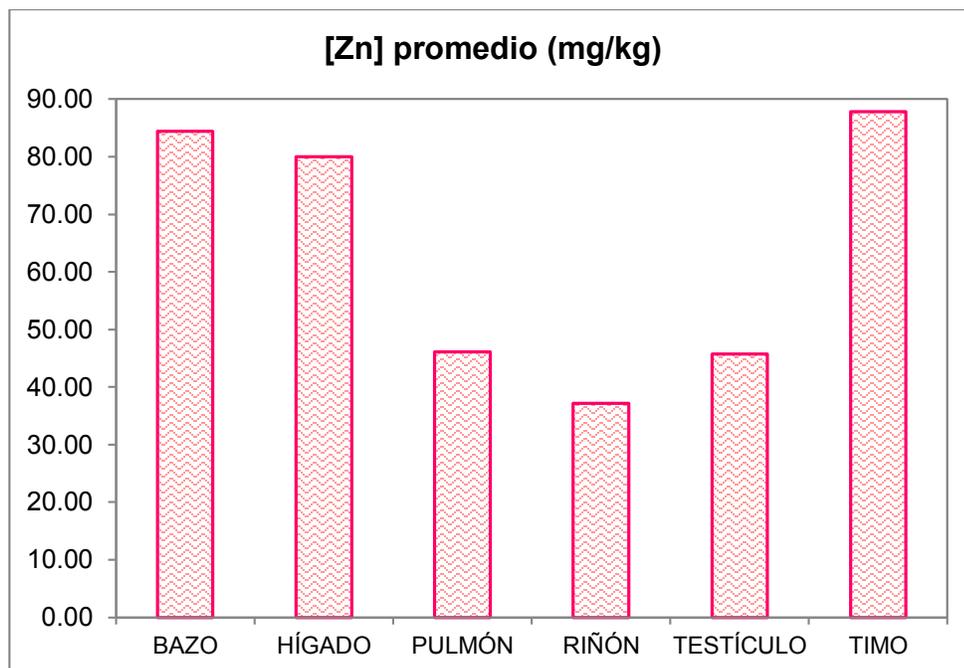
Se calculó de la diferencia entre las concentraciones promedio de Cu y Zn en cada uno de los tejidos, observando que el valor más grande se encuentra lo tiene el timo y el más chico el riñón.



En las siguientes gráficas, se presenta una comparación entre las concentraciones promedio de los analitos Cu y Zn, para cada uno de los tejidos:



Gráfica 11. Concentración promedio de Cu en los distintos tejidos.



Gráfica 12. Concentración promedio de Zn en los distintos tejidos.



Gracias a las gráficas anteriores, es posible hacer las siguientes observaciones:

- Los tejidos que presentan las concentraciones más altas de Cu son el bazo y el hígado, mientras que el tejido que tiene la menor concentración es el timo.
- En el caso del Zn los tejidos que tienen la mayor concentración son el timo, el bazo y el hígado, mientras que la menor se encuentra en el riñón.

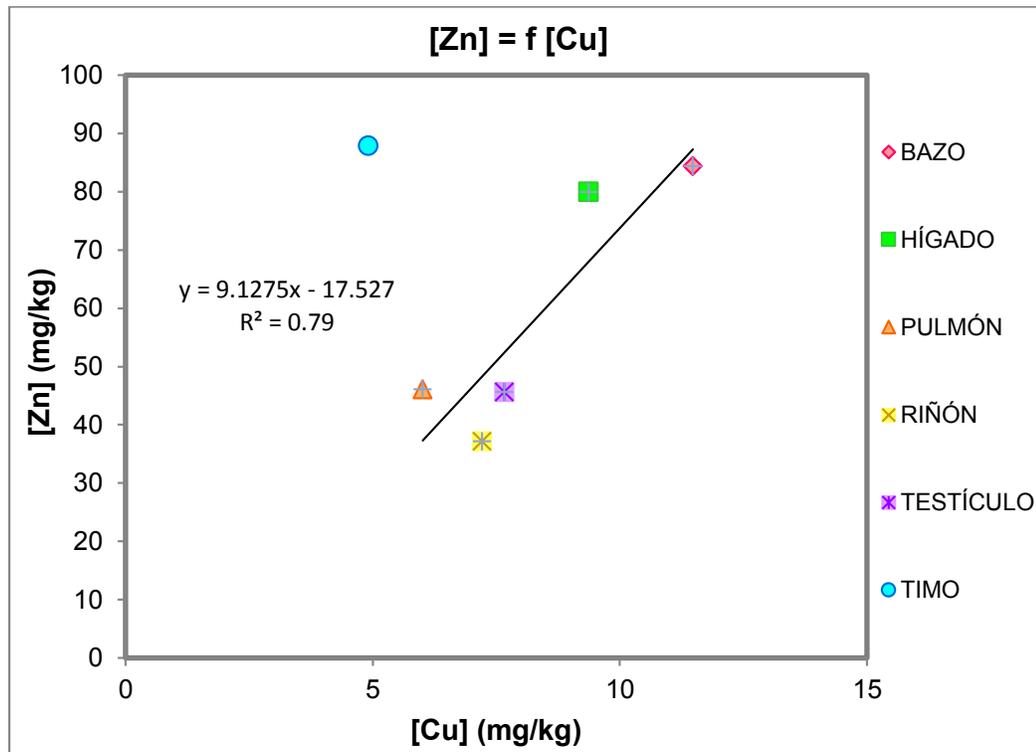
Calculando los cocientes de las concentraciones promedio de los analitos $[Cu]/[Zn]$ y $[Zn]/[Cu]$, se obtiene la tabla que se presenta a continuación:

Tejido	Cociente $[Cu] / [Zn]$	Cociente $[Zn] / [Cu]$
Bazo	0.14	7.35
Hígado	0.12	8.54
Pulmón	0.13	7.67
Riñón	0.19	5.15
Testículo	0.17	5.96
Timo	0.06	17.86

Tabla 47. Cociente de las concentraciones promedio de cada uno de los analitos en los diferentes tejidos (Cu/Zn y Zn/Cu).

Se puede apreciar que ambos cocientes Cu/Zn y Zn/Cu, de las concentraciones promedio, tienen un orden de magnitud similar para la mayoría de los tejidos estudiados.

En la siguiente gráfica se muestran las concentraciones promedio de Zn como función de las concentraciones promedio de Cu, para cada uno de los tejidos:

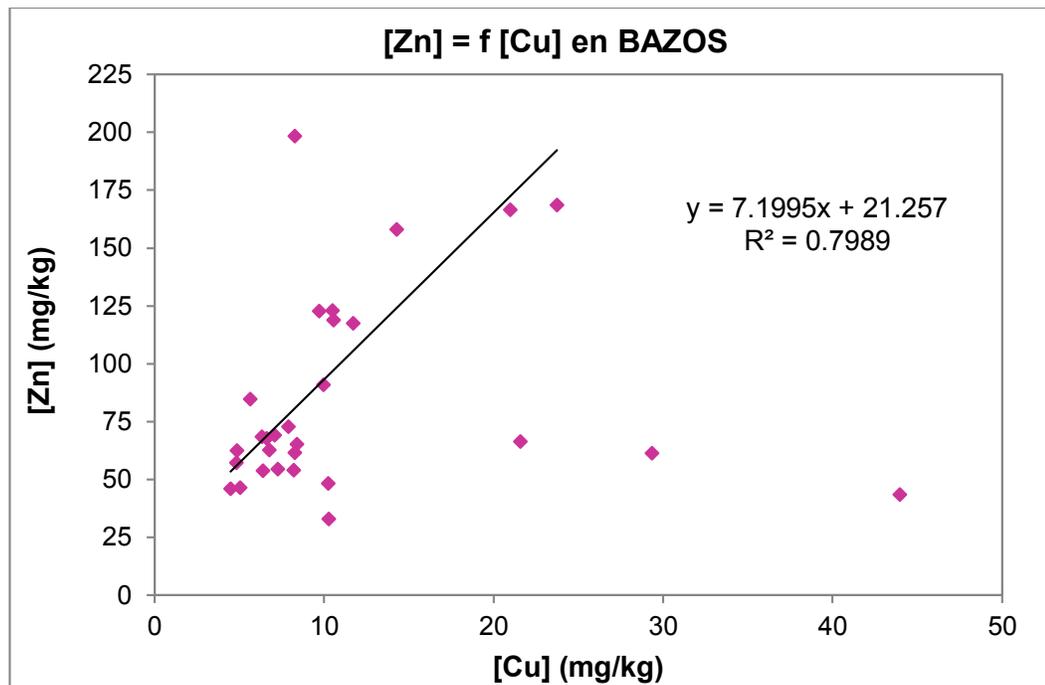


Gráfica 13. Concentración promedio de Zn en función de la concentración promedio de Cu.

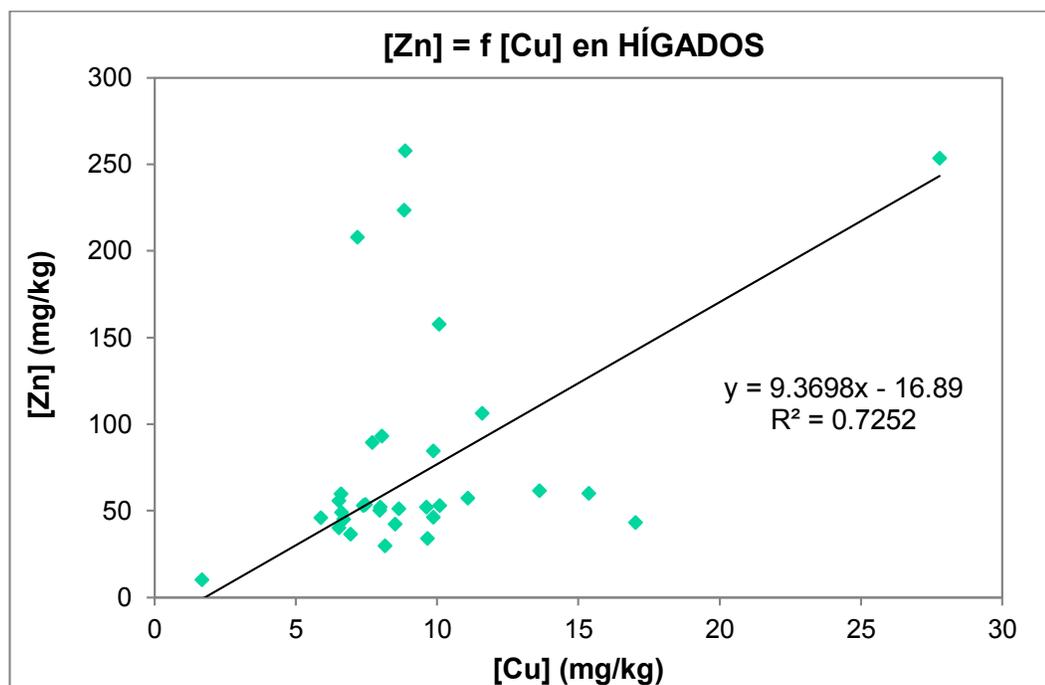
Observaciones de la gráfica anterior:

- En general los tejidos que tienen valores altos de Cu también tienen altos valores de Zn (bazo e hígado).
- Por otro lado, los tejidos que tienen bajos niveles de Cu también tienen niveles bajos de Zn (pulmón, riñón y testículo).
- El único tejido que tiene baja cantidad de Cu y alta de Zn es el timo.

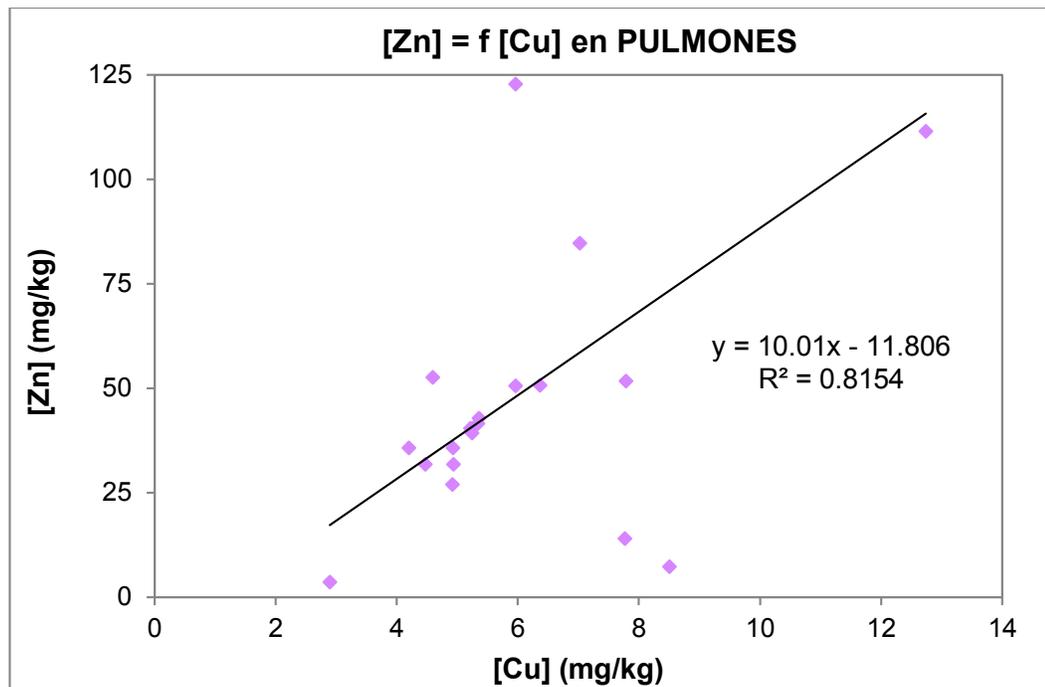
A continuación se presentan las gráficas de la concentración de Zn en función de la concentración de Cu, para cada tipo de tejido:



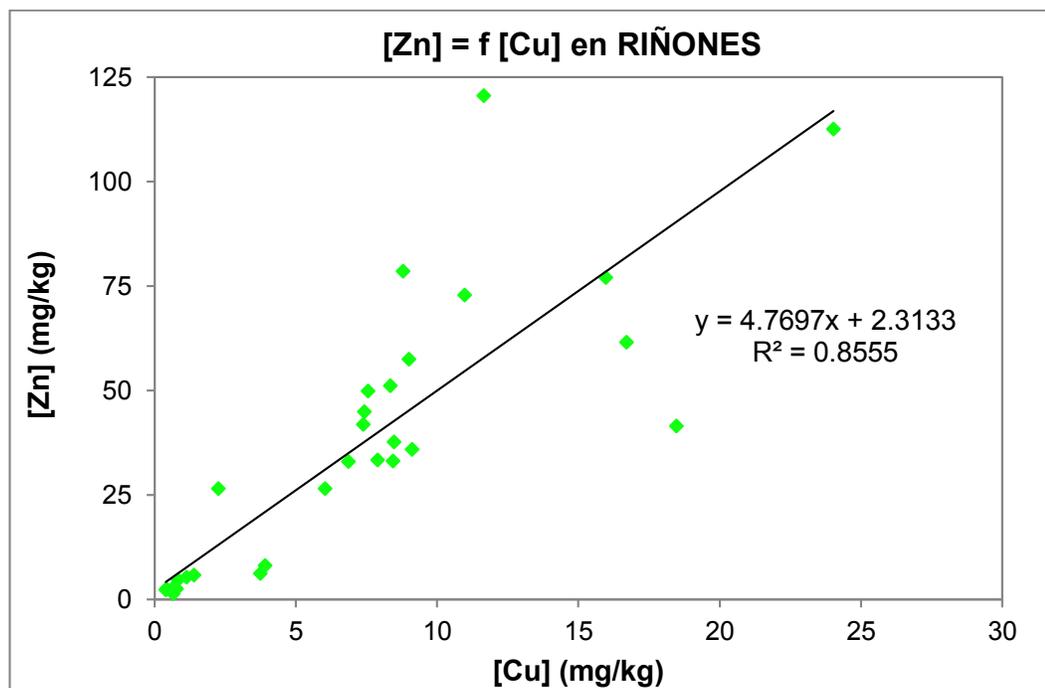
Gráfica 14. Concentración de Zn en función de la concentración de Cu para las muestras de bazos.



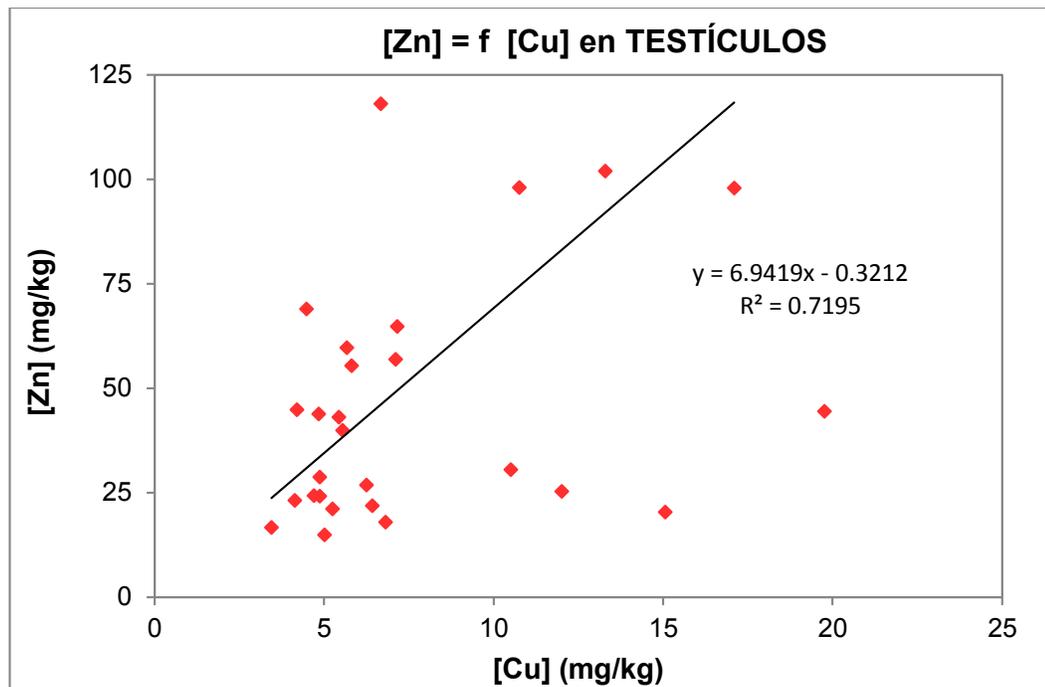
Gráfica 15. Concentración de Zn en función de la concentración de Cu para las muestras de hígados.



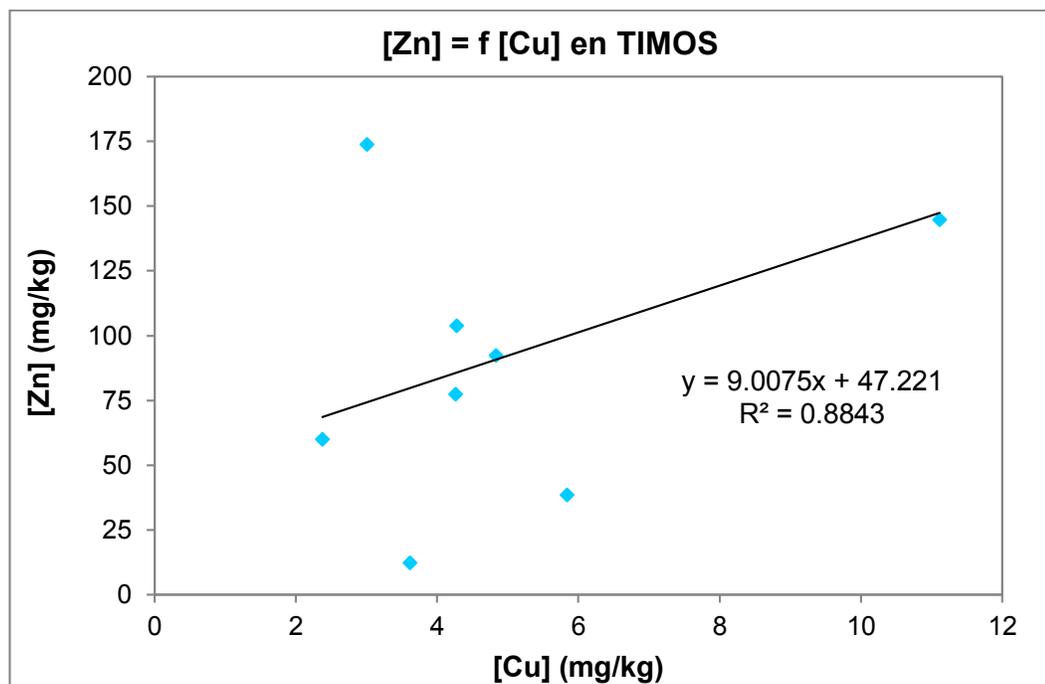
Gráfica 16. Concentración de Zn en función de la concentración de Cu para las muestras de pulmones.



Gráfica 17. Concentración de Zn en función de la concentración de Cu para las muestras de riñones.



Gráfica 18. Concentración de Zn en función de la concentración de Cu para las muestras de testículos.



Gráfica 19. Concentración de Zn en función de la concentración de Cu para las muestras de timos.



Observaciones de las gráficas anteriores:

- Bazos e hígados: la relación entre ambos en general no muestra una tendencia, aunque en unos pocos casos es posible apreciar que conforme la concentración de Cu aumenta, la de Zn disminuye.
- Pulmones, testículos y timos: para estas muestras fue imposible encontrar alguna relación entre ambos analitos, pues se muestran en general dispersos sus valores.
- Riñones: la mayoría de las muestras de este tejido tienen una tendencia más o menos evidente, en cuanto al comportamiento de los analitos, siendo entonces posible observar que al aumentar la concentración de Cu igualmente lo hace la de Zn.

5.4.2. Comportamiento de los analitos con respecto a las inhalaciones de Mn-V

Como se mencionó en el fundamento del presente trabajo (ver punto 3.5), los ratones de las cuales provienen los diferentes tejidos analizados, fueron expuestos a inhalaciones de una mezcla de gases de óxidos de manganeso y vanadio, que les fueron suministrados a diferentes cantidades.

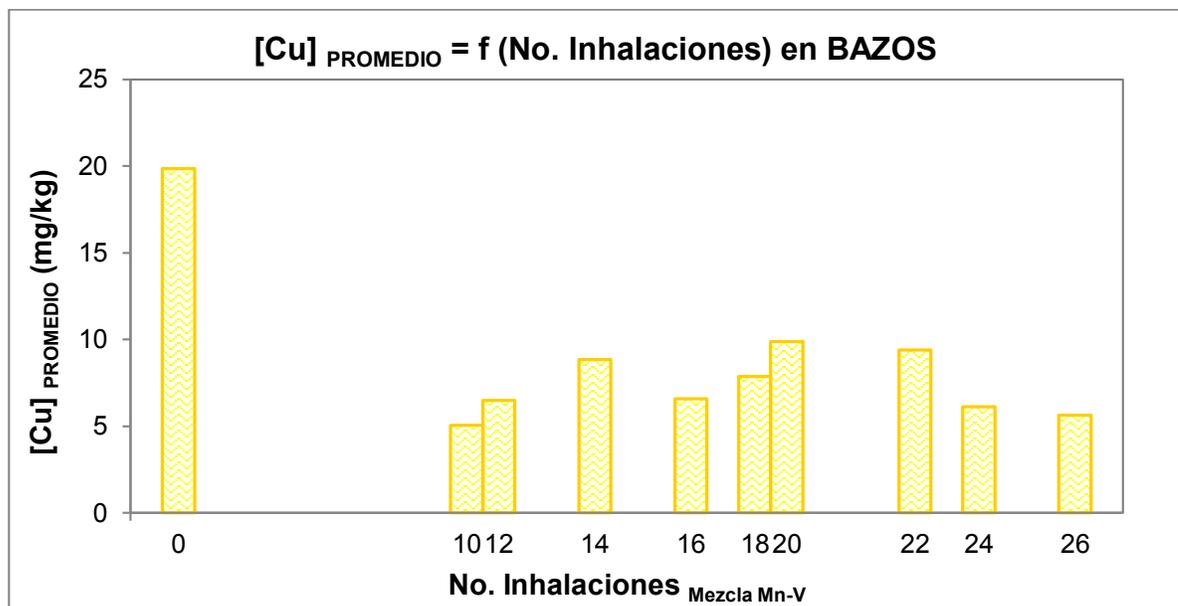
Debido a que el objetivo principal de este trabajo, era el desarrollo de la metodología analítica para poder cuantificar los analitos Cu y Zn, en los tejidos de órganos de ratón, mediante el empleo de un equipo de ICP-MS. El análisis exhaustivo del comportamiento de las concentraciones de los analitos, debido a la presencia de diferentes concentraciones de



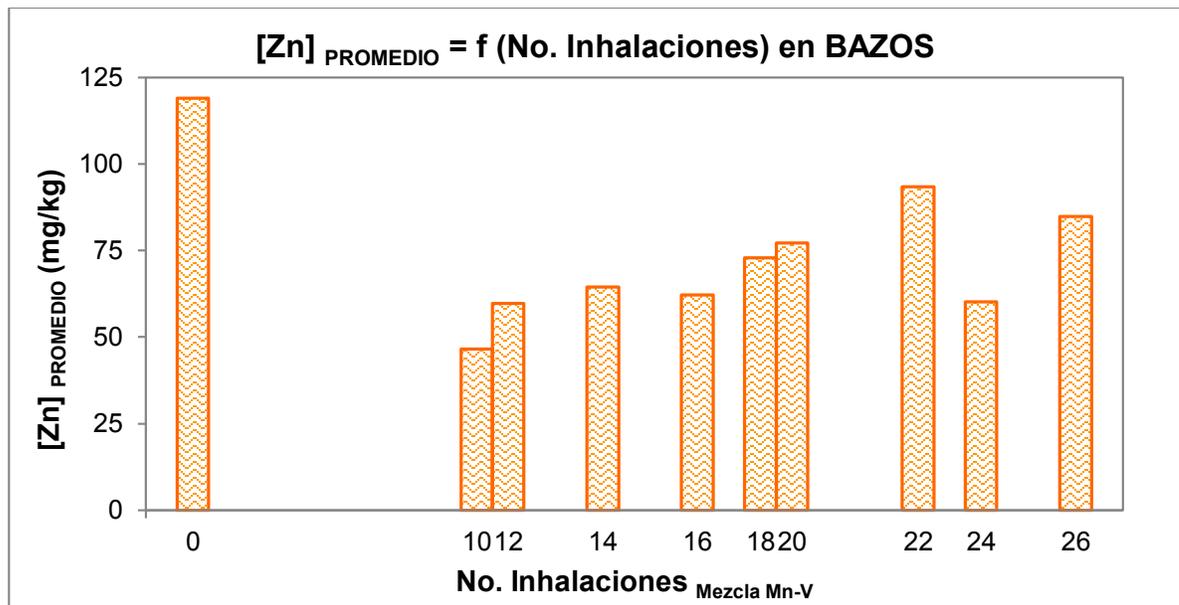
Mn y V, (o sea el efecto de dichas sustancias tóxicas, en los diferentes tejidos estudiados, de acuerdo a la cantidad de inhalaciones que recibieron), solamente se realizó de manera superficial.

Cabe aclarar que el número de inhalaciones aplicadas y la cantidad de tejidos que se tienen para cada una de dichas inhalaciones, son variables.

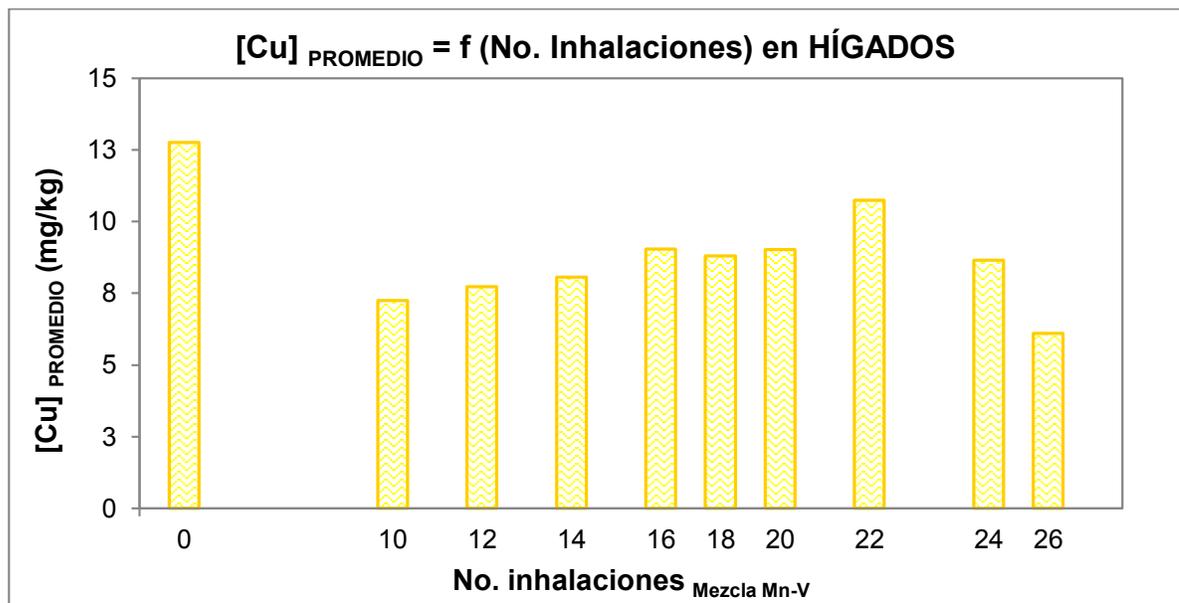
A continuación se presentan, para cada uno de los diferentes tipos de tejidos, dos gráficas (una para Cu y otra para Zn), donde se muestra la concentración promedio del analito, en función del número de inhalaciones a las que fue sometido el ratón de donde proviene esa muestra de tejido:



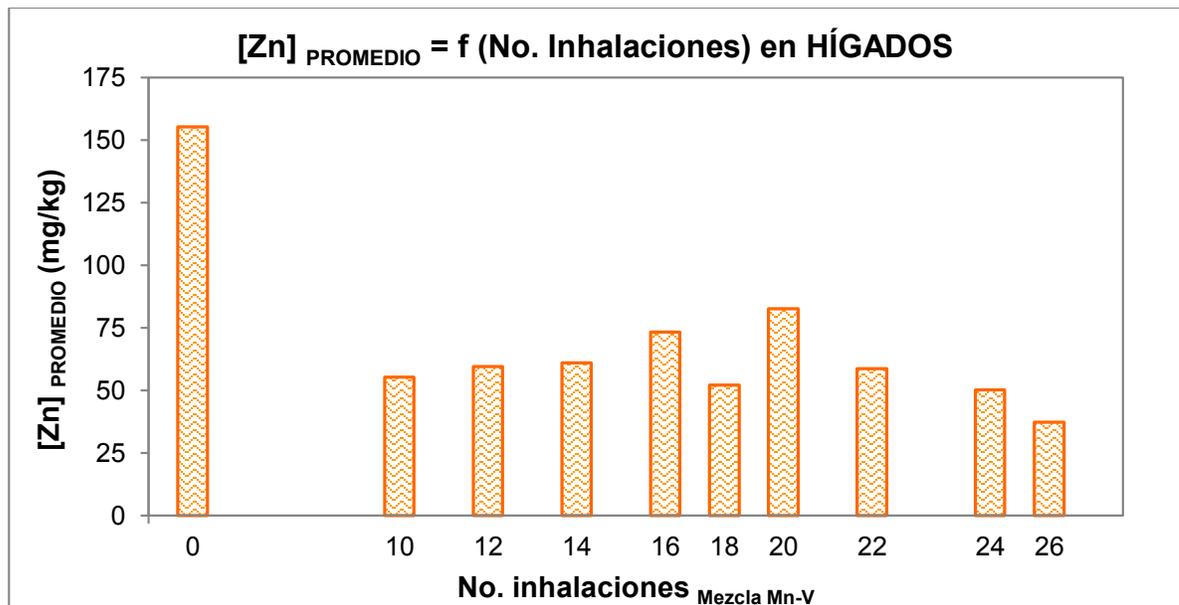
Gráfica 20. Concentración de Cu promedio en función del número de inhalaciones de la mezcla Mn-V en los tejidos de bazo.



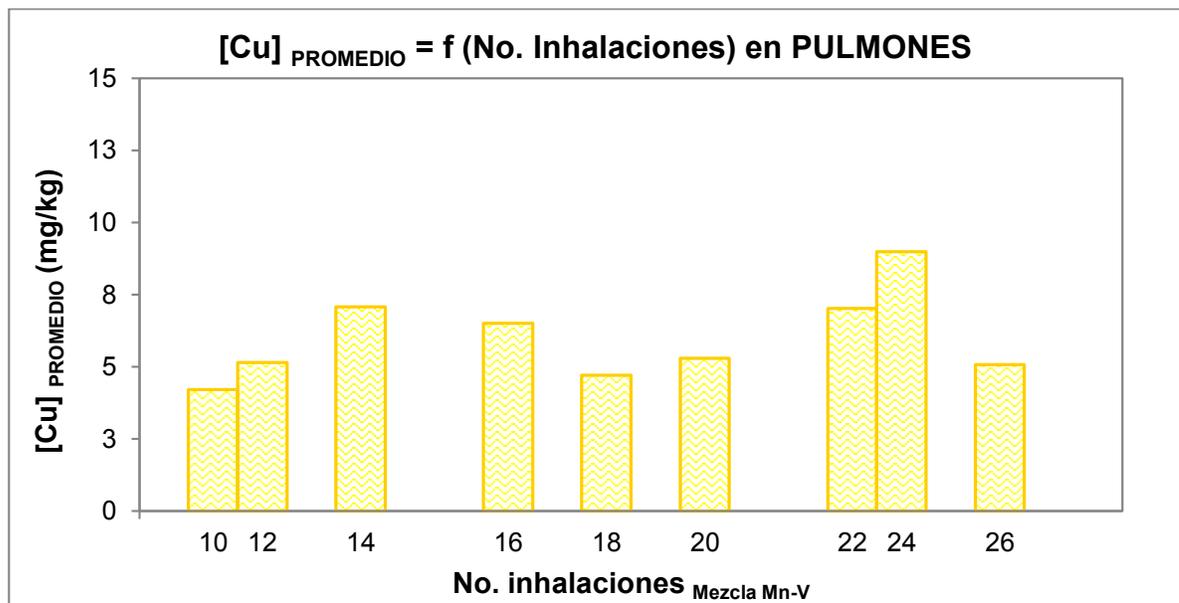
Gráfica 21. Concentración de Zn promedio en función del número de inhalaciones de la mezcla Mn-V en los tejidos de bazo.



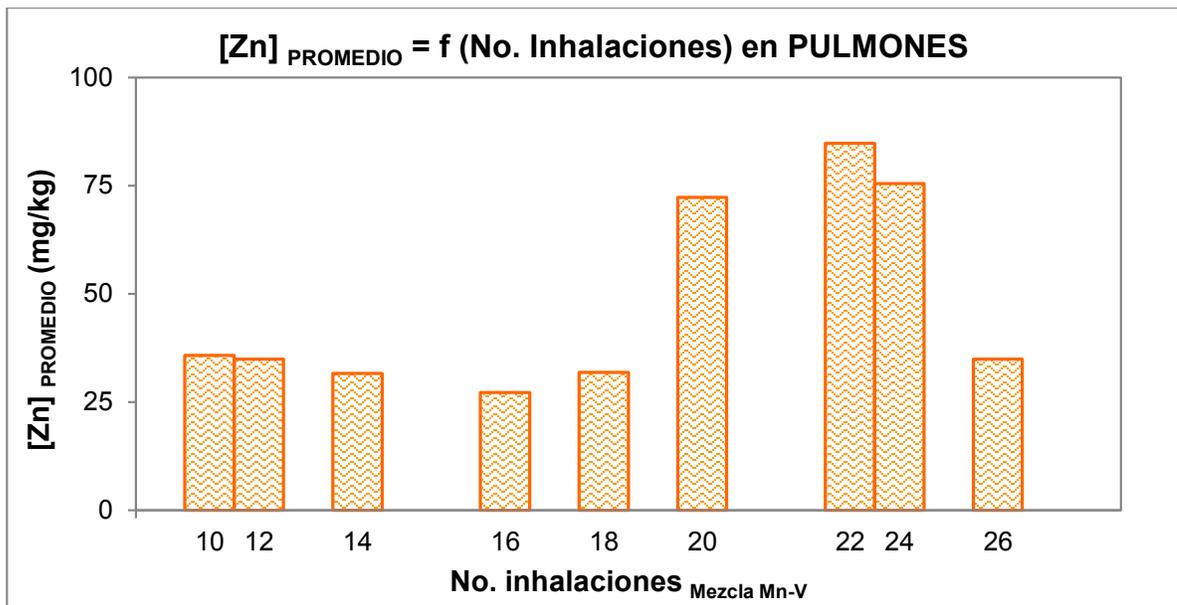
Gráfica 22. Concentración de Cu promedio en función del número de inhalaciones de la mezcla Mn-V en los tejidos de hígado.



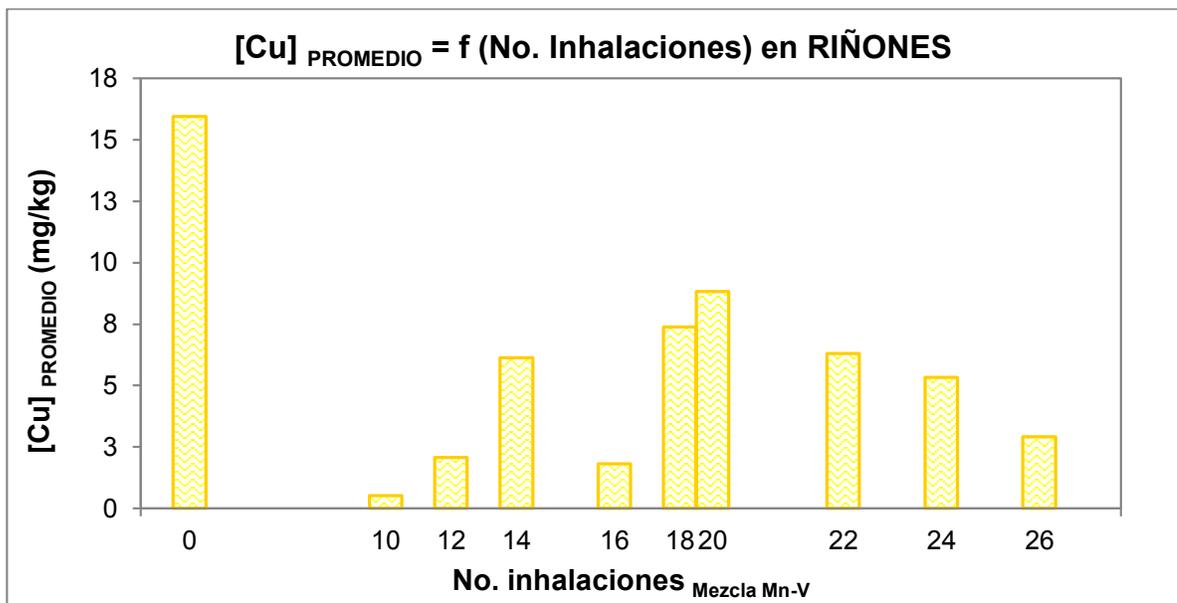
Gráfica 23. Concentración de Zn promedio en función del número de inhalaciones de la mezcla Mn-V en los tejidos de hígado.



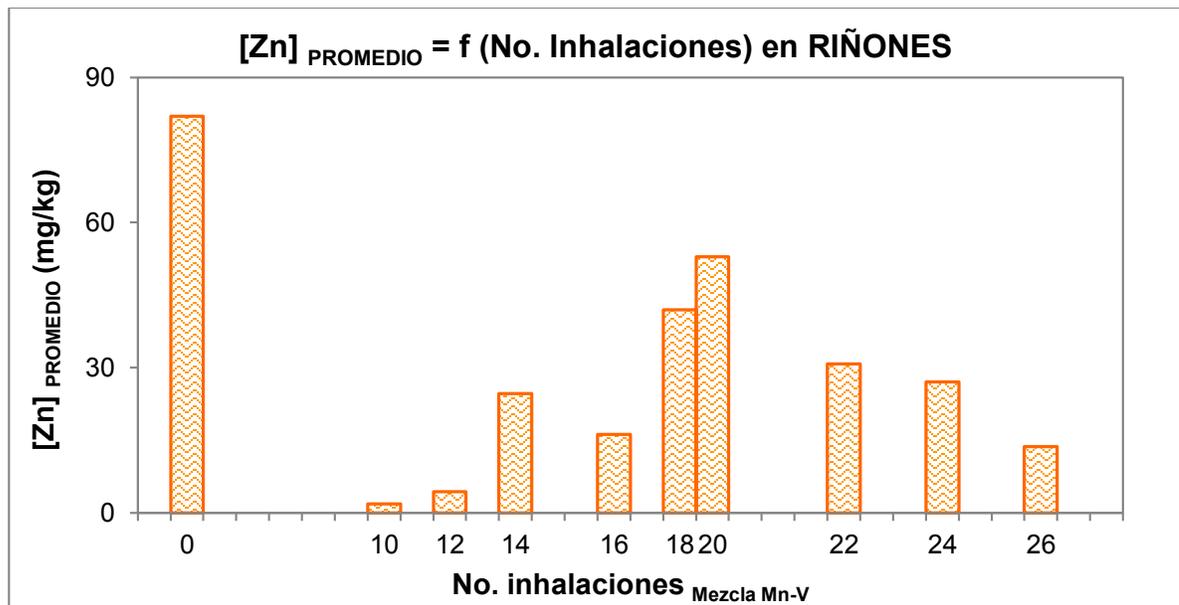
Gráfica 24. Concentración de Cu promedio en función del número de inhalaciones de la mezcla Mn-V en los tejidos de pulmón.



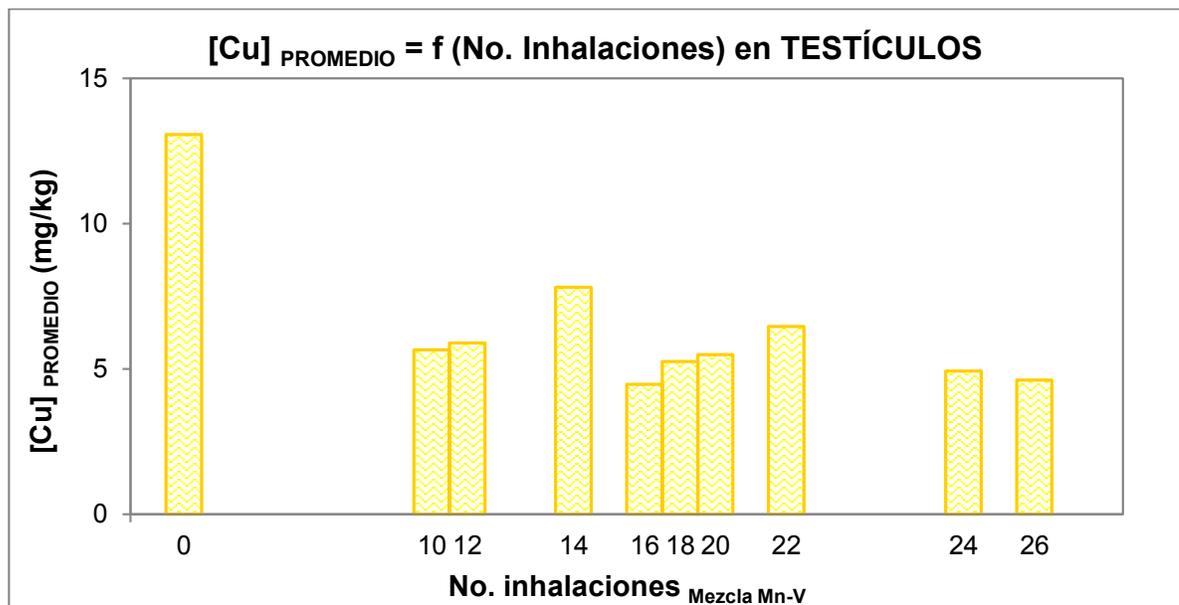
Gráfica 25. Concentración de Zn promedio en función del número de inhalaciones de la mezcla Mn-V en los tejidos de pulmón.



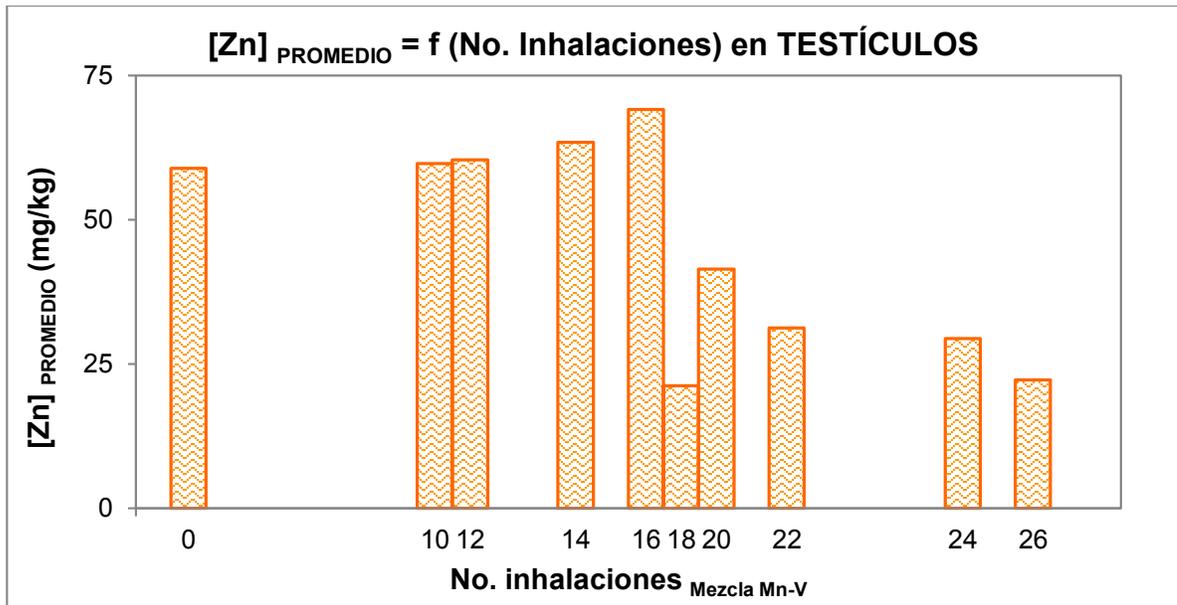
Gráfica 26. Concentración de Cu promedio en función del número de inhalaciones de la mezcla Mn-V en los tejidos de riñón.



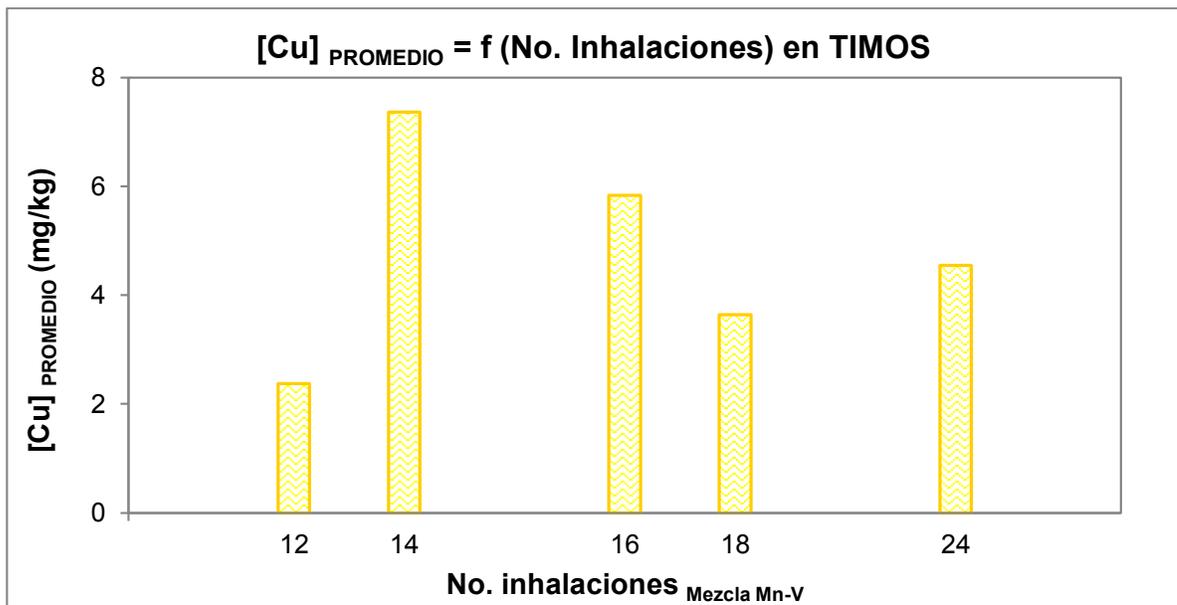
Gráfica 27. Concentración de Zn promedio en función del número de inhalaciones de la mezcla Mn-V en los tejidos de riñón.



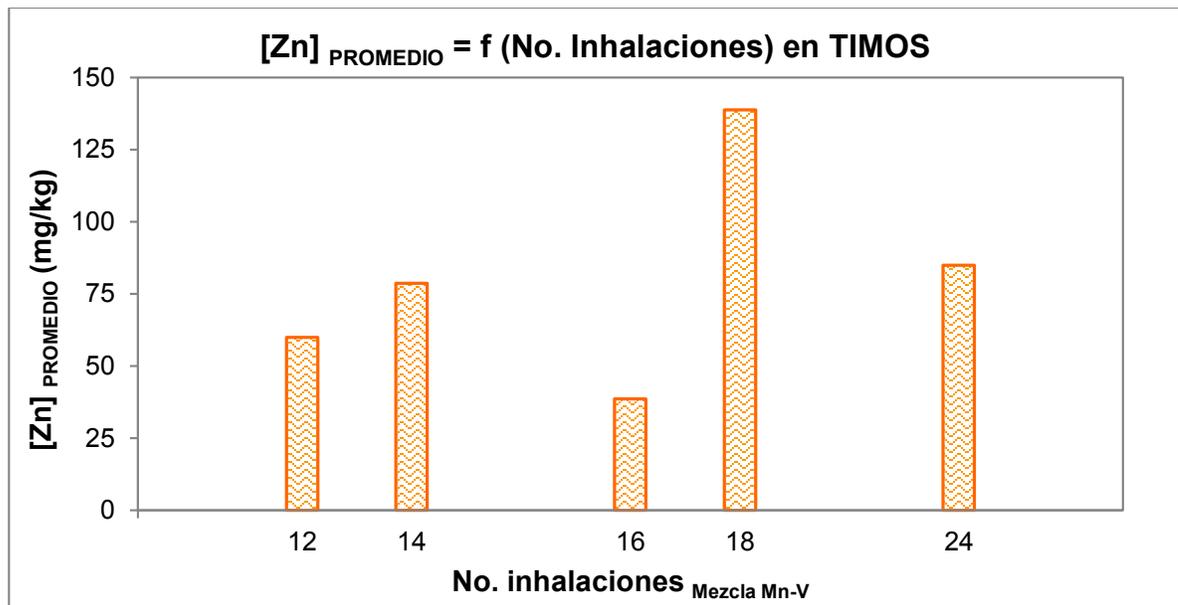
Gráfica 28. Concentración de Cu promedio en función del número de inhalaciones de la mezcla Mn-V en los tejidos de testículo.



Gráfica 29. Concentración de Zn promedio en función del número de inhalaciones de la mezcla Mn-V en los tejidos de testículo.



Gráfica 30. Concentración de Cu promedio en función del número de inhalaciones de la mezcla Mn-V en los tejidos de timo.



Gráfica 31. Concentración de Zn promedio en función del número de inhalaciones de la mezcla Mn-V en los tejidos de timo.

De las gráficas anteriores se pueden hacer las siguientes observaciones:

- Como ya se mencionó anteriormente, los valores de las concentraciones de Cu para la mayoría de las muestras, son mucho más pequeños que los de Zn. Por tal motivo, al comparar ambos con respecto al número de inhalaciones, los cambios en la concentración de Cu no son tan notables como los ocurridos en la de Zn.
- Solamente para los tejidos de bazos, hígados, riñones y testículos se tienen muestras control, las cuales sirven para conocer la concentración aproximada que deberían tener los ratones que no inhalaron la mezcla de gases de Mn y V (0



inhalaciones). Para el caso de bazos y riñones, las muestras control tienen los valores más altos de concentración promedio para ambos analitos.

- No existe un claro y generalizado comportamiento de los analitos Cu y Zn como consecuencia del número de inhalaciones de Mn-V, pero en general se puede apreciar lo siguiente:

- Bazos, hígados y riñones: la tendencia general para ambos analitos en la mayoría de estas muestras, es la de primero disminuir su concentración de 0 a 10 inhalaciones, luego incrementar para las inhalaciones que van de 12 a 22 y finalmente volver a disminuir para 24 y 26. En el riñón es donde este comportamiento puede ser apreciado más claramente.

- Pulmones: en el caso del Cu no existe ninguna tendencia que pueda ser apreciada; mientras que para el Zn la tendencia es la misma que la de bazos, hígados y riñones; donde se puede ver que la concentración disminuye entre 10 y 16 inhalaciones, posteriormente hay un incremento entre 18 y 22 y finalmente vuelve a disminuir para 24 y 26 inhalaciones.

- Testículos y timos: en estos tejidos fue imposible apreciar algún tipo de comportamiento, ya que los valores cambian de manera indiscriminada con respecto al número de inhalaciones.



6. CONCLUSIONES

Se logró el desarrollo de la metodología analítica para la cuantificación de Cu y Zn en matrices biológicas empleando un equipo de ICP-MS.

Con respecto a los datos obtenidos en la evaluación de los parámetros de desempeño analítico, puede asegurarse que la metodología desarrollada y descrita a lo largo del presente trabajo, es satisfactoria analíticamente; desde el tratamiento físico y químico del MRC y las muestras, hasta la determinación analítica mediante el equipo de ICP-MS.

Por lo tanto, el método analítico desarrollado es susceptible de aplicarse sin ningún problema sobre muestras biológicas, específicamente tejidos de ratón (bazos, hígados, pulmones, riñones, testículos y timos), arrojando resultados confiables.

Para la optimización de la metodología analítica se consideraron los siguientes aspectos:

Se reconoció la importancia de llevar a cabo una adecuada limpieza del material utilizado y se demostró que este procedimiento fue llevado a cabo de manera correcta.

Se demostró que el tratamiento químico, realizado sobre el Material de Referencia Certificado y las muestras, destruye la materia orgánica y libera a la solución digerida los metales contenidos en la matriz de las muestras, sin que los ácidos empleados para dicho proceso generen interferencias adicionales en la determinación. Igualmente es importante



señalar que el empleo de equipos de microondas diferentes, para la digestión por vía húmeda, no afecta el buen desempeño del tratamiento químico.

En cuanto a la realización de diluciones, se confirmó que ayudan a disminuir las posibles interferencias asociadas con la matriz. Así mismo, la realización de la dilución por vía gravimétrica aumenta la precisión con la que se calculan los factores de dilución, los cuales son valores importantes para la determinación de la concentración de los analitos en las muestras.

Con respecto a las condiciones analíticas se puede decir en primer lugar, que los isótopos analitos elegidos para realizar las determinaciones en el ICP-MS, fueron ^{63}Cu y ^{64}Zn , por tener valores altos de abundancia, la menor cantidad posible de interferencias y contar con formas de eliminarlas en caso de existir.

En segundo lugar, es necesario mencionar que fue elegido el isótopo ^{104}Ru como el mejor E.I., por tener un comportamiento analítico similar al del analito (corrección de variaciones de la respuesta instrumental), ser una sustancia pura, no encontrarse presente en la matriz en estudio, no interferir en la cuantificación del analito, encontrarse a una concentración constante en todas las disoluciones de estudio y no reaccionar con los demás elementos presentes.

Igualmente, al realizar la curva de calibración (con este mismo E.I.), los valores de R^2 y del ángulo de la pendiente (θ), fueron cercanos a 1 y 45° respectivamente; y al analizar el MRC (NIST 1577c), los valores del error relativo se encontraron dentro del rango aceptado.



También se logró conocer adecuadamente el funcionamiento del ICP-MS, reconociendo la importancia de llevar a cabo constantemente una limpieza de los conos de níquel, ya que éstos pueden acumular contaminantes que obstruyan el paso de la muestra hacia el analizador de masas. Igualmente es necesario cambiar periódicamente las mangueras capilares que sirven para la introducción de las muestras, pues con el tiempo pierden su tensión original y evitan que el sistema de introducción de muestras funcione bien.

Así mismo, con el flujo adecuado del gas nebulizador se logró minimizar de manera satisfactoria, las interferencias poliatómicas debidas a especies moleculares o doblemente cargadas, lo cual se midió a través de los cocientes $^{156}\text{CeO}^+ / ^{140}\text{Ce}^+$ y $^{138}\text{Ba}^{2+} / ^{138}\text{Ba}^+$ caracterizados a diferentes flujos. Por lo tanto, se lograron optimizar las condiciones instrumentales bajo las cuales se debe trabajar con el equipo de ICP-MS para realizar adecuadamente la determinación de Cu y Zn en matrices biológicas usando el método del estándar interno.

Debido a todo lo anterior, se puede decir que el empleo del ICP-MS fue exitoso para la determinación de analitos en concentraciones bajas. Pues se obtuvieron valores confiables con una calidad analítica adecuada, como lo demuestran los parámetros de desempeño de la tabla 42.

Por otra parte, respecto a la aplicación del método analítico desarrollado en muestras reales, se concluye que:



Pese a que las muestras reales eran muy pequeñas, se logró determinar la concentración de cada uno de los analitos en la gran mayoría de ellas. Es importante notar que al realizar un análisis químico, con muestras únicas y de las cuales se tienen cantidades muy pequeñas, es de suma importancia contar con una metodología analítica confiable, ya que realizar el análisis conlleva una gran responsabilidad.

En cuanto a las concentraciones de los analitos en las muestras, cabe mencionar que en general los valores para el Zn son mucho mayores que los de Cu en todos los tejidos analizados. Lo anterior se confirma al comparar con resultados reportados en la literatura, pues los valores encontrados para algunos de los tejidos de ratón, igualmente son mucho más elevados para el Zn que para el Cu.

Los tejidos que presentan las concentraciones más altas de Cu son bazo e hígado, mientras que la menor se encuentra en el timo. En cambio para el Zn, los tejidos con la más alta concentración son timo, bazo e hígado, y la más baja riñón.

Al analizar el comportamiento de ambos analitos, puede afirmarse que los tejidos con valores elevados de Cu, en general también tienen altos valores de Zn, mientras que los que tienen bajos niveles de Cu también tienen poco Zn. El único tejido que tienen una baja cantidad de Cu y alta de Zn es el timo.

Finalmente, al estudiar el comportamiento de los analitos Cu y Zn con respecto al número de inhalaciones de la mezcla de gases de óxidos de Mn y V, a las que fue sometido el ratón del que provienen las muestras; puede decirse que no existe una clara y generalizada



tendencia. Se encontró únicamente que para bazo, hígado y riñón, hay primero una disminución de las concentraciones de ambos analitos de 0 a 10 inhalaciones, posteriormente se vuelve a incrementar entre 12 y 22 inhalaciones y finalmente vuelve a disminuir para 24 y 26 inhalaciones. Para pulmón, testículo y timo no fue posible apreciar claramente algún tipo de comportamiento.



7. BIBLIOGRAFÍA

Agilent Technologies (2005). ICP-MS, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, A primer. Publication Number 5989-3526EN. USA: www.agilent.com/chem/icpms (11/01/2012, 6:15 pm).

AOAC (2002). Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals.

http://www.aoac.org/imis15_prod/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/SLV_Guidelines_Dietary_Supplements.pdf (14/03/2015, 8:42 am).

AOAC (2012). Guidelines for Standard Method Performance Requirements. Appendix F. Official Methods of Analysis. http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf (08/09/2015, &:30am).

Bhatnagar, M., Rao, P., Bhatnagar, C. y Bhatnagar, R. (2003). Trace element concentration in various tissues following fluoride administration to female mice. *Indian Journal of Experimental Biology*, Vol. 41, pp. 652-654.

Becker, J.S. (2007). *Inorganic Mass Spectrometry, Principles and Applications*. Singapore: Ed. John Wiley & Sons, Ltd.

Berglund, M. y Wieser, M.E. (2011). Isotopic compositions of the elements 2009 (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, Vol. 83, No. 2, pp. 397-410.

Cenam (2008). Guía técnica sobre trazabilidad e incertidumbre en las mediciones analíticas que emplean las técnicas de espectrofotometría de absorción atómica y de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente. México.

Chang, R. (2002). *Química*. 7ª ed. Colombia: McGraw Hill.



- Cheatham, M.M., Sangrey, W.F. y White, W.M. (1993). Sources of error in external calibration ICP-MS analysis of geological samples and an improved non-linear drift correction procedure. *Spectrochimica Acta, Part B-atomic Spectroscopy*, Vol. 48, No. 3, pp. 487-506.
- Church, S.J., Begley, P., Kureishy, N., McHarg, S., Bishop, P.N., Bechtold, D.A., Unwin, R.D. y Cooper, G.J.S. (2015). Deficient copper concentrations in dried-defatted hepatic tissue from ob/ob mice: A potential model for study of defective copper regulation in metabolic liver disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 460, pp. 549-554.
- Cobbina, S.J., Chen, Y., Zhou, Z., Wu, X., Feng, W., Wang, W., Li, Q., Zhao, T., Mao, G. y Yang, L. (2015). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, Vol. 39, pp. 280-291.
- Dean, J.R. (2005). *Practical Inductively Coupled Plasma Spectroscopy*. Great Britain: Ed. John Wiley & Sons, Ltd.
- DeSilva, B., Smith W., Weiner R., Kelley M., Smolec J.M., Lee B., Khan M., Tacey R., Hill H. and Celniker A. (2003). Recommendations for the Bioanalytical Method Validation of Ligand-binding Assays to support Pharmacokinetic Assessments of Macromolecules. *Pharmaceutical Research*, Vol. 20. No. 11. pp. 1885-1900.
- Dunnivant, F.M. y Ginsbach, J.W. (2009). *Flame Atomic Absorbance, Emission Spectroscopy and Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*. USA: Whitman College, Chemistry Department,
http://people.whitman.edu/~dunnivfm/FAASICPMS_Ebook/CH3/index.html
(06/08/2014, 4:00 pm).



- Eurachem (2005). Métodos analíticos adecuados a su propósito, Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados. 2ª ed. México: Centro Nacional de Metrología, CENAM.
- European Commission (2013). Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/guidance_documents/docs/qualcontrol_en.pdf (10/03/2015, 7:30 pm).
- Faller, A. (2006). Estructura y función del cuerpo humano. 13ª ed. España: Editorial Paidotribo.
- Fuentes, P.F.M., Mendoza, Y.R.A., Rosales, F.A.L. y Cisneros, T.R.A. (2008). Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón. Centro Nacional de Productos Biológicos. Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.
- Gad, S.C. (2005). Manganese. Encyclopedia of Toxicology. Elsevier Inc. Vol. 3, pp. 11-13. And Vanadium. Encyclopedia of Toxicology, Vol. 4, pp. 416-418.
- Gad, S.C. (2007). Animal Models in Toxicology. 2ª ed. U.S.A.: Taylor & Francis Group.
- García, G. B. (2006). El vanadio, un elemento ambiguo. Acta Toxicol. Argent, Vol.14, No. 2, pp. 32-36.
- García, M.C. (2012). Determinación de parámetros de desempeño del método de disolución de tabletas de alopurinol 300 miligramos aplicando espectrofotometría ultravioleta visible. Tesis de licenciatura, Facultad de química y Farmacia, Universidad de el Salvador, El Salvador, Centroamérica.
- Gates, P. (2008). Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS), Figure 2. A schematic of a quadrupole analyzer. United Kingdom: Organic Geochemistry Unit, School of



- Chemistry, University of Bristol, <http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/gcms.html> (06/08/2014, 5:30 pm).
- Gummow, B. (2011). Vanadium: Environmental Pollution and Health Effects. School of Veterinary and Biomedical Sciences, James Cook University. Townsville, QDL, Australia. Elsevier B. V.
- Hernández, R.M. y Sastre, G.A. (1999). Tratado de nutrición. Madrid: Ediciones Díaz de Santos.
- Kelly, W.R., MacDonald, B.S. y Guthrie, W.F. (2008). Gravimetric approach to the standard addition method in instrumental analysis 1. *Analytical Chemistry*, Vol. 80, No. 16, 6154-6158.
- Kmetov, V., Stefanova, V., Hristozov, D., Georgieva, D. y Canals, A. (2003). Determination of calcium, iron and manganese in moss by automated discrete sampling flame atomic absorption spectrometry as an alternative to ICP-MS analysis. *Talanta*, Vol. 59, pp. 123-136.
- Košler, J. y Sylvester, P.J. (2003). Present Trends and the Future of Zirconium in Geochronology: Laser Ablation ICPMS. *Review in Mineralogy and Geochemistry*, Vol. 53, pp. 243-275.
- León, Z.R. (2013). Desarrollo de la metodología analítica para la determinación de vanadio y manganeso en matrices biológicas mediante ICP-MS. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México.
- Litter, M.I., Armienta, A. y Farías, S.S. (2009). Metodologías analíticas para la determinación y especiación de arsénico en aguas y suelos, IBEROARSEN. Argentina: Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, CYTED.



- Liu, X., Piao, J. Huang, Z., Zhang, S-Q., Li, W., Tian, Y. and Yang X. (2014). Determination of 16 selected trace elements in children plasma from China economical developed rural areas using high resolution magnetic sector inductively coupled mass spectrometry. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, Vol. 2014, Article ID975820, 6 pages.
- Longo, D.L., Kasper, D.L., Jameson, J.L., Fauci, A.S., Hauser, S.L. y Loscalzo, J., editores (2012). *Harrison: principios de medicina interna*, Vol. 1. 18ª ed. México: McGraw Hill.
- Lucio, S.A.I. (2011). *Medición de elementos mayores y trazas muestras graníticas utilizando la técnica de ICP-OES*. Tesis de Licenciatura. Universidad Tecnológica de Querétaro (UTEQ), México.
- Maret, W. and Sandstead, H. H. (2006). Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, Vol. 20, pp. 3-18.
- May, T.W. y Wiedmeyer, R.H. (1998). A Table of Polyatomic Interferences in ICP-MS. *Atomic Spectroscopy*, Vol. 19, No. 5.
- Menéndez, A.M., Montemerlo, H., Weisstaub, A.R., Alloattii, S., Rusi, F., Guidoni, M.E., Casávola, C., Piñeiro, A. y Pita Martín de Portela, M.L. (2005). Niveles plasmáticos y eritrocitarios de zinc y cobre en pacientes críticos con nutrición parenteral y su relación con el contenido de las fórmulas: estudio preliminar. *Nutrición Hospitalaria*, Vol. XX, No. 3, pp. 189-196.
- Merck Millipore (2013). Periodic table of the elements. <http://www.merckmillipore.com/lab-essentials> (23/04/2014, 12:59 pm).



- Mesko, M.F., Hartwig, C.A., Bizzi, C.A., Pereira, J.S.F., Mello, P.A. y Flores, E.M.M. (2011). Sample preparation strategies for bioinorganic analysis by inductively coupled plasma mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, Vol. 307, pp. 123-136.
- Michalke, B. and Fernsebner, K. (2014). New insights into manganese toxicity and speciation. *Journal of Trace elements in Medicine and Biology*. Vol. 28. pp.106-116.
- NIST (2009). Certificate of Analysis, Standard Reference Material® 1577c, Bovine Liver. National Institute of Standards & Technology. USA.
- Osredkar, J. y Sustar, N. (2011). Copper and Zinc, Biological Role and Significance of Copper/Zinc Imbalance. *Journal of Clinical Toxicology*, S3:001.
- PerkinElmer (2003). The ELAN® Series of ICP-Mass Spectrometers, simplifying Ultratrace Analysis. Perkin Elmer SCIEX. University of Illinois at Urbana Champaign SCS School of Chemical Sciences. USA: http://scs.illinois.edu/microanalysis/docs/ICP_MS_PT.pdf (23/04/2014, 3:48 pm).
- PerkinElmer (2004). Guide to Inorganic Analysis from the leaders in AA, ICP-OES and ICP-MS. Perkin Elmer Precisely. USA: http://www.d.umn.edu/~jevans1/chem%204242%20s14/Problem%20Sets/for%20ps%203/GDE_InorganicAnalysis%20from%20pe.pdf (06/08/2014, 3:40 pm).
- PerkinElmer (2008). Software Reference Guide, ELAN ® 3.4 Hotfix 1 ICP-MS Instrument Control Software. Canada: Editions MDS y Perkin Elmer SCIEX.
- Petrucci, R.H., Harwood, W.S. y Herring, F.G. (2006). *Química General*. 8a ed. España: Prentice Hall.



- Pozebon, D., Dressler, V.L., Becker, J.S., Matusch, A., Zoriy, M. y Becker, J.S. (2008).
Biomonitoring of essential and toxic elements in small biological tissues by ICP-MS.
Journal of analytical Atomic Spectrometry, Vol. 23, pp. 1281-1284.
- Proyecto de Norma Mexicana PROY-NMX-AA-131/2-SCFI-2008-Análisis de agua-
Determinación de metales por espectroscopia de emisión atómica de plasma por
acoplamiento inductivo (ICP), en aguas naturales, potables y residuales-método de
prueba (Ambas partes cancelan al PROY-NMX-AA-131-SCFI-2006).
- Riu, J. y Boqué, R. (2003). Calibración lineal. TECNICAS DE LABORATORIO-
BARCELONA, pp. 676-681.
- Rodríguez-Mercado, J.J. y Altamirano-Lozano, M.A. (2006). Vanadio: contaminación,
metabolismo y genotoxicidad. Revista Internacional de Contaminación Ambiental, Vol.
22, No. 4, pp. 173-189.
- Rodríguez, S.M.T. (2001). Evaluación de metodologías analíticas para la determinación de
arsénico en muestras sólidas ambientales. Tesis de maestría, Facultad de Química,
UNAM, México.
- Santamaria, A. B. 2008. Manganese exposure, essentiality & toxicity. Indian J. Med. Res.,
pp. 484-500.
- Share PDF. Laboratory Exercise – VII, Inductively Coupled Plasma-Mass
Spectrometry (ICP-MS), I. Principle of ICP-MS operation, Sample introduction in ICP-
MS, Figure 4. A close-up view of plasma torch and ICP-MS interface. [http://
www.share-df.com/286acc8c304c44b58f3db89ec9482bda/ICP-MS.htm](http://www.share-df.com/286acc8c304c44b58f3db89ec9482bda/ICP-MS.htm) (06/08/2014,
5:00 pm).



- Skoog D.A., West, D.M., Holler, F.J. y Crouch, S.R. (2006). Química analítica. 7ª Edición. México.
- Spencer, J.N., Bodner, G.M. y Rickard, L.H. (2000). Química: Estructura y Dinámica. México: Compañía Editorial Continental.
- Stathopoulou, M.G., Kanoni, S., Papanikolaou, G., Antonopoulou, S., Nomikos, T. y Dedoussis, G. (2012). Mineral Intake. Progress in Molecular Biology and Translational Science, Vol. 108.
- Thomas, R. (2001). A Beginner's Guide to ICP-MS, Spectroscopy Tutorial. SPECTROSCOPY, Part I-VII, Vol. 16, pp. 4-11).
- Thomas, R. (2004). Practical Guide to ICP-MS. USA: Marcel Dekker.
- Vázquez, C., De Cos, A.I. y López-Nomdedeu, C. (2005). Alimentación y nutrición, Manual teórico-práctico. 2ª ed. España: Ediciones Díaz de Santos.
- Vega, G. (2011). Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos. México: Comisión de control analítico y ampliación de cobertura, Secretaría de Salud.
- Wang, Z., Yan, Y., Jiang, Y., Li, W., Hu, X. y Fu, B. (2014). International Journal of Biological Macromolecules, Vol. 64, pp. 25-29.
- Yazbeck, C. (2011). Manganese: Environmental Exposure. Elsevier, B.V. Bichat Claude Bernard University Hospital, APHP. Paris, France.



8. ANEXOS

8.1. Certificado MRC Hígado de bovino 1577c NIST

	<p>National Institute of Standards & Technology</p> <p>Certificate of Analysis</p> <p>Standard Reference Material® 1577c</p> <p>Bovine Liver</p> <p>Standard Reference Material (SRM) 1577c consists of tissue derived from healthy steers. The material was collected and prepared under strict protocols designed to preserve the original composition, and to minimize contamination. SRM 1577c is intended primarily for use in evaluating the accuracy of analytical methods for selected elements in animal tissues and other biological materials. A unit of the SRM consists of one bottle containing 20 g of freeze-dried liver powder.</p> <p>Certified Values: Certified values for the mass fraction content of 20 elements are provided in Table 1. The certified values are based on results from either a primary analytical technique carried out at NIST, or the combined results from two or more chemically independent analytical techniques obtained at NIST and collaborating expert laboratories [1]. A NIST certified value is a value for which NIST has the highest confidence in its accuracy in that all known or suspected sources of bias have been investigated or taken into account [1].</p> <p>Reference Values: Reference values for the mass fraction content of eight additional elements are provided in Table 2. Reference values are non-certified values that are the best estimates of the true values. However, the values do not meet the NIST criteria for certification and are provided with associated uncertainties that may reflect only measurement precision, may not include all sources of uncertainty, or may reflect a lack of sufficient statistical agreement among multiple analytical methods [1].</p> <p>Information Values: Information values for the mass fraction content of two elements are provided in Table 3. An information value is considered to be a value that will be of interest and use to the SRM user, but for which insufficient information is available to assess adequately the uncertainty associated with the value, or is a value derived from a limited number of analyses [1].</p> <p>Expiration of Certification: The certification of SRM 1577c is valid, within the measurement uncertainties specified, until 01 October 2018, provided the SRM is handled in accordance with the instructions given in this certificate (see "Instructions for Use"). The certification is nullified if the SRM is damaged, contaminated, or otherwise modified.</p> <p>Maintenance of SRM Certification: NIST will monitor this SRM over the period of its certification. If substantive technical changes occur that affect the certification before the expiration of this certificate, NIST will notify the purchaser. Return of the attached registration card will facilitate notification.</p> <p>The coordination of the investigations and technical measurements leading to the certification of this material was under the leadership of R. Zeisler of the NIST Analytical Chemistry Division.</p> <p>Consultation on the statistical design of the experimental work and evaluation of the data was provided by S.D. Leigh of the NIST Statistical Engineering Division.</p> <p>Support aspects involved in the preparation of this SRM were coordinated through the NIST Measurement Services Division.</p> <p style="text-align: right;">Stephen A. Wise, Chief Analytical Chemistry Division</p> <p style="text-align: right;">Robert L. Watters, Jr., Chief Measurement Services Division</p> <p>Gaithersburg, MD 20899 Certificate Issue Date: 15 June 2009</p> <p>SRM 1577c</p> <p style="text-align: right;">Page 1 of 5</p>
-----------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------



Collection and preparation of SRM 1577c were performed by M.P. Cronise and C.N. Fales of the NIST Measurement Services Division, and E.A. Mackey, R.O. Spatz, and R. Zeisler of the NIST Analytical Chemistry Division. The bovine liver material was collected at Texas A&M University (College Station, TX) with the assistance of W.D. James of the Center for Chemical Characterization and Analysis, and R.R. Riley of the E.M. (Manny) Rosenthal Meat Science and Technology Center.

The technical measurements were performed by S.J. Christopher, R.R. Greenberg, S.E. Long, E.A. Mackey, K.E. Murphy, B.J. Porter, S.A. Rabb, R.O. Spatz, B.E. Tomlin, L.J. Wood, L.L. Yu, and R. Zeisler of the NIST Analytical Chemistry Division, and the following collaborating laboratories and analysts: China Institute of Atomic Energy, Beijing, China: C. Xiao, B. Ni, W. Tian; Massachusetts Institute of Technology, Nuclear Reactor Laboratory, Cambridge, MA: J. Che, L.-W. Hu; Nuclear Physics Institute ASCR, Řež, Czech Republic: J. Kučera; Texas A&M University, College Station, TX, Department of Chemistry: W.D. James and College of Veterinary Medicine: R.J. Taylor; University of São Paulo, Institute of Chemistry, São Paulo, Brazil: C.S. Nomura, P.V. Oliveira; and USDA Beltsville Agricultural Research Center, Human Nutrition Research Center, Beltsville, MD: J. Hamly, E. Greene.

NOTICE AND WARNING TO USERS¹

Storage: The material should be stored in its original container at room temperature (10 °C to 30 °C). SRM 1577c should not be exposed to intense sources of radiation, including ultraviolet light from lamps or sunlight.

Handling: This material was derived from healthy steers. These animals were inspected by a Veterinary Medical Officer and did not show signs of infectious, contagious, and/or communicable disease. Normal caution and care should be exercised during the material's handling and use. Users should be aware of sources of contamination. To avoid contamination a Class 100 clean-air environment is recommended.

Instructions for Use: Prior to removal of test portions for analysis, the contents of the bottles should be mixed. **The recommended minimum size is 100 mg;** see "Homogeneity Assessment" below. The mass fractions of constituents in SRM 1577c are reported on a dry-mass basis. Desiccator drying over CaSO₄ (e.g., Drierite) to stable mass (approximately 10 days) is recommended.

PREPARATION AND ANALYSIS

Sample Collection and Preparation: The liver tissue was collected and processed under observation of principles for "true and representative" sampling as documented in the protocols for human and marine mammal tissues of the National Biomonitoring Specimen Bank [2]. The liver tissue was harvested from 31 steers that were slaughtered at Texas A&M University College of Veterinary Medicine. This material is intended for "in vitro" diagnostic use only. The supplier of this material has reported that this material was produced under sanitary conditions and was derived from clinically healthy animals. The animals were slaughtered for the purpose of teaching bovine anatomy and how to butcher. The meat from these animals was prepared for retail under the supervision of a State of Texas meat inspector to ascertain the health of the animals. The livers were excised whole, placed on a clean Teflon sheet, and inspected. Each liver was rinsed with HPLC-grade water to remove excess blood, bile, and any other extraneous material. The outer membrane and major blood vessels were removed with titanium blade knives, and the tissue was cut into portions of approximately 10 cm³; 120 kg of fresh tissue was obtained from this process, frozen in clean Teflon bags, and then shipped to NIST. The tissue was thawed and homogenized at NIST with a food processor equipped with titanium blades. The resulting paste was poured into glass trays, frozen, and lyophilized. The dry material was blended again in the food processor before being jet-milled. The resulting fine powder was radiation sterilized and bottled.

Homogeneity Assessment: The homogeneity of SRM 1577c was assessed by analyzing test portions of approximately 100 mg with high-precision instrumental neutron activation analysis (INAA).

Twelve bottles were randomly selected from the lot and two 100 mg test portions were taken for INAA from different locations in each bottle. The results for all elements reported by INAA (see Tables 1 and 2) did not reveal

¹ Certain commercial equipment, instruments, or materials are identified in this report to specify adequately the experimental procedure. Such identification does not imply recommendation or endorsement by the National Institute of Standards and Technology, nor does it imply that the materials or equipment identified are necessarily the best available for the purpose.



any significant components of uncertainty due to heterogeneity; therefore **the recommended minimum sample size is 100 mg**. The values and uncertainties reported in this Certificate are valid for a 100 mg minimum sample size. Analysis of smaller amounts may be subject to additional uncertainties due to heterogeneity.

Analyses with solid-sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry (SS-GFAAS) using test portions in the range of 20 µg to 70 µg showed homogeneity for distribution of Cd, Cu, Pb, and Zn within the uncertainty of the method. For 1 mg test portions, an uncertainty component from heterogeneity of 1 % to 2 % relative was estimated from the experimental data for these elements.

Analytical Approach: All elements for which certified and reference values are provided were determined by using at least one of the following methods carried out at NIST: INAA, radiochemical neutron activation analysis (RNAA), prompt gamma activation analysis (PGAA), pre-concentration and pre-separation neutron activation analysis (PNAA), inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), and ICP optical emission spectrometry (ICP-OES). NIST values for Cd, Pb, and Se were obtained by using isotope dilution (ID) ICP-MS, and for Hg by isotope dilution cold vapor (ID/CV) ICP-MS. The measurements were complemented by results provided by collaborating scientists from research laboratories using ICP-MS, ICP-OES, INAA, RNAA, and SS-GFAAS.

Certified Values and Uncertainties: Certified values were derived from the NIST analytical results and the results provided by collaborating laboratories. The uncertainty listed with each value is an expanded uncertainty, with coverage factor 2 (approximately 95 % confidence). The reporting follows the ISO Guide to the Expression of Uncertainty in Measurements [3,4,5].

For each element, there is a NIST result with an uncertainty that is complete in terms of coverage of recognized sources of uncertainties. Except for the elements measured by a single NIST primary method, these results are combined with results with similarly complete uncertainties from collaborating laboratories, and in certain cases several results without complete uncertainties. The uncertainties of these results were augmented for probable bias on the basis of the differences among the results obtained by different methods [3].

Table 1. Certified Values for Mass Fractions (on a Dry-Mass Basis) of Selected Elements

Element	Unit	Mass Fraction	Element	Unit	Mass Fraction
Ag ^(A,B,b,C)	µg/kg	5.9 ± 1.6	Mn ^(A,a,b,D,d)	mg/kg	10.46 ± 0.47
As ^(C)	µg/kg	19.6 ± 1.4	Mo ^(A,a,b,C,D,d)	mg/kg	3.30 ± 0.13
Ca ^(A,a,D,d)	mg/kg	131 ± 10	Na ^(A,a,d)	%	0.2033 ± 0.0064
Cd ^(C,E)	µg/kg	97.0* ± 1.4	Ni ^(B,b,c)	µg/kg	44.5 ± 9.2
Co ^(A,a,b)	mg/kg	0.300 ± 0.018	Pb ^(E)	µg/kg	62.8 ± 1.0
Cr ^(A)	µg/kg	53 ± 14	S ^(a,D,d,F)	%	0.749 ± 0.034
Cu ^(A,a,C,D,d)	mg/kg	275.2 ± 4.6	Se ^(A,E)	mg/kg	2.031 ± 0.045
Fe ^(A,a,D)	mg/kg	197.94 ± 0.65	Sr ^(B,b,d)	µg/kg	95.3 ± 4.2
K ^(A,a,d,F)	%	1.023 ± 0.064	V ^(c,d,G)	µg/kg	8.17 ± 0.66
Mg ^(A,a,D,d)	mg/kg	620 ± 42	Zn ^(A,a,D,E,h)	mg/kg	181.1 ± 1.0

*Alternate statistical method [6]

Analytical techniques used for assignment of certified values; capital letters indicate that the method was used by NIST.

- ^(A,a) Instrumental neutron activation analysis (INAA)
- ^(B,b) Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)
- ^(C,c) Radiochemical neutron activation analysis (RNAA)
- ^(D,d) Inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES)
- ^(E) Isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry (ID ICP-MS)
- ^(F) Prompt gamma activation analysis (PGAA)
- ^(G) Pre-concentration pre-separation neutron activation analysis (PNAA)
- ^(h) Solid-sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry (SS-GFAAS)
- ^(I) Isotope dilution cold vapor inductively coupled plasma mass spectrometry (ID/CV ICP-MS)



Reference Values and Uncertainties: Reference values are based on results from one method carried out at NIST or at NIST and in several collaborating laboratories. The methods of combining the results of different methods from different laboratories were applied as above. These results do not fulfill the criteria for certification because they lack a full estimate of method bias. The reporting follows the ISO Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement [5].

Table 2. Reference Values for Mass Fractions (on a Dry-Mass Basis) of Selected Elements

Element	Unit	Mass Fraction	Element	Unit	Mass Fraction
Cl ^(A,a)	%	0.287 ± 0.013	N ^(F)	%	10.30 ± 0.34
Cs ^(A,a)	µg/kg	21.7 ± 1.4	P ^(D,d)	%	1.175 ± 0.027
H ^(F)	%	7.35 ± 0.24	Rb ^(A,a)	mg/kg	35.3 ± 1.1
Hg ^(I)	µg/kg	5.36 ± 0.17	Sb ^(a,C)	µg/kg	3.13 ± 0.31

Note: Analytical techniques used for assignment of reference values are provided following Table 1.

Information Values: Information values are given to assist users in the assays of two non-certified elements that may be of interest in method development and other investigations. These information values are based on results that did not allow complete assessment of all sources of uncertainty.

Table 3. Information Values for Mass Fractions (on a Dry-Mass Basis) of Selected Elements

Element	Unit	Mass Fraction
Li ^(d)	µg/kg	12
Si ^(d)	mg/kg	6

Note: Analytical techniques used for assignment of information values are provided following Table 1.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Particle size:

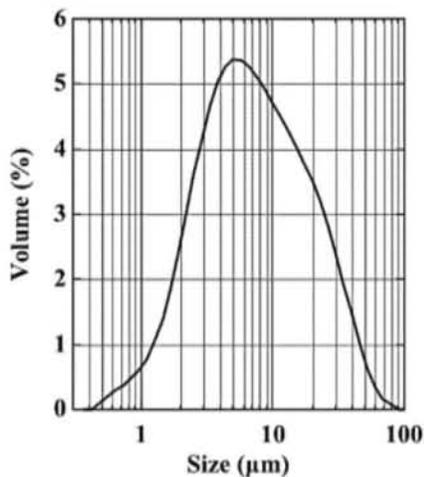


Figure 1. Particle size distributions in SRM 1577c determined in aqueous suspension via laser light scattering instrumentation (Malvern Mastersizer 2000). Calculated 10, 50, and 90 percentile particle sizes (percent volume of particles smaller than the value) for SRM 1577c are: $d_{0.1} = 2.31 \mu\text{m}$, $d_{0.5} = 7.57 \mu\text{m}$, $d_{0.9} = 28.5 \mu\text{m}$. Uncertainties in these values are estimated at $\pm 10\%$ relative (2s).



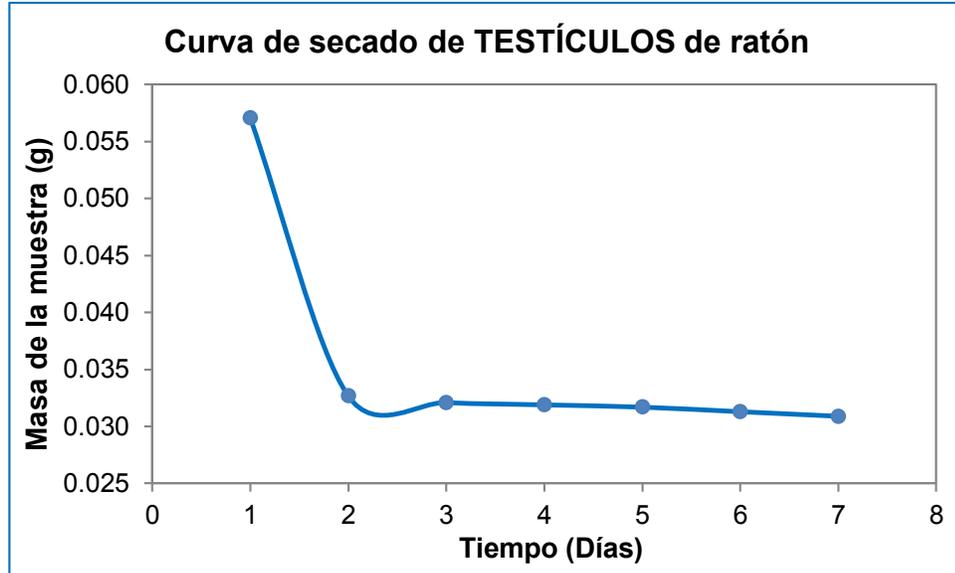
REFERENCES

- [1] May, W.E., Gills, T.E., Parris, R., Beck, II, C.M., Fassett, J.D., Gettings, R.J., Greenberg, R.R., Guenther, F.R., Kramer, G., MacDonald, B.S., and Wise, S.A., *Definitions of Terms and Modes Used at NIST for Value-Assignment of Reference Materials for Chemical Measurements*, NIST Special Publication 260-136, (1999); available at <http://ts.nist.gov/MeasurementServices/ReferenceMaterials/upload/SP260-136.PDF>.
- [2] Zeisler, R., *The Sampling and Analysis of Human Livers*, J. Res. Nat. Bur. Stand., 91 (1986) 75-85.
- [3] Levenson, M.S., Banks, D.L., Eberhardt, K.R., Gill, L.M., Guthrie, W.F., Liu, H.K., Vangel, M.G., Yen, J.H., and Zhang N.F., *An Approach to Combining Results from Multiple Methods Motivated by the ISO GUM*, J. Res. Nat. Inst. Stand. Technol. 105, (2000), 571-579.
- [4] Rukhin, A.L., Vangel, M.G., *Estimation of a Common Mean and Weighted Means Statistics*, J. Am. Stat. Assoc. 93, (1998), 301-308.
- [5] *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*, ISBN 92-67-10188-9, 1st Ed. ISO, Geneva, Switzerland, (1993); see also Taylor, B.N. and Kuyatt, C.E., *Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results*, NIST Technical Note 1297, U.S. Government Printing Office, Washington DC, (1994); available at <http://physics.nist.gov/Pubs/>.
- [6] Schiller, S. and Eberhardt, K., *Combining Data from Independent Chemical Analysis Methods*, *Spectrochim. Acta*, 46B, (1991), 1607-1613.

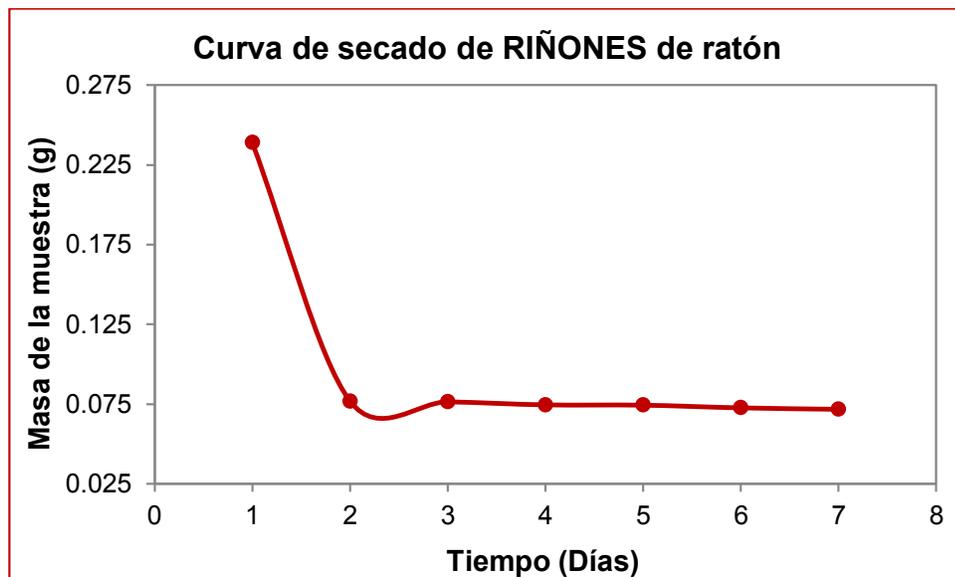
Users of this SRM should ensure that the certificate in their possession is current. This can be accomplished by contacting the SRM Program at: telephone (301) 975-2200; fax (301) 926-4751; e-mail srminfo@nist.gov; or via the Internet at <http://www.nist.gov/srm>.



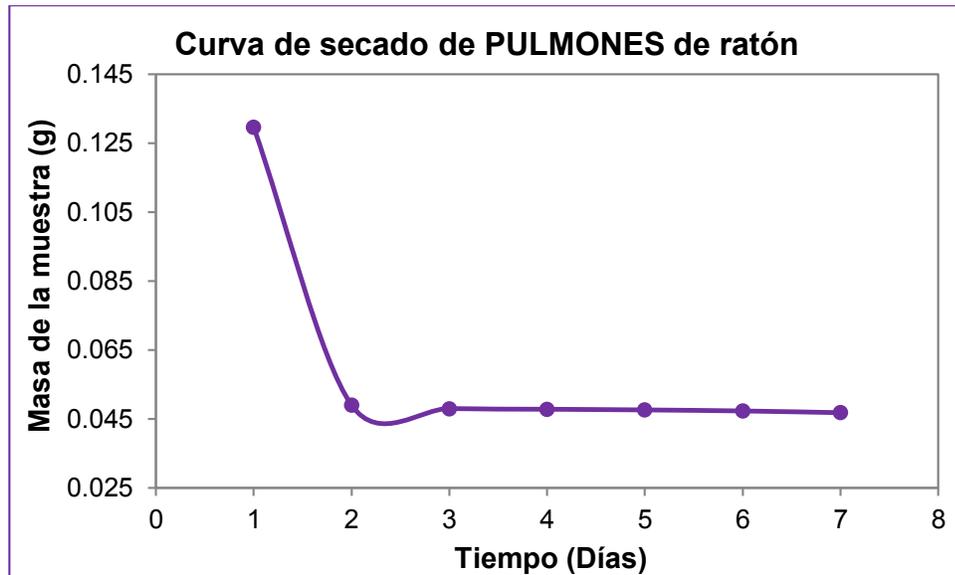
8.2. Curvas de secado de las muestras



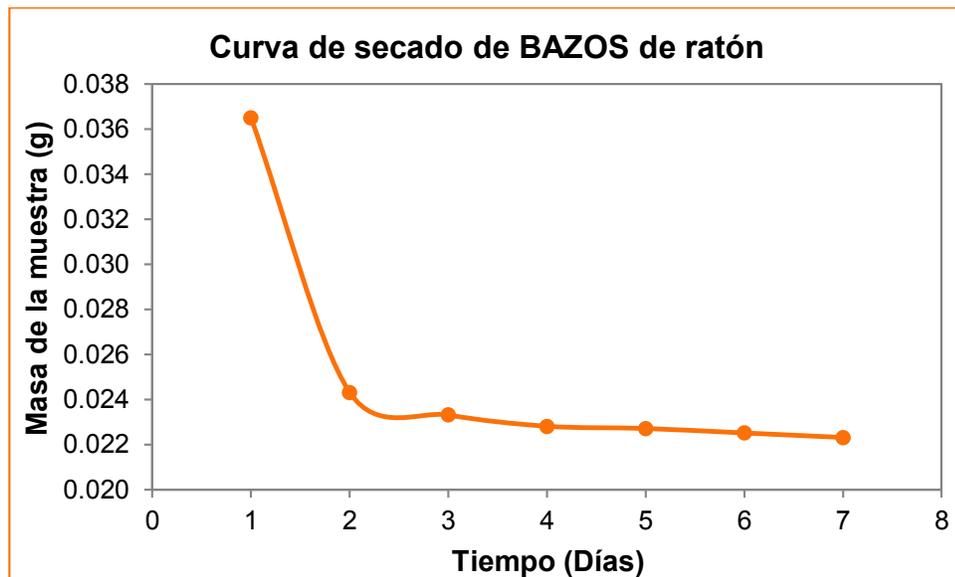
Gráfica 32. Curva de secado de testículo de ratón en función del tiempo.



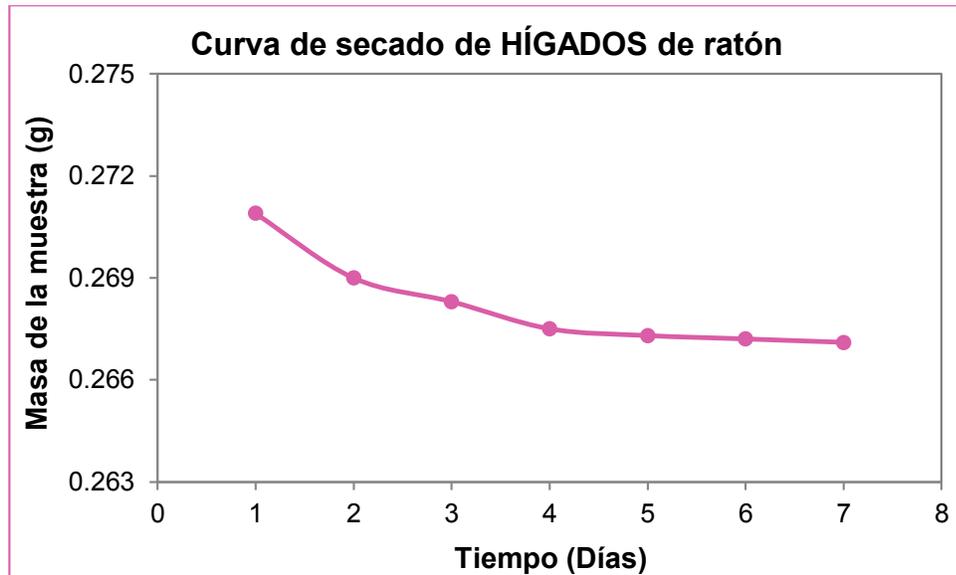
Gráfica 33. Curva de secado de riñón de ratón en función del tiempo.



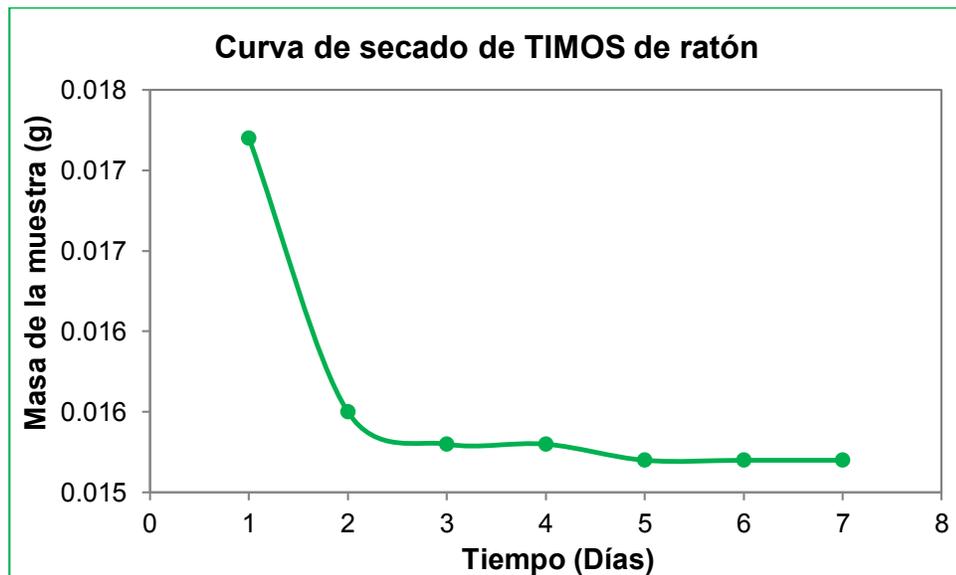
Gráfica 34. Curva de secado de pulmón de ratón en función del tiempo.



Gráfica 35. Curva de secado de bazo de ratón en función del tiempo.



Gráfica 36. Curva de secado de hígado de ratón en función del tiempo.



Gráfica 37. Curva de secado de testículos de ratón en función del tiempo.



8.3. Programas de digestión para los hornos de microondas

1) MILESTONE

Etapa	Tiempo (min)	Potencia (W)
1	00:01:00	250
2	00:02:00	0
3	00:05:00	300
4	00:05:00	600
Rotor-control: ON Twist: OFF Ventilador: 20 minutos.		

Tabla 48. Programa de digestión utilizado para el horno MILESTONE.

2) CEM

Etapa	%Potencia	Presión (PSI)	Tiempo (min)	Rampa (min)	Ventilador (rpm)
1	60	50	10	5	100
2	60	100	10	5	100
3	60	150	10	5	100

Tabla 49. Programa de digestión utilizado para el horno CEM.



8.4. Procedimiento para el uso del equipo de ICP-MS

a. Encendido

- i. Encender la computadora anexa al equipo de ICP-QMS.
- ii. Verificar que el tanque de argón esté abierto.
- iii. Encender el mini Split 30 minutos antes de encender el equipo de ICP-QMS.
- iv. Para encender el equipo de ICP-QMS se sigue el siguiente orden:
 - (1) General
 - (2) Argón
 - (3) Regulador
 - (4) Sistema
 - (5) Electrónicos
 - (6) Vacío
 - (7) generador de RF
 - (8) extractor
 - (9) Recirculador de agua

b. Estabilización

- i. Si el equipo de ICP-QMS se enciende correctamente en la pantalla de la computadora se observará el diagrama del equipo en color verde.
- ii. Dejar que el equipo de ICP-QMS se estabilice por 15 min.



c. Programación

- i. Mientras se estabiliza el equipo de ICP-QMS introducir el programa de la curva de calibración.
- ii. Introducir también los analitos que se quieren analizar y los estándares internos, especificando para ambos los isótopos que se desean.
- iii. Introducir las ecuaciones de corrección de las interferencias isobáricas para cada uno de los isótopos del analito y del estándar interno.

d. Secuencia de introducción de muestras

La introducción al equipo debe de ser por un capilar el cual debe encontrarse limpio, se ingresan al equipo las disoluciones en el siguiente orden:

- (1) Solución Daily
- (2) Estándares de la curva de calibración
- (3) Blancos MRC
- (4) MRC
- (5) Blancos muestras
- (6) Muestras (siempre comenzando por las más diluidas y finalizando con las más concentradas)

e. Apagado del equipo

- i. Enjuagar el sistema de introducción de muestra.
- ii. Apagar en el orden contrario de encendido.



8.5. Cálculo de la concentración de analitos en MRC y muestras

El equipo entrega un informe por cada solución que se introduce, donde se reportan las Intensidades Promedio Medidas (M.I.M., por las siglas en inglés de Measurement Intensity Mean) de cada isótopo, como puede observarse a continuación:

Sample Information					
Report Title: QUANTITATIVE ANALYSIS REPORT					
Sample Date/Time: Wednesday, March 20, 2013 16:47:42					
Sample ID: 11-3-1					
Method File: C:\Elandata\Method\HGGRLZ\HGGRLZtejidos171020123reprocmthmoenosisotopos.mth					
Dataset File: C:\Elandata\Dataset\HGGRLZ20120330prueba\11-3-1.805					
Measurement Unit: cps					
Number of Replicates: 3					
Summary					
Meas. Intens.	Mean	MassAnalyte	Conc. Mean	Net Intens. Mean	Meas. Intens. RSD
34501.347		45Sc	20.157446	34501.347	0.690
38288.127		89Y	21.338236	38288.127	0.294
7742.296		55Mn	6.700443	7742.296	0.907
5160.798		51V	4.734423	5160.798	0.143
84800.747		63Cu	156.063814	84800.747	1.625
5386.682		104Ru	20.708039	5386.682	0.684
5529.348		72Ge	20.961467	5529.348	0.936
57418.341		64Zn	261.203457	57418.341	1.385

Figura 20 . Reporte entregado por el equipo de ICP-MS para cada solución introducida.

Se presenta el cálculo de la concentración de Cu en la solución “11-3-1” de la figura anterior, como ejemplo de cómo se llevó a cabo la determinación de la concentración de los analitos en las muestras de tejidos de ratón estudiados.

**Ejemplo:**

Calcular la concentración del analito Cu, con ayuda de los valores de las intensidades promedio medidas, para los isótopos analito ^{63}Cu y E.I. ^{104}Ru .

Datos:

M.I.M. Analito ^{63}Cu = 84800.747 cps

M.I.M. E.I. ^{104}Ru = 5386.682 cps

Curva de calibración (^{63}Cu - ^{104}Ru): $y = 0.1059x - 0.1898$

Factor de dilución (FD)= 2.00

Volumen Aforo Muestra Digerida= 10 mL= 0.01 L

Masa muestra sólida: 0.8034 g

Procedimiento:

1) Se hace el cálculo del cociente de las intensidades promedio (analito / E.I.):

$$\frac{I_{\text{Analito}}}{I_{\text{E.I.}}} = \frac{84800.747 \text{ cps}}{5386.682 \text{ cps}} = 15.743 \dots \dots [13]$$

2) El valor del cociente obtenido, se compara con su respectiva curva de calibración (ecuación lineal ^{63}Cu con ^{104}Ru):

$$y = 0.1059x - 0.1898 \dots \dots [14]$$



Donde:

$$y = \frac{I_{Analito}}{I_{E.I.}}$$

$$x = [Cu]$$

Sustituyendo:

$$\frac{I_{Analito}}{I_{E.I.}} = 0.1059[Cu] - 0.1898 \dots \dots [15]$$

3) El valor de los cocientes obtenido en el inciso 1, se sustituye en la ecuación anterior y se despeja la concentración de Cu:

$$15.743 = 0.1059[Cu]_{(11-5-1)} - 0.1898$$

Despejando $[Cu]_{(11-5-1)}$:

$$[Cu]_{(11-5-1)} = \frac{15.743 + 0.1898}{0.1059 L/\mu g} = 150.451 \mu g/L \dots \dots [16]$$

Este resultado es el valor de la concentración de Cu en la disolución *IN SITU*, es decir, la que se introdujo al equipo (11-5-1).



Puesto que la pendiente de la curva de calibración tiene unidades de $L\mu g^{-1}$, el resultado obtenido de la ecuación anterior tiene unidades de $\mu g/L^{-1}$.

- 4) Este valor debe ser corregido por el promedio de la concentración de Cu en los blancos reactivos, pertenecientes al mismo lote de digestión de la muestra:

$$[Cu]_{Blancos\ Reactivos} = 7.761 \mu g/L$$

$$[Cu]_{Corregida} = [Cu]_{(11-5-1)} - [Cu]_{Blancos\ Reactivos} \dots \dots [17]$$

$$[Cu]_{Corregida} = 150.451 \mu g/L - 7.761 \mu g/L = 142.690 \mu g/L$$

- 5) Este valor corregido, posteriormente debe ser multiplicado por su respectivo factor de dilución, para así obtener el valor de la concentración del analito en la muestra "digerida":

$$[Cu]_{Muestra\ Digerida} = FD * [Cu]_{Corregida} \dots \dots [18]$$

Donde:

$$FD = 2.00$$

$$[Cu]_{Muestra\ Digerida} = 2.00 * 142.690 \mu g/L = 285.380 \mu g/L$$



6) Ahora se procede a calcular la concentración de analito en la muestra sólida, conociendo el valor de la masa de ésta:

$$[Cu]_{Muestra\ sólida} = [Cu]_{Muestra\ Digerida} \left(\frac{Volúmen_{Aforo} (L)}{Masa_{Muestra} (g)} \right) \dots \dots [19]$$

Donde:

$$Masa_{Muestra} = 0.8034g$$

$$Volúmen_{Aforo} = 10mL = 0.01 L$$

$$[Cu]_{Muestra\ sólida} = (285.380 \mu g/L) \left(\frac{0.01 L}{0.8034g} \right) = 3.552 \mu g/g$$

Es necesario hacer la siguiente aclaración:

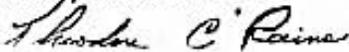
$$[Analito]_{Muestra\ sólida} = [Analito] = C_{Experimental}$$

Lo anterior, debido a que en los apartados del punto 6 de este trabajo, así se les llamó a todos los valores obtenidos tanto para el MRC como para las muestras; que fueron calculados mediante el mismo procedimiento.

De la misma manera se realizan los cálculos, para conocer las concentraciones de cada uno de los analitos de interés, tanto en el MRC como en las muestras de tejidos de ratón.



8.6. Certificado MRC Hígado de bovino High Purity Standards lote #529004

			P.O. Box 41727 Charleston, SC 29423 TEL: (843) 767-7900 FAX: (843) 767-7906
			CAT.NO.CRM-BL
<h1>Certificate of Analysis</h1> <h2>HPS Certified Reference Material</h2> <h3>Bovine Liver Solution</h3> <p>Lot # <u>529004</u></p>			
<u>Source</u>	<u>Source Purity</u>	<u>Matrix</u>	<u>Standard Concentration</u>
High Purity Metals, Salts, or Oxides	99.99+%	HNO ₃ , 4%	µg/mL ± 0.5% See Elements and Concentrations on Back
<p>This spectrometric standard solution has been prepared from high-purity reference materials. Subboiled high-purity acid has been used to place the materials in solution and to stabilize the standard. The matrix is as noted above in 18 megaohm deionized water. The reference materials have been assayed by optical emission spectrometry and atomic absorption spectrometry.</p>			
<p>The standard has been prepared gravimetrically by weighing the reference material to 5 significant figures. Volumetric glassware has been calibrated gravimetrically to 5 significant figures.</p>			
<p>The Standard Concentration has been verified by ICP-OES against an independent source which is directly traceable to National Institute of Standards and Technology, Standard Reference Material No. 3100 Series prior to shipping.</p>			
<p>This standard is valid for six months from the shipping date provided the solution is kept tightly capped and stored under normal laboratory conditions.</p>			
Exp Date APR 2006 MSDS ATTACHED		 Theodore C. Rains, Ph.D. President	



CERTIFIED REFERENCE MATERIAL
Bovine Liver Solution
Element List
($\mu\text{g/mL}$)

Aluminum	0.2
Arsenic	0.0005
Barium	0.01
Bromide	0.09
Cadmium	0.003
Calcium	1.2
Chloride	25
Chromium	0.001
Cobalt	0.002
Copper	2
Iron	3
Lead	0.003
Magnesium	6
Manganese	0.1
Nickel	0.002
Phosphorus	110
Potassium	100
Rubidium	0.2
Selenium	0.01
Silicon	0.2
Sodium	25
Sulfur	80
Vanadium	0.0005
Zinc	1.5



HIGH-PURITY STANDARDS
 P.O. Box 41727
 Charleston, SC 29423

Phone: (843) 767-7900
 Fax: (843) 767-7906

MATERIAL SAFETY DATA SHEET

CRM Bovine Liver Solution Cat. No. CRM BL

Issue Date: 10-20-05

SECTION I - Product Identification/Hazardous Ingredients

Formula: N/A Concentration: µg/mL Molecular Weight: N/A

TSCA: YES CAS NO: 7697-37-2

Component: Trace Metals, Salts, or Oxides in 4% HNO₃ + Balance H₂O TLV/TWA: 8 h Not Estab.; 5 mg/m³

STEL: N/A PEL: N/A Toxicity: N/A

SECTION II - Physical/Chemical Characteristics

Boiling Point: 100°C Vapor Pressure (mm): N/A Vapor Density (air+1): N/A

Freezing Point: N/A Specific Gravity (H₂O = 1): N/A Solubility in H₂O: Complete

Appearance/Odor: Clear, odorless solution

SECTION III - Fire and Explosion Hazard Data

Flash Point: N/A Auto Ignition Temperature: N/A Lower Explosion Level: N/A

NFPA - Rating: N/A Extinguishing Media: Use appropriate

Special Fire-Fighting Procedures: Firefighters should wear proper protective equipment and self-contained breathing apparatus with full face piece operated in positive pressure mode.

Unusual Fires Explosion Hazards: N/A

Toxic Gases Produced: NO₂

SECTION IV - Reacting Data

Unstable : ()

Stable: (X)

Conditions to Avoid: Metals, hydroxides, carbonates, cyanidesIncompatibles: Strong reducing agentsHazardous Decomposition: NO_x**SECTION V - Health Hazard Data**Routes of Entry: Inhalation, eye contact, skin contactCarcinogenicity: NTP: Yes IARC: Yes OSHA reg.: YesEmergency First Aid Procedures: CALL A PHYSICIAN; If swallowed, do not induce vomiting, if conscious give water, milk. In case of contact, flush eyes or skin with plenty of water.**SECTION VI - Precautions for Safe Handling and Use**Special Precautions: Keep container tightly closedIn Case of Spill or Discharge: Remove source of ignition if hydrogen is a hazard. Provide optimum ventilation. Flush to holding area for neutralization.Disposal Procedures: Follow Federal, State and Local regulations for acid waste.EPA Hazardous Waste #: N/A**SECTION VII - Protective Equipment**Respiratory Protection: NIOSH approved respirator

Ventilation: Local Exhaust (X) Mechanical ()

Protective Gloves: Proper glovesEye Protection: Safety glasses with side shieldsOther: Lab coat/apron; vent hood**NOTICE**

The data and information as stated was furnished by the manufacturer of the product. HPS products are intended for laboratory use only. All products should be handled and used by trained professional personnel only. The responsibility for the safe handling and use of these products rest solely with the buyer and/or user. Theodore C. Rains, Ph.D. 10-20-05.