



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

EVALUACIÓN DE As, Cd, Hg y Pb EN PLACENTA Y CORDÓN
UMBILICAL POR MEDIO DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON
PLASMA POR ACOPLAMIENTO INDUCTIVO (ICP-MS)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO

PRESENTA

JAVIER EDUARDO CANALES ENCARNACIÓN



AÑO 2018

CD.MX.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Ciro Eliseo Márquez Herrera**
VOCAL: **Profesora: Silvia Citlalli Gama González**
SECRETARIO: **Profesora: Blanca Paz Díaz**
1er. SUPLENTE: **Profesora: Elizabeth Reyes López**
2° SUPLENTE: **Profesora: Ilse Irene Hernández Mendoza**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 208-209, EDIFICIO D, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM. LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN Y SERVICIOS EN TOXICOLOGÍA, CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL IPN.

ASESOR DEL TEMA: **DR. CIRO ELISEO MÁRQUEZ HERRERA**

SUPERVISOR TÉCNICO: **M. EN C. ANA LARISSA BARBOSA SÁNCHEZ**

SUSTENTANTE: **JAVIER EDUARDO CANALES ENCARNACIÓN**

RESUMEN

En la actualidad la exposición de la población a elementos potencialmente tóxicos como el As, Cd, Hg y Pb ha tomado mucha relevancia debido a la falta de control de las emisiones de estos elementos por parte de las actividades del ser humano.

Diferentes estudios mencionan que elementos como el As, Cd, Hg y Pb tienen un impacto toxicológico importante en el ser humano como daños a nivel genético, citológico e histológico.

Durante la etapa de gestación la exposición a estos elementos es inevitable, y en los últimos 20 años se ha estudiado la acumulación y excreción de los elementos potencialmente tóxicos en el organismo en poblaciones altamente contaminadas de Europa, Asia y Norteamérica principalmente, de esta forma se ha podido determinar cómo los elementos afectan al organismo durante la etapa gestacional y cómo pueden afectar la salud del feto a largo plazo.

El presente proyecto se propuso para recabar datos de los niveles de exposición a elementos potencialmente tóxicos durante la etapa gestacional en México.

Las muestras analizadas se obtuvieron de madres atendidas en el Hospital del IMSS de Cuernavaca y se trasladaron a la CDMX al Hospital Infantil de México "Federico Gómez" donde se mantuvieron bajo resguardo para posteriormente ser tratadas en la Facultad de Química de la UNAM.

El tratamiento de las muestras consistió en liofilización para deshidratarlas y evitar su descomposición, posteriormente se molieron y digirieron en horno de microondas. Para analizar las muestras digeridas se utilizó la técnica de Espectrometría de Masas con Plasma por Acoplamiento Inductivo (ICP-MS).

Con los resultados obtenidos se validó el método de análisis evaluando los parámetros de intervalo de trabajo, límite de detección, límite de cuantificación, sensibilidad, sesgo, precisión, recobro y selectividad. Los parámetros evaluados llevan a la conclusión de que el método es válido para determinar la concentración de los isótopos ^{75}As , ^{111}Cd , y ^{208}Pb mientras que para el isótopo ^{202}Hg el método sirve para caracterizar a la muestra.

Los resultados de las muestras analizadas sugieren que la placenta es una barrera efectiva contra ^{75}As , ^{111}Cd , y ^{208}Pb ya, que se encontraron concentraciones elevadas de los isótopos mencionados y comparando los rangos de concentración obtenidos se observa que éstos son mayores a los rangos reportados en trabajos internacionales. En el caso del ^{202}Hg la caracterización de los tejidos sugiere que no son una barrera eficiente para retener a este isótopo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

.....	1
1. PLACENTA Y CORDÓN UMBILICAL.....	9
1.1. Placenta. Características y funciones	9
1.2. Cordón umbilical. Características y funciones.....	9
2. ELEMENTOS POTENCIALMENTE TÓXICOS.....	9
3. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE As, Cd, Hg y Pb	10
4. TOXICIDAD DE As, Cd, Hg y Pb.....	11
4.1. Arsénico.....	11
4.2. Cadmio.....	12
4.3. Plomo.....	12
4.4. Mercurio	12
5. LIOFILIZACIÓN	14
6. DIGESTIÓN DE MUESTRAS EN HORNO DE MICROONDAS	15
7. ESPECTROMETRIA DE MASAS CON PLASMA POR ACOPLAMIENTO INDUCTIVO (ICP-MS).....	16
7.1. Características	16
7.2. Sistema de introducción de muestra	17
7.3. Generador del plasma.....	19
7.4. Interface de triple cono.....	20
7.5. Cuadrupolo deflector	20
7.6. Celda universal	21
7.7. Espectrómetro de masas	21
7.8. Detector de dinodos discreto.....	22
8. INTERFERENCIAS EN ICP-MS	23
8.1. Traslape isobárico.....	23
8.2. Traslape poliatómico	24
8.3. Óxidos moleculares.....	24
8.4. Iones doblemente cargados	24
8.5. Ruido de fondo.....	24
9. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	25
9.1. Selectividad.....	25
9.2. Límite de Detección y Límite de Cuantificación.....	25
9.3. Intervalo de trabajo.....	26

9.4.	Sensibilidad.....	27
9.5.	Sesgo.....	27
9.6.	Precisión.....	27
9.7.	Recobro.....	27
10.	TRABAJOS RELACIONADOS.....	28
11.	OBJETIVOS.....	31
11.1.	Objetivo general.....	31
11.2.	Objetivos particulares.....	31
12.	HIPÓTESIS.....	31
13.	METODOLOGÍA.....	31
13.1.	RECEPCIÓN DE MUESTRAS.....	33
13.2.	TRATAMIENTO.....	33
13.2.1.	Liofilización.....	33
13.2.1.	Molienda.....	34
13.2.2.	Control de calidad.....	34
13.3.	DIGESTIÓN DE MUESTRAS.....	34
13.3.1.	Pesada de muestras.....	34
13.3.2.	Adición de mezcla de reacción.....	35
13.3.3.	Digestión.....	36
13.3.4.	Preparación de disoluciones digeridas.....	37
13.4.	ANÁLISIS DE MUESTRAS.....	37
13.4.1.	Optimización del equipo.....	37
13.4.2.	Curva de calibración.....	39
13.4.3.	Análisis en ICP-MS.....	40
14.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
14.1.	Curvas de calibración.....	42
14.2.	Límite de Detección y Límite de Cuantificación.....	43
14.3.	Intervalo de trabajo.....	45
14.4.	Sesgo.....	45
14.5.	Recobro.....	46
14.6.	Precisión.....	47
14.7.	Resultados de las muestras.....	47
15.	CONCLUSIONES.....	53

15.1. Sobre la validación del método	53
15.2. Sobre las muestras analizadas	53
16. APORTACIONES	55
17. RECOMENDACIONES	55
18. ANEXO 1. Curvas de calibración y residuales.....	56
19. ANEXO 2. %RSD de las muestras analizadas	60
20. ANEXO 3. Lotes de digestión de las muestras y la intensidad en cps obtenidas.....	61
21. ANEXO 4. Intensidad neta de las muestras analizadas	63
22. ANEXO 5. Concentraciones reportadas en ppb ($\mu\text{g/L}$) y $\mu\text{g/g}$. (<LOD es un resultado obtenido menor al LOD)	64
23. REFERENCIAS	65

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Fuentes de emisión de EPT	10
FIGURA 2. Esquema de liofilizadora	15
FIGURA 3. Esquema del horno de microondas.....	16
FIGURA 4. Esquema de instrumentación del ICP-MS	17
FIGURA 5. Representación de la bomba peristáltica	18
FIGURA 6. Representación del nebulizador.....	18
FIGURA 7. Proceso de transformación de la muestra, desde disolución hasta que llega al plasma	19
FIGURA 8. Diagrama del sistema generador del plasma	19
FIGURA 9. Interface de triple cono	20
FIGURA 10. Cuadripolo deflector de iones.....	21
FIGURA 11. Celda universal	21
FIGURA 12. Espectrómetro de masas	22
FIGURA 13. Esquema de funcionamiento del detector.....	23
FIGURA 14. Muestra en el equipo de liofilización.....	33
FIGURA 15. Mortero de ágata utilizado para moler las muestras.....	34
FIGURA 16. Balanza RADWAG XA60/220/X utilizada.....	35
FIGURA 17. Ejemplo de un vaso de reacción junto con su contenedor de seguridad	35
FIGURA 18. H ₂ O ₂ y HNO ₃ utilizados para la digestión.....	36
FIGURA 19. Horno de microondas utilizado.....	37
FIGURA 20. Equipo de ICP-MS utilizado	41
FIGURA 21. Esquema del orden de análisis de las muestras.....	41
FIGURA 22. Distribución gráfica de los resultados en ⁷⁵ As.....	48
FIGURA 23. Distribución gráfica de los resultados en ¹¹¹ Cd.....	49
FIGURA 24. Distribución gráfica de los resultados en ²⁰² Hg.....	50
FIGURA 25. Distribución gráfica de los resultados en ²⁰⁸ Pb	51
FIGURA 26. Curva de calibración ⁷⁵ As	56
FIGURA 27. Gráfico de residuales de ⁷⁵ As	56
FIGURA 28. Curva de calibración ¹¹¹ Cd	57
FIGURA 29. Gráfico de residuales de ¹¹¹ Cd.....	57
FIGURA 30. Curva de calibración ²⁰² Hg	58
FIGURA 31. Gráfico de residuales de ²⁰² Hg	58
FIGURA 32. Curva de calibración ²⁰⁸ Pb	59
FIGURA 33. Gráfico de residuales de ²⁰⁸ Pb.....	59

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Características fisicoquímicas de Cd y Hg	11
TABLA 2. Características fisicoquímicas de As y Pb	11
TABLA 3. Toxicidad de As, Cd, Hg y Pb.....	13
TABLA 4. Trabajos internacionales con metodologías semejantes a este proyecto.....	29
TABLA 5. Trabajos internacionales con metodologías distintas a este proyecto.....	30
TABLA 6. Programa de digestión utilizado.....	36
TABLA 7. Descripción de disolución para optimización	37
TABLA 8. Criterios para optimización.....	38
TABLA 9. Condiciones de trabajo del equipo ICP-MS	38
TABLA 10. Isótopos analizados.....	38
TABLA 11. Características de los patrones multi elementales.....	39
TABLA 12. Preparación de la curva de calibración.....	40
TABLA 13. Intensidades de los analitos de interés con el blanco de calibración restado.....	42
TABLA 14. Estadísticas de regresión lineal de las curvas de calibración	43
TABLA 15. Pendientes de las curvas de calibración	43
TABLA 16. Intensidades de los analitos en los blancos de digestión.....	43
TABLA 17. LOD y LOQ en cps	44
TABLA 18. LOD y LOQ en ppb	44
TABLA 19. LOD y LOQ en µg/g.....	45
TABLA 20. Comparación de LOD obtenidos contra los reportados por (D'Ilio, 2010).....	45
TABLA 21. C. del analito reportado en el MRC y C. calculada.....	45
TABLA 22. Intensidad de los isótopos en el análisis y C. asociada.....	46
TABLA 23. Sesgo en el análisis del MRC	46
TABLA 24. Recobro obtenido.....	46
TABLA 25. Rangos de concentraciones para ⁷⁵ As	48
TABLA 26. Rangos de concentraciones para ¹¹¹ Cd	49
TABLA 27. Rangos de concentraciones para ²⁰² Hg	50
TABLA 28. Rangos de concentraciones para ²⁰⁸ Pb	51
TABLA 29. Comparación de resultados obtenidos con resultados reportados internacionalmente.....	52
TABLA 30. %RSD de las muestras	60
TABLA 31. Lote 1.....	61
TABLA 32. Lote 2.....	61
TABLA 33. Lote 3.....	61
TABLA 34. Lote 4.....	61
TABLA 35. Lote 5.....	62
TABLA 36. Lote 6.....	62
TABLA 37. Lote 7.....	62
TABLA 38. Intensidad neta.....	63

1. PLACENTA Y CORDÓN UMBILICAL

1.1. Placenta. Características y funciones

La placenta es el órgano encargado de realizar el intercambio principal entre la sangre materna y la del embrión/feto. Al finalizar el embarazo su tamaño es de aproximadamente 20 cm de diámetro por 3 cm de grosor y un peso entre 500 y 600 g.

En la circulación placentaria contribuyen tanto la circulación fetal como la circulación materna. La gran cantidad de vellosidades que están presentes en la placenta proporcionan una gran superficie en la que se intercambian los materiales entre las circulaciones materna y fetal. Estas dos circulaciones se encuentran separadas por una delgada membrana o barrera placentaria.

El transporte a través de la membrana placentaria se realiza por difusión simple (en gases como O₂, CO₂, agua, lípidos, urea), difusión facilitada por proteínas transportadoras, transporte activo por canales iónicos y transporte mediado por proteínas.

Un gran número de sustancias tóxicas pueden ser transportados, por ejemplo, elementos potencialmente tóxicos, plaguicidas, solventes, alcohol, nicotina, anestésicos, entre otros **(Carlson, 2014)**.

1.2. Cordón umbilical. Características y funciones

Es una estructura tubular delgada que mantiene unido el feto con la placenta. Se conforma por dos arterias umbilicales que son las que llevan la sangre del embrión/feto a la placenta, y una vena umbilical que regresa la sangre enriquecida con nutrientes al embrión/feto. Estos tejidos se encuentran recubiertos por una sustancia denominada *Gelatina de Wharton*.

Al final de la gestación el cordón umbilical mide de 30 a 80 cm de largo y de 1 a 2 cm de diámetro **(Carlson et al, 2014)**.

2. ELEMENTOS POTENCIALMENTE TÓXICOS

La toxicidad de los elementos depende en gran medida de la dosis o cantidades de las que se traten. Los *Elementos Potencialmente Tóxicos* (EPT) es un término general definido por muchos autores, que incluye a aquellos elementos que debido a sus características y cantidades pudieran ser tóxicos para la biota.

Las fuentes de los EPT pueden clasificarse en naturales y antropogénicas **(Bautista et al, 1999)**. Cada clasificación se subdivide como se muestra en la **Figura 1**.

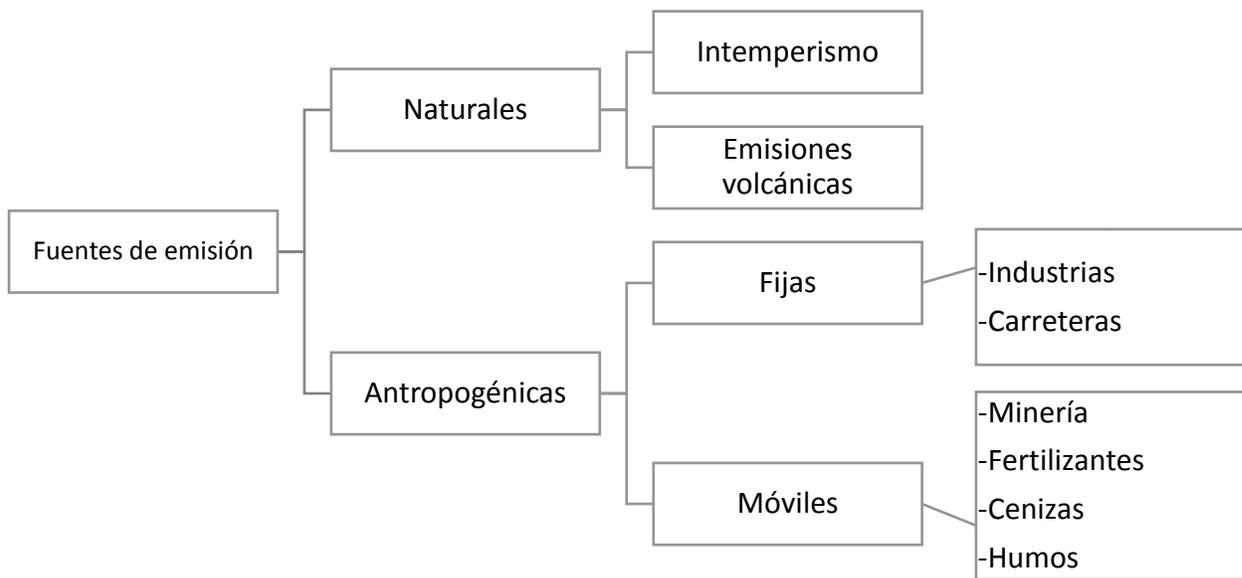


Figura 1. Fuentes de emisión de EPT

Algunos elementos como arsénico (As), cadmio (Cd), mercurio (Hg) y plomo (Pb) son tóxicos para los humanos, ampliamente usados en la industria, relativamente abundantes y causan graves perturbaciones a los ciclos biogeoquímicos y biológicos (**Fergusson et al, 1990**).

3. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE As, Cd, Hg y Pb

El Cd y Hg pertenecen a los elementos de transición principales, los cuáles están estrictamente definidos como los elementos que tienen orbitales *d* parcialmente llenos o también orbitales *f* (**Cotton & Wilkinson, 1999**).

Con la definición mencionada se pueden identificar 56 elementos de transición, los cuáles comparten las siguientes características:

1. Todos son metales.
2. Son prácticamente duros, con altos puntos de fusión y de ebullición, conducen el calor y la electricidad.
3. Forman aleaciones mutuamente y con otros elementos de la Tabla periódica.
4. Muchos son suficientemente electropositivos como para ser disueltos por ácidos inorgánicos.
5. Con pocas excepciones, exhiben valencias distintas y sus iones y compuestos son coloridos en disolución acuosa, dependiendo del estado de oxidación que presenten.
6. Debido a sus capas *d* o *f* parcialmente llenas, pueden formar algunos compuestos paramagnéticos.

En el último grupo de los elementos de transición principales se encuentran el Cd y el Hg. Las características de estos elementos se mencionan en la **Tabla 1 (Merck Index, 2013)**.

Tabla 1. Características fisicoquímicas de Cd y Hg

	Cadmio (Cd)	Mercurio (Hg)
Estado de agregación	Sólido	Líquido
Radio atómico	158 pm	150 pm
Estados de oxidación	0, II	0, I, II
Isótopos y abundancia	¹⁰⁶ Cd: 1.25% ¹⁰⁸ Cd: 0.89% ¹¹⁰ Cd: 12.49% ¹¹¹ Cd: 12.80% ¹¹² Cd: 24.13% ¹¹³ Cd: 12.22% ¹¹⁴ Cd: 28.73% ¹¹⁶ Cd: 7.49%	¹⁹⁶ Hg: 0.15% ¹⁹⁸ Hg: 9.97% ¹⁹⁹ Hg: 16.87% ²⁰⁰ Hg: 23.10% ²⁰¹ Hg: 13.18% ²⁰² Hg: 29.86% ²⁰⁴ Hg: 6.87%

Por otra parte, el As y Pb pertenecen al bloque *p* de la Tabla periódica. Los elementos de este bloque tienen características diferentes entre cada familia de elementos, por lo tanto, sólo se mencionan sus propiedades en la **Tabla 2 (Merck Index, 2013)**.

Tabla 2. Características fisicoquímicas de As y Pb

	Arsénico (As)	Plomo (Pb)
Estado de agregación	Sólido	Sólido
Radio atómico	124.5 pm	175 pm
Estados de oxidación	-III, 0, III, V	0, II, IV
Isótopos y abundancia	⁷⁵ As: 100%	²⁰⁴ Pb: 1.4% ²⁰⁶ Pb: 24.1% ²⁰⁷ Pb: 22.1% ²⁰⁸ Pb: 52.4%

4. TOXICIDAD DE As, Cd, Hg y Pb

4.1. Arsénico.

El arsénico existe en la naturaleza formando muchos compuestos debido a los estados de oxidación que puede tener. Los compuestos de arsénico trivalente inorgánicos que se utilizan con mayor frecuencia son: As₂O₃, NaAsO₂ y AsCl₃, los compuestos de arsénico pentavalente son: As₂O₅, H₃AsO₄ y los arseniatos. Los compuestos orgánicos de arsénico pueden ser trivalentes o pentavalentes, o incluso ocurrir en formas metiladas debido a la biometilación de microorganismos existentes en agua y suelo (**Klaassen et al, 2001**). Se ha demostrado que el arsénico se acumula en tejidos fetales, lo cual puede causar problemas

neurológicos, psicomotrices y en el desarrollo óseo a largo plazo (**Al-Saleh et al, 2011**).

4.2. Cadmio

Es un subproducto de la minería y la fundición de zinc y plomo. Se utiliza principalmente en electro recubrimiento o galvanización debido a sus propiedades no corrosivas. También se usa como pigmento para pinturas y plásticos y para electrodos en baterías de níquel-cadmio (**Klaassen et al, 2001**). En estudios previos se ha encontrado que la placenta es una barrera eficiente contra el cadmio (**Kim et al, 2015**), ya que cuando el cuerpo tiene altas concentraciones de este elemento se sintetiza una enzima llamada *metalotioneína*, la cual ayuda a expulsar al elemento del cuerpo (**Sakamoto et al, 2013**).

4.3. Plomo

Es el metal tóxico con elevada presencia en la naturaleza, dado que afecta a casi todos los seres vivos a exposiciones altas. El principal problema es determinar la dosis tóxica para cada ser vivo ya que depende de la edad y características del huésped. Las poblaciones más susceptibles son los niños, en particular lactantes mayores, lactantes durante el periodo neonatal y el feto (**Klaassen et al, 2001**). El plomo en grandes concentraciones causa una intoxicación directa al feto (**Baranowska et al, 1992**). En México la concentración máxima permitida de plomo en sangre de mujeres embarazadas y en lactancia de acuerdo a la NOM-199-SSA1-2000 es de 5 µg/dL equivalente a 0.05 µg/g.

4.4. Mercurio

Con base en la especiación química existen tres formas del mercurio: compuestos elementales, inorgánicos y orgánicos, cada uno de los cuales tiene efectos sobre la salud.

El vapor de mercurio, las sales mercúricas, el mercurio mercurioso y el metilmercurio provocan daños a la salud tales que pueden provocar la muerte a corto o largo plazo, es por eso que se ha declarado al mercurio y sus compuestos como un contaminante *transfronterizo*, ya que sus emisiones son esparcidas a lo largo del planeta (**Klaassen et al, 2001**).

El mercurio ha demostrado ser un elemento que atraviesa la barrera placentaria para acumularse en el feto (**Kim et al, 2015**). Se está relacionando la concentración de mercurio en tejidos placentarios con enfermedades del tubo neural (**Jin et al, 2013**).

En la **Tabla 3** se resumen las características toxicológicas de los elementos descritos

Tabla 3. Toxicidad de As, Cd, Hg y Pb. Se describen fuentes de emisión, vías de absorción, excreción, dosis letal y posibles daños a la salud¹

Elemento	Fuentes	Vía de absorción	Excreción ¹	Dosis letal	Biomarcadores	Daños
As	<ul style="list-style-type: none"> • Fundiciones de cobre, zinc y plomo • Alimentos • Plaguicidas y herbicidas 	Respiratoria	Sudor y descamación de la piel, uñas y cabello	70 a 180 mg	Sangre, cabello y uñas	Hígado y corazón principalmente. Potencialmente carcinogénico.
Cd	<ul style="list-style-type: none"> • Industria minera • Fertilizantes • Humo de cigarrillos 	Gastrointestinal y respiratoria	Orina	N/E ²	Sangre y orina	Sistema respiratorio, renal y esquelético.
Hg	<ul style="list-style-type: none"> • Corteza terrestre • Emisiones industriales 	Respiratoria	Orina y heces	N/E	Tejido renal y cerebral	Neurológico
Pb	<ul style="list-style-type: none"> • Emisiones industriales • Alfarería • Pinturas 	Respiratoria	Acumulativo	80 a 120 µg/dL	Sangre, tejidos blandos	Renal, neurológico, hematológico, carcinogénico

¹ Environmental Protection Agency. *Integrate Risk Information System (IRIS)*. United States of America. Recuperado de: https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/subst/0141_summary.pdf

Environmental Protection Agency. *Integrate Risk Information System (IRIS)*. United States of America. Recuperado de: https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/subst/0370_summary.pdf

² Valor no especificado

5. LIOFILIZACIÓN

La liofilización es un proceso físico de deshidratación de cualquier producto o tejido donde se sublima el agua o cualquier disolvente mediante la reducción de presión del sistema. Este proceso involucra las siguientes etapas (**Ramírez, 2006**).

- Congelación del producto a tratar a bajas temperaturas.
- Secado por sublimación del hielo (o solvente) del producto congelado a muy baja presión.
- Almacenamiento del producto seco en condiciones controladas.

Este proceso es adecuado para preservar células, enzimas, vacunas, virus, levaduras, sueros, derivados sanguíneos, alimentos, etc., y los productos obtenidos no se ven alterados en sus propiedades (**Ramírez, 2006**).

La principal ventaja de esta técnica es la calidad superior del producto final, sin embargo, visto desde el costo del proceso, la liofilización se reserva a productos de alto valor agregado semejantes a productos farmacéuticos y alimentos escasos, además también se inhibe el crecimiento de microorganismos lo que evita la descomposición del producto final. Otra ventaja de este proceso es que los productos pueden volver a rehidratarse.

Los equipos de liofilización contienen las siguientes partes (ver **Figura 3**) y se describen a continuación.

- *Cámara seca o de liofilización*. Es donde se coloca la muestra a liofilizar. El cerrado es hermético y se trabaja en vacío.
- *Condensador con circuito de refrigeración*. Comunica con la cámara seca y es donde se condensa el vapor que se produce durante la sublimación.
- *Sistema de vacío*. El vacío se produce con una bomba de aceite que trabaja sobre 10^{-2} mbar. La bomba está conectada a una trampa que impide el paso de los vapores extraídos de la muestra al aceite de la bomba. Este sistema de vacío elimina primero el aire de la cámara seca y luego ayuda a la sublimación (**Jennings, 2002**).

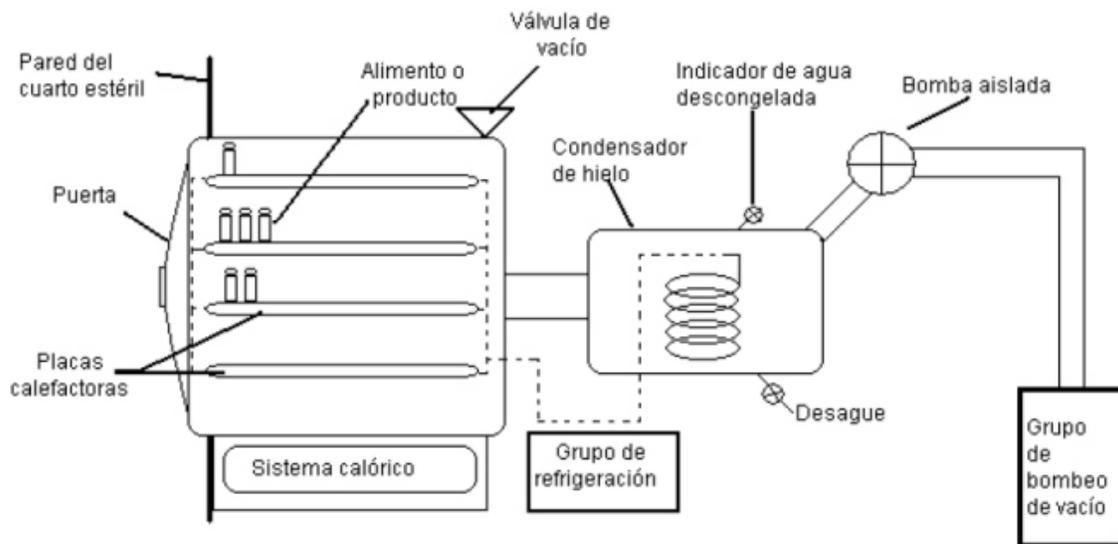


Figura 2. Esquema de liofilizadora (Ramírez, 2006)

6. DIGESTIÓN DE MUESTRAS EN HORNO DE MICROONDAS

Una forma de tratamiento de muestras para análisis por vía húmeda es la digestión en horno de microondas. Las microondas son ondas electromagnéticas definidas en un rango de frecuencia entre 300 a 300,000 MHz, pero para el caso de un horno de digestión la frecuencia utilizada es de 2,450 MHz.

La técnica se basa en la energía que proporcionan las microondas en forma de radiación ionizante, lo que causa movimiento molecular por migración de iones y rotación de dipolos sin causar cambios estructurales. Esta energía es absorbida por los ácidos utilizados para la digestión con el fin de producir calor en la solución, además, es absorbida por la muestra (**Baeza, 2005**).

El método ofrece varias ventajas como:

- Reducción de tiempo para llevar a cabo la reacción de digestión.
- Eliminación de contaminantes.
- Menor uso de reactivos.
- Aumento de la productividad.

El sistema del horno de microondas está conformado como se muestra en la **Figura 4** y se describen los componentes a continuación

- *Magnetron*. Es el encargado de producir la energía de microondas. Es un diodo cilíndrico constituido con un ánodo y un cátodo.
- *Guía de onda*. Es una vía donde se dirigen las microondas generadas por el magnetron.
- *Cavidad*. Se localiza en los extremos del horno. Las microondas son propagadas alrededor de ésta.

- *Agitador*. Se usa para mezclar y distribuir la energía que entra desde la guía de onda.
- *Extractor*. Sirve para mantener la temperatura óptima dentro del equipo de microondas.
- *Rotor*. Es un dispositivo que sirve para colocar el carrusel donde se encuentran los vasos de digestión. Los vasos no absorben microondas ya que son de teflón.
- *Atenuador*. Es una protección para evitar que las microondas que no sean absorbidas dañen al magnetrón.
- *Control del ciclo de trabajo*. Permite controlar las condiciones de trabajo. El equipo funciona en modos de rampa.

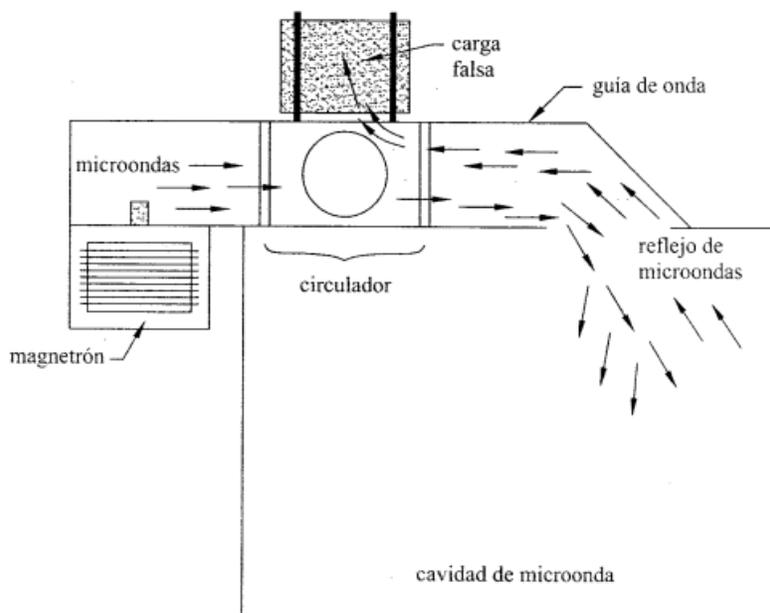


Figura 3. Esquema del horno de microondas (Baeza, 2005)

7. ESPECTROMETRIA DE MASAS CON PLASMA POR ACOPLAMIENTO INDUCTIVO (ICP-MS)

7.1. Características

La Espectrometría de Masas se fundamenta en la separación de moléculas o átomos mediante su relación masa-carga (m/z). Para hacer el análisis la muestra debe pasar por las siguientes etapas:

1. Ionización de la muestra
2. Aceleración de los iones por un campo magnético
3. Dispersión de los iones según su relación m/z
4. Detección de los iones

En la Espectrometría de Masas con Plasma por Acoplamiento Inductivo (ICP-MS, por sus siglas en inglés) la fuente de ionización de la muestra es el propio plasma. Esta es una técnica de análisis que puede identificar y medir cuantitativamente hasta 76 elementos de la Tabla periódica incluyendo sus isótopos (Taylor, 2001).

Una característica importante de esta técnica de análisis es que los límites de detección pueden abarcar un rango de 1 hasta 10 ppt (ng/L).

El sistema instrumental del ICP-MS está conformado por las partes mostradas en la **Figura 5**.

- Sistema de introducción de muestra
- Generador del plasma
- Interface de triple cono
- Cuadrupolo deflector
- Celda universal
- Espectrómetro de masas
- Detector de dinodos discreto

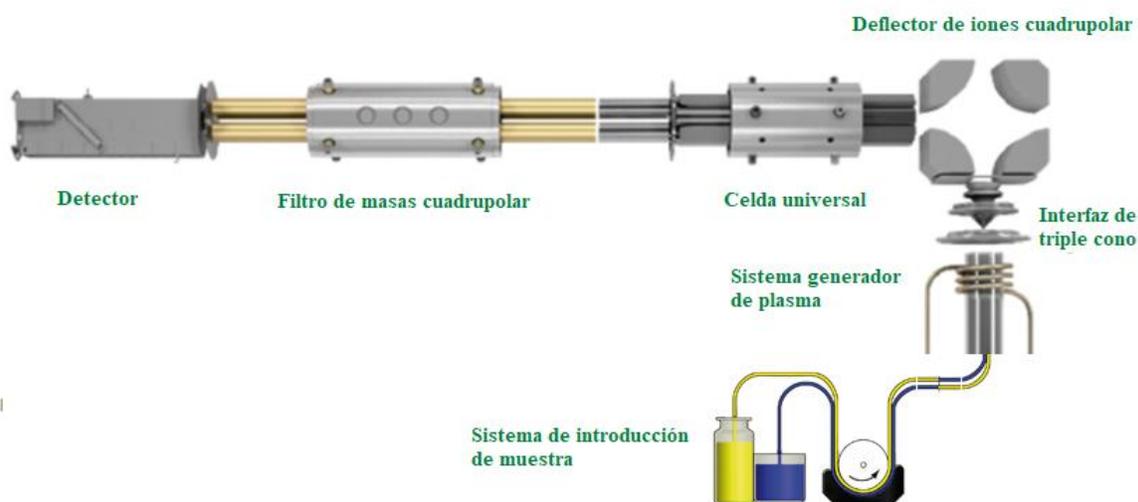


Figura 4. Esquema de instrumentación del ICP-MS (PerkinElmer, NexION Brochure 2010)

7.2. Sistema de introducción de muestra

La muestra es introducida por una bomba peristáltica (ver **Figura 5**) la cual tiene un conjunto de rodillos que presionan la manguera de introducción de muestra para que ésta fluya al nebulizador a flujo constante, generalmente a 1 mL/min. La función principal del sistema de introducción es generar un aerosol fino usando un nebulizador y una cámara de rocío (Thomas, 2001).

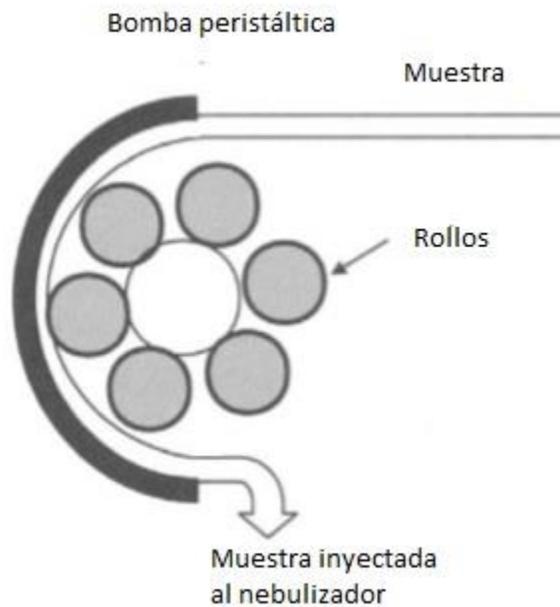


Figura 5. Representación de la bomba peristáltica (Taylor, 2001)

Al entrar la muestra al nebulizador el líquido se vuelve un aerosol, formándose gotas muy pequeñas suspendidas en el gas acarreador, el cual es argón de ultra-alta pureza (ver **Figura 6**).

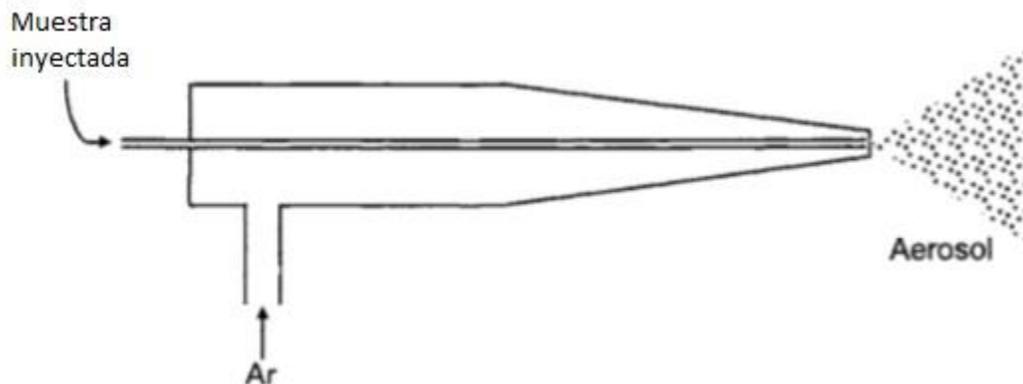


Figura 6. Representación del nebulizador (Taylor, 2001)

Este aerosol entra a una cámara de rocío, donde se seleccionan las gotas más pequeñas las cuales entrarán al plasma, las gotas más grandes son eliminadas de la cámara por gravedad y finalmente los residuos se drenan a un contenedor. Las gotas seleccionadas pasan a la antorcha del plasma mediante un inyector, el cual deposita la muestra directamente en el plasma para su subsecuente atomización y ionización (**Taylor, 2001**).

En la **Figura 7** se resume la transformación de la muestra, desde que está en disolución hasta la fase ionizada.

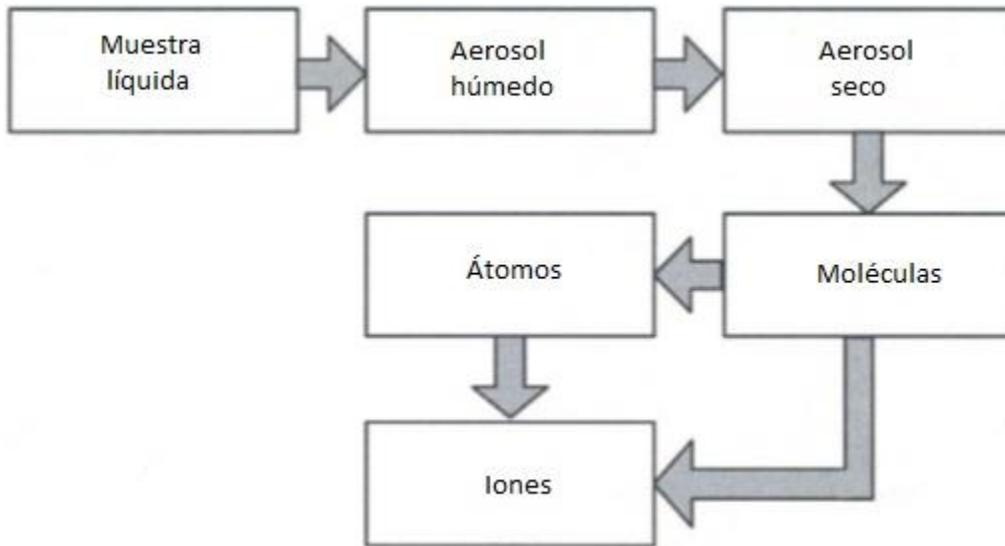


Figura 7. Proceso de transformación de la muestra, desde disolución hasta que llega al plasma (Taylor, 2001)

7.3. Generador del plasma

El plasma por acoplamiento inductivo se forma acoplado la energía producida por un generador de radiofrecuencia (RF) y un campo electromagnético. El campo se produce aplicando la RF (de 700 a 1500 W) a una bobina de cobre con dos o tres espiras.

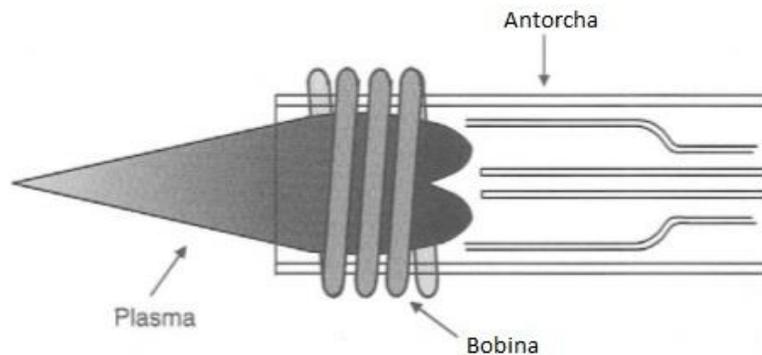


Figura 8. Diagrama del sistema generador del plasma (Taylor, 2001)

Una corriente alterna es generada, la cual oscila a una frecuencia de hasta 40 MHz. El plasma inicia por un chispazo directo a la corriente del gas (argón de ultra-alta pureza) que generará el plasma. Cuando el chispazo golpea al gas se inicia una cascada de electrones, la cual genera una reacción de ionización en cadena generando iones de argón ayudado por el campo magnético y la RF. Este *efecto cascada* crea y soporta al plasma siempre y cuando la RF sea aplicada a la bobina (Taylor, 2001).

La antorcha que soporta al plasma está conformada por dos tubos concéntricos de cuarzo y está colocada dentro de la bobina de RF (**Thomas, 2001**).

La función del plasma es proporcionar la energía necesaria para ionizar los elementos de la muestra, esto se logra debido a las temperaturas que se alcanzan de: 6000 K (zona fría), 10 000 K (zona caliente) (ver **Figura 8**).

7.4. Interface de triple cono

La función de la interface es de seleccionar los iones formados en el ICP, llevarlos del ambiente hostil (altas temperaturas y presión atmosférica) al espectrómetro de masas (sistema al ultra-alto vacío), por lo que se requieren tres conos concéntricos generalmente fabricados en níquel o platino (**Taylor, 2001**). Los conos son enfriados con agua a circulación constante para evitar ser dañados.

Las funciones y descripciones de los conos son las siguientes (**Thomas, 2001**).

1. Cono *muestreador*. Se encuentra a una presión de 4 torr y tiene un diámetro de 1.1 mm, a través de él se forma el haz de iones generado en el plasma.
2. Cono *separador*. Alinea el haz de iones para que entre de forma ordenada al sistema interno, tiene un diámetro de 0.88 mm y una presión de 0.25 torr.
3. Cono *hiperseparador*. Se encarga de afinar el haz de iones. Se encuentra a una presión de 0.5 mtorr y tiene un diámetro de 1.0 mm (**PerkinElmer, 2010**).



Figura 9. Interface de triple cono (PerkinElmer, NexION Brochure 2010)

7.5. Cuadrupolo deflector

Es un sistema de filtración, donde se utilizan diferencias de potencial para que el haz de iones gire 90° eliminando material neutro, iones doblemente cargados, fotones y aniones (**PerkinElmer, 2010**). El funcionamiento del cuadrupolo deflector se ejemplifica en la **Figura 10**.

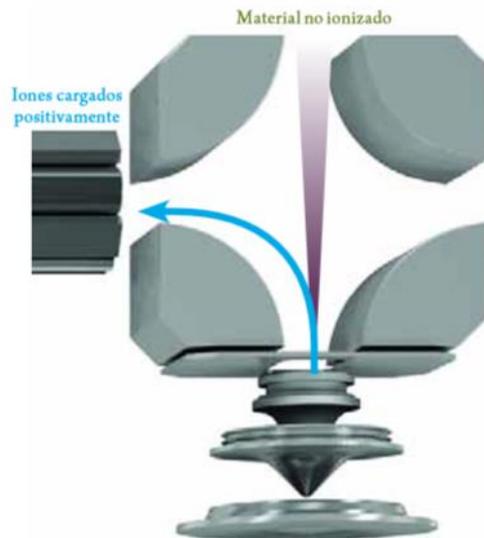


Figura 10. Cuadrupolo deflector de iones (PerkinElmer, NexION Brochure, 2010)

7.6. Celda universal

Este componente se encarga de transportar el haz de iones filtrado por el cuadrupolo deflector, además actúa como discriminador de iones, eliminando aquellos que no tengan una energía cinética adecuada de acuerdo a una previa configuración del software. Puede funcionar como celda de colisión o de reacción para poder eliminar interferencias (**PerkinElmer, 2010**).



Figura 11. Celda universal (PerkinElmer, NexION Brochure 2010)

7.7. Espectrómetro de masas

Los iones producidos en el ICP son separados por el espectrómetro de masas de acuerdo a su relación m/z (**Taylor, 2001**).

El espectrómetro de masas es un cuadrupolo formado por cuatro rodillos equidistantes puestos en forma simétrica (ver **Figura 12**). Estos rodillos están hechos de metal (oro) altamente pulido. El espacio central que queda entre los rodillos debe quedar alineado con la entrada del haz de iones (**Taylor, 2010**).

El espectrómetro de masas funciona aplicando corriente directa (CD) a un par de rodillos paralelos y una RF en el otro par. La CD cambia a una frecuencia de 40 MHz, lo que provoca la separación de los iones de acuerdo a la relación m/z (Thomas, 2001. Taylor, 2001).

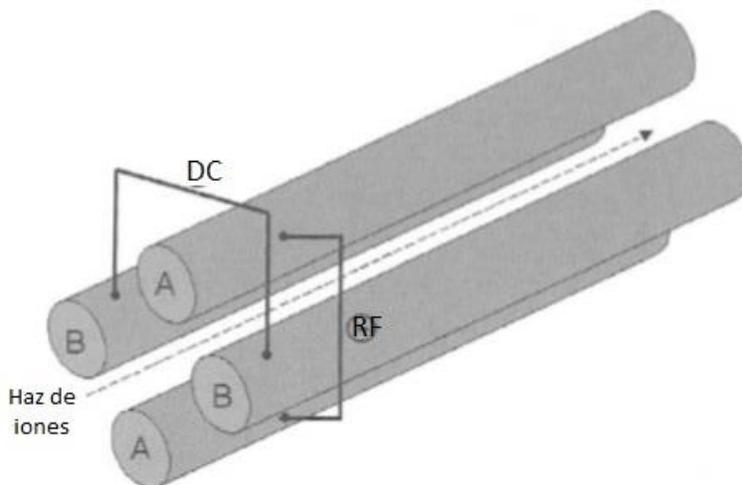


Figura 12. Espectrómetro de masas (Taylor, 2001)

7.8. Detector de dinodos discreto

Cuando un ion emerge del cuadrupolo separador entra a una curvatura y choca contra el primer dinodo. Cuando el ion golpea el primer dinodo éste genera una cascada de electrones secundarios que pasan al siguiente dinodo, donde se generan más electrones secundarios, y así sucesivamente (Thomas, 2001).

La corriente generada es proporcional a la cantidad de iones del analito, generando una señal que está relacionada con la concentración del analito en la muestra.

Cuando el analito se encuentra a muy bajas concentraciones se trabaja el detector en un modo de pulsos, y si se encuentra a altas concentraciones el detector trabaja en modo análogo.

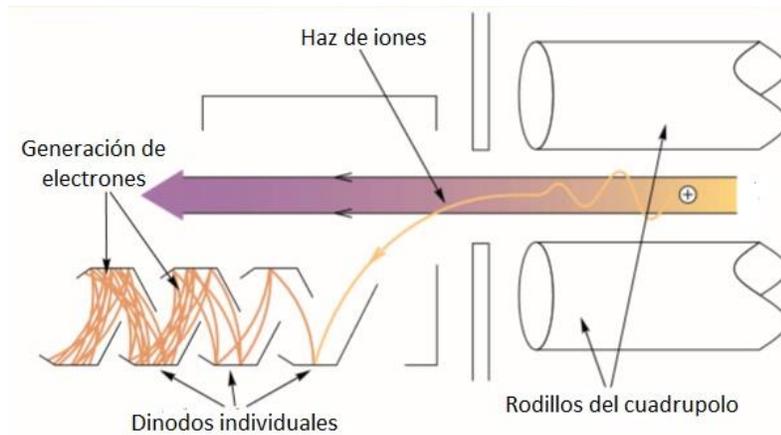


Figura 13. Esquema de funcionamiento del detector (Thomas, 2001)

8. INTERFERENCIAS EN ICP-MS

La técnica de ICP-MS tiene interferencias, las cuáles pueden ser corregidas con un buen manejo del software del equipo

En general, estos tipos de interferencias pueden provocar lecturas que concluyan en resultados falsos-positivos en varios isótopos de interés durante el análisis (Taylor, 2001).

Los distintos tipos de interferencias se describen a continuación.

8.1. Traslape isobárico

Muchos elementos de la Tabla periódica tienen múltiples isótopos, cada uno con una relación m/z exclusiva.

Se ha demostrado que isótopos con relación masa-carga impar están libres de interferencias isobáricas mientras que isótopos con relación masa-carga par son susceptibles a este tipo de interferencias.

Por ejemplo, el isótopo más abundante del zinc es ^{64}Zn mientras que el níquel tiene un isótopo ^{64}Ni con una abundancia relativa del 0.92%. En análisis de ultra-trazas el isótopo del níquel es un interferente importante para el zinc (Taylor, 2001).

Otro ejemplo es el argón, usado como el gas generador del plasma el cual tiene un isótopo ^{40}Ar , el cual puede interferir con el análisis de ^{40}K o ^{40}Ca , es por eso que en análisis de los isótopos mencionados de potasio y calcio no pueden ser analizados en ICP-MS aunque se tenga el sistema más fino hablando de resolución (Taylor, 2001).

Las interferencias isobáricas crecen cuando la matriz de estudio se vuelve más compleja, es decir, mientras más elementos contenga la muestra será más susceptible de tener este tipo de interferencias.

8.2. Traslape poliatómico

En la técnica ICP-MS existe la formación de aductos homogéneos o heterogéneos (unión de dos o más especies sin que existan cambios estructurales), por ejemplo, la formación del aducto Ar_2^+ que puede interferir con el isótopo ^{80}Se , o el aducto ArO^+ el cual interfiere con el isótopo ^{56}Fe (Taylor, 2001).

8.3. Óxidos moleculares

Los óxidos moleculares son especies que se forman cuando existe un exceso de oxígeno presente en el plasma, el cual puede provenir de diversas fuentes, dependiendo del equipo que se utilice.

Cuando el sistema de introducción de muestra es por medio de un nebulizador el oxígeno proviene del agua en el cual está la matriz de estudio. El agua se disocia gracias a la energía del plasma generando los átomos de oxígeno que darán origen a los óxidos.

Los óxidos pueden dañar la entrada de los conos y también pueden ser interferentes como en el caso de los traslapes isobáricos. Este tipo de interferencia puede ser eliminada moviendo la posición de la antorcha o del inyector.

8.4. Iones doblemente cargados

Los elementos que tienen potenciales de ionización bajos, como los elementos alcalinos, algunas tierras raras y ciertos metales de transición pueden generar iones policargados gracias a la alta energía que provee el plasma.

Debido a la relación masa-carga los iones doblemente cargados aparecerán en el espectro de masas a la mitad de su relación masa-carga nominal, ocasionando interferencias del tipo isobárico (Taylor, 2001).

Estas interferencias también son corregidas moviendo la posición de la antorcha y el inyector.

8.5. Ruido de fondo

El ruido de fondo en el análisis químico es de gran importancia ya que puede interferir en los resultados obtenidos durante el proceso de análisis. El **Ruido Químico** en el instrumento está dado por factores ambientales como temperatura, presión, humedad, entre otros y el **Ruido Instrumental** se debe a los componentes del equipo; puede ser ruido térmico debido al movimiento térmico de los electrones en resistencias que conforman al sistema electrónico del equipo y ruido de disparo debido al movimiento de electrones dentro de las conexiones del equipo. En el análisis instrumental siempre se espera que la relación señal-ruido (S/N) sea un cociente alto, así se asegura una alta fiabilidad en los resultados obtenidos. El ruido de fondo es un factor muy importante en el ICP-MS debido a la alta sensibilidad del equipo por lo que el entorno en el que éste se encuentre puede afectar de forma importante el análisis.

Se recomienda que el equipo permanezca en un sitio libre de corrientes de aire, además de utilizar equipo de protección personal como guantes de nitrilo libre de metales, así como cubre boca y cofia.

9. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Un método analítico se dice que es validado cuando se demuestra que las características de desempeño son adecuadas para el uso que fue diseñado el método y deben ser tan amplias como sea necesario para cumplir con los requisitos propuestos en el método. Se puede utilizar cuando se demuestra la equivalencia de los resultados entre un método ya establecido y un método nuevo o adaptado (**Morillas, 2016**).

En México la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios establece que para validar un método analítico que utilice Plasma por Acoplamiento Inductivo se debe cumplir con los siguientes parámetros de validación (**COFEPRIS, 2011**).

- Selectividad
- Límite de detección y límite de cuantificación.
- Intervalo de trabajo
- Sensibilidad
- Sesgo
- Precisión
- Recobro
- Robustez

Los parámetros de validación se describen a continuación.

9.1. Selectividad

La selectividad analítica se relaciona con el grado en el que un método puede ser utilizado para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes de comportamiento similar.

En la etapa de medición normalmente no se mide la concentración del analito directamente, en su lugar, se obtiene la lectura de una propiedad específica del analito (conductividad, potencial, absorbancia, etc.). Por lo tanto, es muy importante establecer que la propiedad medida sólo se deba al analito y no a posibles interferencias (**Morillas, 2016**).

9.2. Límite de Detección y Límite de Cuantificación

En un método analítico es importante conocer la concentración más baja del analito que puede ser detectada por el método a un nivel de confianza aceptable. A esta concentración se le conoce como Límite de Detección (LOD por sus siglas en inglés), mientras que el Límite de Cuantificación (LOQ por sus siglas en inglés)

es el nivel más bajo en el cual el desempeño es aceptable para una aplicación típica.

Para poder determinar el LOD y el LOQ se usan frecuentemente muestras blanco (muestras con cantidades detectables de analito) o muestras de ensayo con concentraciones del analito por debajo de un LOQ esperable. Las muestras blanco funcionan bien en técnicas como la espectrofotometría y espectroscopia atómica, mientras que para técnicas donde se analizan ultra-trazas no es recomendable utilizar los blancos, ya que se tiene el riesgo de contaminaciones en los reactivos. En estos casos se propone calcular LOD y LOQ utilizando las curvas de calibración obtenidas con las siguientes aproximaciones **(COFEPRIS, 2011)**

Ecuación 1
$$LOD = \frac{3 \times sb_{\sigma}}{m}$$

Ecuación 2:
$$LOQ = \frac{10 \times sb_{\sigma}}{m}$$

Dónde:

sb_{σ} : Desviación estándar de la ordenada al origen de la curva de calibración

m : Pendiente de la curva de calibración

La desviación estándar de la ordenada al origen de la curva de calibración se calcula de la siguiente forma.

Ecuación 2.1:
$$sb_{\sigma} = s_{x/y} \sqrt{\frac{\sum_i^n x_i^2}{n \sum_i^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

Dónde:

$s_{x/y}$: Desviación estándar de la variable x en y

$\sum_i^n x_i^2$: Suma de los cuadrados de x

$\sum_i^n (x_i - \bar{x})^2$: Cuadrado de la suma de la diferencia entre un valor x y su promedio

n : Número de eventos o estándares

9.3. Intervalo de trabajo

Esta comprendido entre las concentraciones de trabajo superior e inferior (LOQ), para los que se ha demostrado que el analito es cuantificado con un nivel satisfactorio de repetibilidad, recuperación y linealidad **(COFEPRIS, 2011)**.

Entre el LOQ y el extremo superior del intervalo de trabajo del instrumento la respuesta de éste debe tener una relación matemática conocida (lineal, cuadrática, exponencial, etc.). Durante la validación es necesario confirmar esta relación y demostrar que el intervalo de trabajo del instrumento sea compatible con la curva de calibración empleada en el análisis.

Para evaluar el intervalo de trabajo del instrumento y confirmar su aptitud para el estudio se deben estudiar patrones de calibración o estándares y las concentraciones de éstos se deben distribuir entre el intervalo de trabajo seleccionado.

Lo siguiente es confirmar la relación entre la concentración y la respuesta del instrumento revisando las estadísticas de regresión como el gráfico de residuales y el coeficiente de determinación R^2 el cual debe ser ≥ 0.995 para el caso de regresión lineal, ya que así se asegura que la variabilidad entre la concentración del analito y su respuesta asociada es biunívoca **(Morillas, 2016)**.

9.4. Sensibilidad

Es la capacidad de discriminar entre pequeñas diferencias en la concentración del analito y está limitada a la pendiente de la curva de calibración **(Morillas, 2016)**.

Corresponde el cambio en la respuesta del instrumento con la concentración del analito. Cuanto mayor es la pendiente de la curva de calibración la sensibilidad del método es mayor **(COFEPRIS, 2011)**.

9.5. Sesgo

Se basa en la comparación de la media de los resultados obtenidos en el método contra un valor de referencia. Para evaluar este parámetro se usan Materiales de Referencia Certificados (MRC) los cuales son patrones de referencia de la matriz que se esté analizando, aunque es importante mencionar que su existencia es limitada, ya que no existen MRC para cualquier matriz de estudio porque puede ser muy complicado de reproducir o de obtener **(Morillas, 2016)**.

El sesgo se calcula de la siguiente forma.

Ecuación 3:
$$b(\%) = \frac{\bar{x} - x_{ref}}{x_{ref}} \times 100$$

Dónde:

\bar{x} : Promedio de las mediciones del MRC

x_{ref} : Valor de referencia

9.6. Precisión

Es una medida de qué tan cercanos están los resultados obtenidos, unos con respecto a los otros y se expresa mediante la desviación estándar o desviación estándar relativa de los resultados obtenidos **(Morillas, 2016)**.

9.7. Recobro

Cuando se desarrolla un método de cuantificación no se sabe si la cantidad de analito obtenida es la existente en la matriz; por eso se recurre a este parámetro, el cual indica el grado de recuperación del analito después de la extracción/digestión que se realizó a la matriz de estudio.

El recobro usando muestras fortificadas se calcula de la siguiente forma.

Ecuación 4:
$$R(\%) = \frac{C_{Fort} - C_i}{C_A} \times 100$$

Dónde:

C_{Fort} : Concentración de analito medida en la muestra fortificada

C_i : Concentración del analito medida en la muestra sin fortificar

C_A : Concentración del analito adicionado

El recobro usando MRC se calcula de la siguiente forma (**Morillas, 2016**).

Ecuación 5:
$$R(\%) = \frac{C_{obt}}{C_{rep}} \times 100$$

Dónde:

C_{obt} : Valor obtenido experimentalmente

C_{rep} : Valor reportado certificado

10. TRABAJOS RELACIONADOS

Diversos trabajos han reportado el desarrollo de metodologías para la cuantificación de EPT en tejidos y muestras biológicas como placenta, cordón umbilical, sangre materna y sangre de cordón umbilical. En la mayoría de los trabajos se consideran EPT como As, Cd, Hg y Pb, además de elementos esenciales como Ca, Cu, Zn, Mg, entre otros. Cabe mencionar que los países que sobresalen por su capacidad en el desarrollo de estas metodologías son Estados Unidos, Polonia y China debido a que tienen ciudades muy contaminadas y eso aumenta el riesgo de exposición de la población a estos EPT.

Los resultados obtenidos en este trabajo podrán ser comparados con los datos recopilados de algunos trabajos internacionales, así se podrá tener un panorama sobre la exposición a los EPT analizados. Se ha optado por usar una tabla para resumir y comparar los resultados de los trabajos más sobresalientes.

En la **Tabla 4** se muestran seis estudios reportando: tejido estudiado, técnica de preservación y destrucción, mezcla de reacción, elementos estudiados, límites de detección obtenidos y resultados, todos los estudios utilizan ICP-MS como técnica de análisis.

En la **Tabla 5** se muestran cinco estudios, la variante de ésta es la técnica de análisis debido a que utilizaron técnicas distintas al ICP-MS.

Tabla 4. Trabajos internacionales con metodologías semejantes a este proyecto.

PAÍS	Korea del Sur (KIM et al, 2015)	EUA (CHEM et al, 2014)	EUA (D'ILIO et al, 2010)	EUA (HARRINGTON et al, 2010)	Austria (GUNDACKER et al, 2010)	Bangladesh (KIPPLER et al, 2010)
TEJIDO	Sangre materna y cordón umbilical	Plasma de sangre de cordón umbilical	Sangre materna	Placenta	Placenta	Placenta y sangre de cordón umbilical
PRESERVACIÓN	Congelamiento	Congelamiento a -80°C	Congelamiento	N/E ³	N/E	Liofilización
DESTRUCCIÓN	Análisis directo	N/A ⁴	Digestión en envase abierto a 60°C	Digestión	Digestión	Horno de microondas
MEZCLA	N/A	N/A	HNO ₃ + H ₂ O ₂	HNO ₃ + H ₂ O ₂	HNO ₃ + H ₂ O ₂	HNO ₃
TÉCNICA	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS
ELEMENTOS	Pb, Cd, Hg	Cd, Hg, Pb, Se	As, Cd, Hg, Pb	As, Cd, Pb	Pb, Hg	As, Cd
LOD	Pb: 0.079 µg/dL Cd: 0.002 µg/dL Hg: N/D	Cd: 0.04 ppb Hg: 0.02 ppb Pb: 0.02 µg/dL Se: 4.95 ppb	As: 0.696 µg/L Cd: 0.030 µg/L Hg: 0.197 µg/L Pb: 0.168 µg/L	As: 0.001 ng/g Cd: 0.001 ng/g Pb: 0.0009 ng/g	N/E	As: 0.1 µg/kg Cd: 0.02 µg/kg
RESULTADOS	En sangre materna: Pb: 0.50-2.20 µg/dL Cd: 0.24-2.80 µg/dL Hg: 1.36-8.50 µg/dL	Cd: 0.03-0.05 µg/L Hg: 0.16-0.29 µg/L Pb: 0.12-0.22 µg/dL Se: 48.65-67.82 µg/L	N/E	N/E	Pb: 13 µg/L Hg: 1.1 µg/L	En placenta: As: 17-929 µg/kg Cd: 40-492 µg/kg En sangre: Cd: 0.074-0.32 µg/kg As: 0.72-0.40 µg/kg

³ Parámetro no especificado

⁴ Parámetro no aplicable

Tabla 5. Trabajos internacionales con metodologías distintas a este proyecto

PAÍS	Perú (CASTRO-BEDRIÑANA et al, 2013)	Polonia (KOZIKOWSKA et al, 2013)	Arabia Saudita (AL-SALEH et al, 2011)	China (GUO et al, 2010)	Polonia (BARANOWSKA et al, 1992)
TEJIDO	Placenta	Placenta, cordón umbilical, sangre de cordón umbilical	Placenta y sangre	Placenta	Cordón umbilical y placenta
PRESERVACIÓN	Secado en horno a 70°C	Congelamiento	Secado	Secado en horno a 110°C	Secado a 105°C en contenedores de cuarzo
DESTRUCCIÓN	Digestión en envase abierto	Análisis directo	Digestión en horno cerrado a 85°C	Digestión en envase abierto	Horno de microondas
MEZCLA	HNO ₃ + HClO ₄	N/A	HNO ₃	HNO ₃ + H ₂ O ₂	HNO ₃
TÉCNICA	GF-AA ⁵	CV-AA ⁶	AA ⁷	GF-AA	GF-AA
ELEMENTOS	Pb	Hg	Cd, Hg, Pb	Pb, Cd, Cr, Ni	Pb, Cd
LOD	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E
RESULTADOS	Promedio: 319.0 µg/100g	En sangre: 3.0-16.0 µg/L En placenta: 0.004-0.104 µg/g En cordón: 0.003-0.064 µg/g	En placenta: Cd: 0-4.363 µg/g Hg: 0-13-003 µg/g Pb: 0-78 µg/g En sangre: Cd: 0.245-15.325 µg/dL Hg: 0-26.532 µg/dL Pb: 0.154-56.511 µg/dL	Pb: 19.76-3078.13 ng/g Cd: 0.37-288.25 ng/g Cr: 95.75-842.32 ng/g Ni: 1.47-270.37 ng/g	En cordón umbilical: Cd: 0.8-1.6 ng/mL Pb: 22-49 ng/mL En placenta: Cd: 0.05-0.3 µg/g Pb: 0.1-0.8 µg/g

⁵ Absorción atómica con horno de grafito. ⁶ Absorción atómica con vapor frío. ⁷ Absorción atómica.

11. OBJETIVOS

11.1. Objetivo general

Implementar y validar un método de análisis para determinar As, Cd, Hg y Pb en cordón umbilical y placenta mediante ICP-MS previa digestión de muestras en horno de microondas.

11.2. Objetivos particulares

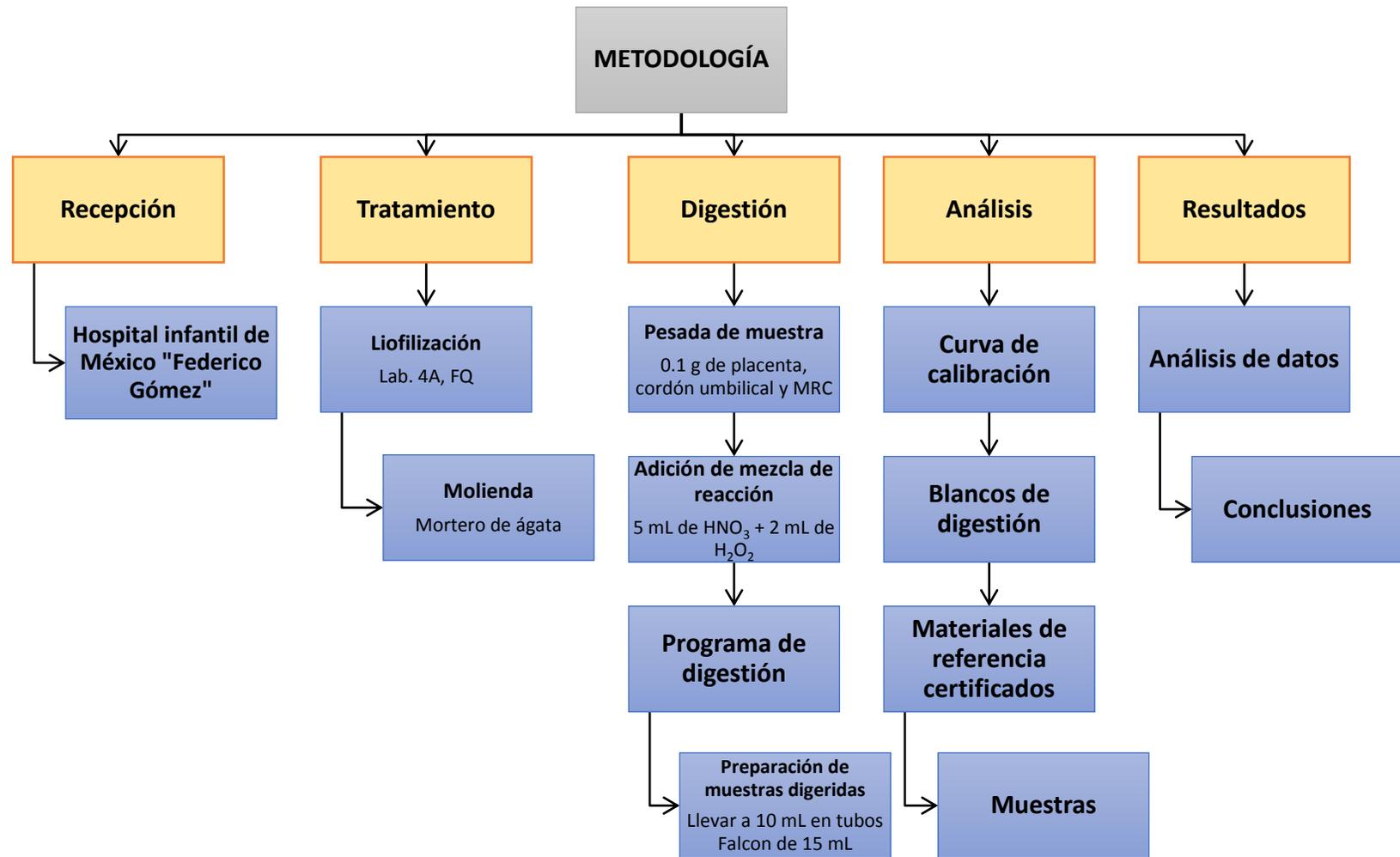
- Implementar un método de digestión ácida vía horno de microondas para analizar muestras biológicas.
- Implementar un método de análisis mediante ICP-MS para analizar muestras biológicas.
- Verificar la eficiencia del método obteniendo parámetros de validación.

12. HIPÓTESIS

Será posible determinar las concentraciones de As, Cd, Hg y Pb en cordón umbilical y placenta mediante la técnica de ICP-MS y previa digestión por microondas cumpliendo con controles de calidad previamente establecidos.

13. METODOLOGÍA

La metodología del presente proyecto consiste en la recepción, tratamiento, digestión y análisis de muestras para la obtención de resultados y su posterior tratamiento. A continuación se muestra un diagrama describiendo la metodología efectuada.



13.1. RECEPCIÓN DE MUESTRAS

Para este estudio se analizaron los tejidos de doce individuos, cada individuo aportó una muestra de cordón umbilical y una de placenta para formar un par de análisis, por lo tanto se generaron doce pares de análisis teniendo un total de 24 tejidos para analizar.

Previo al análisis las muestras se mantuvieron en congelación a -20°C y se descongelaron un día antes de la recepción para poder tomar una fracción de aproximadamente 2 cm^3 para ser trasvasados a tubos Falcon de 15 mL y después volver a ser congelados a -20°C con el fin de facilitar su liofilización.

13.2. TRATAMIENTO

13.2.1. Liofilización

Las muestras fueron liofilizadas en el laboratorio 4 A de la Facultad de Química, UNAM, utilizando una liofilizadora de tres vasos (marca LABCONCO de 6 L). Los tubos Falcon donde se encontraban las muestras se colocaron directamente en los vasos de la liofilizadora (ver **Figura 14**).

El tiempo promedio de liofilización para las muestras de cordón umbilical fue de 28 horas mientras que para las muestras de placenta el tiempo promedio fue de 36 horas.



Figura 14. Muestras en el equipo de liofilización

13.2.1. Molienda

Las muestras liofilizadas fueron molidas en mortero de ágata previamente lavado con alcohol isopropílico y agua desionizada por cada muestra molida. La muestra molida se trasvasó nuevamente a su correspondiente tubo Falcon con una cuchara de madera previamente lavada con alcohol isopropílico y agua desionizada.



Figura 15. Mortero de ágata utilizado para moler las muestras

13.2.2. Control de calidad

Para identificar posibles contaminaciones o interferencias durante el estudio se implementaron controles de calidad en las diferentes etapas del proceso de análisis, colocando envases libres de metales llenos con agua desionizada durante la molienda y pesada de las muestras. Estos controles de calidad fueron analizados junto con las muestras para tener un control de las contaminaciones y así poder descartar lecturas falsas-positivas.

13.3. DIGESTIÓN DE MUESTRAS

13.3.1. Pesada de muestras

Para la digestión de las muestras de placenta y cordón se pesaron 0.1g directamente en el tubo de digestión en la balanza analítica (marca RADWAG XA60/220/X), usando una cuchara de madera para tomar la muestra.

También se pesó una muestra de MRC 1577C de hígado de bovino (código 1577c) de aproximadamente 0.1g.



Figura 16. Balanza RADWAG XA60/220/X utilizada

13.3.2. Adición de mezcla de reacción

Después de pesar las muestras en los tubos digestores (ver **Figura 17**) se agregaron 5 mL de HNO_3 grado ultra-puro (J.T. Baker), y posteriormente se agregaron 2 mL de H_2O_2 grado ultra-puro (J.T. Baker).



Figura 17. Ejemplo de un vaso de reacción junto con su contenedor de seguridad

El ácido nítrico degrada la materia orgánica debido al poder oxidante del ácido, y el peróxido de hidrógeno rompe dobles y triples enlaces ayudando a la degradación de la matriz biológica, también es auxiliar para degradar los lípidos que tiene la muestra.

La mezcla de reacción se dejó reposar aproximadamente 10 minutos para que se liberaran gases formados después de la adición de los reactivos y terminado este tiempo los tubos de digestión se colocaron dentro del rotor del horno de microondas.



Figura 18. H_2O_2 y HNO_3 utilizados para la digestión

13.3.3. Digestión

Se utilizó un horno de microondas marca PerkinElmer, modelo TITAN MPS con un rango de temperatura de 50 a 260°C y presión de 0 a 100 bar (ver Figura 19).

Tabla 6. Programa de digestión utilizado

T (°C)	P (bar)	Rampa (min)	Sostén (min)
160	30	5	5
190	30	1	10
50	30	1	10
50	0	0	0
50	0	0	0



Figura 19. Horno de microondas utilizado

13.3.4. Preparación de disoluciones digeridas

Las disoluciones resultantes de la digestión se trasvasaron a tubos Falcon de 15 mL previamente pesados y se llevaron a un volumen de 10 mL con agua desionizada. Los tubos Falcon con la muestra digerida se pesaron nuevamente para calcular la masa de la disolución digerida por diferencia de pesos entre el mismo tubo.

13.4. ANÁLISIS DE MUESTRAS

13.4.1. Optimización del equipo

La optimización se hace con una disolución estándar descrita en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Descripción de disolución para optimización

Disolución	Elementos	Concentración
Daily Performance Check	Be, Mg, Cu, Rh, Cd, In, Ba, Pb, Ce, U	10 ppm

En esta optimización se verifica la sensibilidad del equipo en el intervalo de trabajo, para ello se utilizan tres masas distintas de acuerdo a su tamaño, es decir, baja (Be 9), media (In 115) y alta (U 238). También se mide el ruido de fondo y la relación entre la generación de óxidos y iones doblemente cargados contra un elemento de referencia que es el Ce, así como la repetibilidad en las mediciones usando el %RSD de las masas baja, media y alta. Los criterios fijados para el análisis se establecen automáticamente en el equipo cuando se plantea un

análisis de ultra-trazas. Estos criterios fijados y los criterios obtenidos se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Criterios para optimización

Analito	Criterio esperado	Criterio obtenido
Be 9	>3000	5336.66
In 115	>40000	54993.25
U 238	>30000	46424.66
Ruido de fondo	≤1	0.17
CeO 156/Ce 140	≤0.025	0.015
Ce++ 70/Ce 140	≤0.03	0.015
RSD Be 9	<0.03	0.0084
RSD In 115	<0.03	0.0070
RSD U 238	<0.03	0.0133

Las condiciones de trabajo con las que la optimización del equipo fue correcta y por lo tanto las condiciones utilizadas para el análisis de las muestras se enlistan en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Condiciones de trabajo del equipo ICP-MS

Parámetro	Valor
Flujo del nebulizador	0.79 L/min
Flujo de gas auxiliar	1.20 L/min
Flujo de gas para el plasma	18.00 L/min
Voltaje del cuadrupolo deflector	-8.00
RF para generar plasma	1600.00 W
Voltaje de modo análogo del detector	-2200.00
Voltaje de modo pulso del detector	1250.00

Para este estudio los isótopos analizados se muestran en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Isótopos analizados

Elemento	Isótopo
As	75
Cd	111
Hg	202
Pb	208

Estos isótopos fueron elegidos debido a que presentaron las mejores correlaciones lineales y bajas o nulas interferencias en análisis de ensayo previos a este trabajo.

13.4.2. Curva de calibración

Para preparar la curva de calibración se utilizaron cinco disoluciones patrón multi elementales marca PerkinElmer Pure Plus descritos en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Características de los patrones multi elementales utilizados

Patrón	Elementos	Concentración	Lote
Hg	Hg	10 ppm	CL8-35HGYI
S2	Ce, Dy, Er, Eu, Gd, Ho, La, Lu, Nd, Pr, Sc, Sm, Tb, Th, Tm, Y, Yb	10 ppm	CL1-79MKBYI
S3	Ag, Al, As, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Ga, In, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Rb, Se, Sr, Tl, U, V, Zn	10 ppm	CL12-162YPYI
S4	Au, Hf, Ir, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Sn, Te	10 ppm	CL12-155YPYI
S5	B, Ge, Mo, Nb, P, Re, S, Si, Ta, Ti, W, Zr	10 ppm	CL1-94MKBYI

La curva de calibración consiste en cinco estándares de concentraciones 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 y 10.0 ppb preparados a partir de las disoluciones patrón descritas en la **Tabla 11**.

Para preparar los estándares de la curva primero se preparó una disolución stock de 50 mL con concentración de 50 ppb a partir de 0.250 mL de cada patrón multi elemental. El modelo de cálculo para preparar la disolución stock es el siguiente.

Ecuación 6:
$$\frac{C.de\ stock}{C.de\ patrón\ multi\ elemental} \times V\ de\ stock = Alícuota\ tomada$$

Dónde:

C. de stock: Concentración de la disolución stock (50 ppb)

C. de patrón multi elemental: Concentración del patrón multi elemental: (10 000 ppb)

V de stock: Volumen de la disolución stock (50 mL)

El modelo aplicado se presenta a continuación.

$$\frac{50\ ppb}{10\ 000\ ppb} \times 50\ mL = 0.250\ mL$$

Las alícuotas de 0.250 mL se tomaron usando una micropipeta marca Eppendorf con un rango de 100 a 1000 µL.

Para preparar los estándares de la curva de calibración de 0.5, 1.0, 5.0 y 10.0 ppb se usó la **ecuación 7**.

Ecuación 7:
$$\frac{C.de\ estándar}{C.de\ stock} \times V\ de\ estándar = Alícuota\ tomada$$

Dónde:

C. de estándar: Concentración del estándar de la curva de calibración

C. de stock: Concentración de la disolución stock (50 ppb)

V de estándar: Volumen del estándar de la curva de calibración (10 mL)

Alícuota tomada: Alícuota tomada de la disolución stock

El modelo aplicado para el estándar de 0.5 ppb se presenta a continuación.

$$\frac{0.5\ ppb}{50\ ppb} \times 10\ mL = 0.100\ mL$$

Los volúmenes para preparar la curva de calibración son los siguientes.

Tabla 12. Preparación de la curva de calibración

C. de estándar (ppb)	V. de stock (mL)
0.5	0.100
1.0	0.200
5.0	1.0
10.0	2.0

Los volúmenes se tomaron usando una micropipeta marca Eppendorf con rango de 100 a 1000 µL.

Para el estándar de 0.1 ppb se tomaron 0.100 mL del estándar de concentración 10.0 ppb usando la misma micropipeta marca Eppendorf.

13.4.3. Análisis en ICP-MS

Las muestras fueron analizadas bajo la técnica ICP-MS en el Laboratorio de Investigación y Servicios en Toxicología (LISTO) del Centro de Investigación y Estudios Avanzados, unidad Zacatenco, del Instituto Politécnico Nacional.

Se utilizó el equipo marca PerkinElmer modelo NexION 300D.



Figura 20. Equipo de ICP-MS utilizado

Para mantener un control durante el análisis se implementó el orden mostrado en la **Figura 21** para evitar al máximo la mezcla entre muestras. Las primeras muestras que se analizaron fueron los siete blancos de digestión, posteriormente agua desionizada (esto para asegurar que las siguientes muestras no se contaminen) y después se analizó el MRC. Al término de éste nuevamente se analizó agua desionizada y finalmente se analizaron las muestras de cordón y placenta por pares, analizando cada cinco muestras un estándar de la curva de calibración de 5 ppb para asegurar que no se haya presentado deriva en el instrumento.

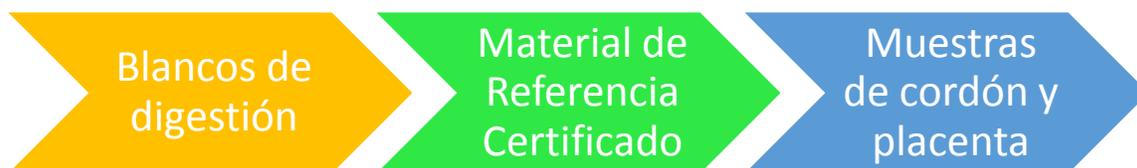


Figura 21. Esquema del orden de análisis de las muestras

14. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos se muestran a continuación, se discutirán primero los resultados relacionados a los parámetros de validación del método y posteriormente se discutirán los resultados obtenidos de las muestras de cordón umbilical y placenta.

14.1. Curvas de calibración

Con las curvas de calibración se evaluaron los parámetros de validación para el intervalo de trabajo y la respuesta lineal entre la concentración del analito y la respuesta que éste emite en el instrumento, en el caso de la técnica de ICP-MS la respuesta asociada al analito son *cuentas por segundo* (cps).

La relación lineal fue evaluada bajo el Coeficiente de Determinación (R^2) el cual debe ser ≥ 0.995 .

Para graficar las curvas de calibración se calculó la diferencia entre la respuesta del blanco de calibración a la respuesta de cada estándar con el fin de ajustar la línea base del instrumento al momento del análisis.

La intensidad del blanco para cada isótopo indica que éste contiene a los analitos de interés, pero la intensidad es menor que el estándar de 0.1 ppb lo que significa que será confiable tener resultados mayor o iguales a 0.1 ppb siempre y cuando la correlación lineal sea mayor o igual a 0.995.

Los resultados de la curva de calibración con la intensidad del blanco restada a cada estándar se muestran en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Intensidades de los analitos de interés con el blanco de calibración restado

C. estándar (ppb)	⁷⁵ As (cps)	¹¹¹ Cd (cps)	²⁰² Hg (cps)	²⁰⁸ Pb (cps)
0.1	334.340	498.676	133.005	1633.862
0.5	1943.146	2718.261	991.059	13536.171
1.0	4118.957	5618.776	3259.114	30385.640
5.0	21703.965	29557.234	23894.177	156599.672
10.0	45137.861	61065.616	50785.927	319604.822

Las curvas de calibración así como los gráficos de residuales asociados se presentan en el **Anexo 1** y la **Tabla 14** resume las estadísticas de regresión de las curvas.

En los gráficos de residuales asociados a las curvas de calibración (**Anexo 1**) se obtuvo un comportamiento homocedástico para los residuos de todas las curvas, esto significa que el error cometido en las mediciones tuvo la misma varianza.

Tabla 14. Estadísticas de regresión lineal de las curvas de calibración

Isótopo	Modelo lineal	R²
⁷⁵ As	$y = 4511.2x - 274.5$	0.9997
¹¹¹ Cd	$y = 6103.3x - 309.47$	0.9998
²⁰² Hg	$y = 5133.1x - 1024.3$	0.9985
²⁰⁸ Pb	$y = 32027x - 1647.7$	0.9999

Los coeficientes de determinación obtenidos en las curvas de calibración cumplen con el objetivo de tener un valor ≥ 0.995 lo que significa que el intervalo de trabajo tiene una respuesta lineal adecuada entre la concentración del analito y la intensidad de éste en cps. Las pendientes de las curvas de calibración están relacionadas con la sensibilidad del método, mientras más alto sea el valor de la pendiente significa que la sensibilidad para detectar y cuantificar el analito de interés será mayor.

Las pendientes obtenidas en las curvas de calibración se presentan en la **Tabla 15**.

Tabla 15. Pendientes de las curvas de calibración

Isótopo	Pendiente (cps/ppb)
⁷⁵ As	4511.2
¹¹¹ Cd	6103.3
²⁰² Hg	5133.1
²⁰⁸ Pb	32027

14.2. Límite de Detección y Límite de Cuantificación

Para este trabajo se calcularon los LOD y LOQ utilizando parámetros obtenidos en las curvas de calibración como la pendiente y la desviación estándar de la ordenada al origen del modelo lineal asociado, la cual se obtiene con la **Ecuación 2.1**.

En la **Tabla 16** se presentan los parámetros pendiente (m) y desviación estándar de la ordenada al origen (sb_m) para calcular LOD y LOQ.

Tabla 16. Parámetros estadísticos para cálculo de LOD y LOQ

Parámetro	⁷⁵ As	¹¹¹ Cd	²⁰² Hg	²⁰⁸ Pb
<i>m</i>	4511.2	6103.3	5133.1	32027
<i>sb_o</i>	187.92	214.92	463.28	721

Con estos parámetros y usando las **Ecuaciones 1 y 2** se obtienen los LOD y LOQ en unidades de concentración ppb ($\mu\text{g/L}$) presentados en la **Tabla 17**.

Tabla 17. LOD y LOQ en ppb

	⁷⁵ As (ppb)	¹¹¹ Cd (ppb)	²⁰² Hg (ppb)	²⁰⁸ Pb (ppb)
LOD	0.12	0.11	0.27	0.07
LOQ	0.42	0.35	0.90	0.23

Ahora se calculan el LOD y LOQ en miligramos del elemento por gramo de muestra siguiendo el modelo matemático mostrado a continuación.

Ecuación 8:
$$LOD \text{ ó } LOQ \frac{\mu g}{L} \times \frac{V}{Masa \text{ bco.}} = LOD \text{ ó } LOQ \frac{\mu g}{g}$$

Dónde:

LOD ó LOQ: Límite de detección o cuantificación reportado en ppb (µg/L)

V: Volumen de aforo de los blancos de digestión (0.010 L)

Masa bco.: Masa promedio de los blancos de digestión (11.8930 g)

Los límites calculados se presentan en la **Tabla 18**.

Tabla 18. LOD y LOQ en µg/g

	⁷⁵ As (µg/g)	¹¹¹ Cd (µg/g)	²⁰² Hg (µg/g)	²⁰⁸ Pb (µg/g)
LOD	0.0001	0.0001	0.0002	0.0001
LOQ	0.0004	0.0003	0.0008	0.0002

El Pb tiene el LOD más bajo (0.07 ppb) mientras que el Hg tiene el LOD más alto (0.27 ppb), el As y Cd tienen el LOD por arriba de la concentración del primer estándar de la curva de calibración.

Como se observa en las **Ecuaciones 1 y 2** utilizadas los LOD y LOQ son inversamente proporcionales a las pendientes de las curvas de calibración, es decir, mientras mayor sea la pendiente menor serán los límites. Analíticamente se deduce que los límites están íntimamente relacionados a la sensibilidad del método, es decir, mientras más alta sea la sensibilidad (o la pendiente de la curva de calibración) menor serán los límites.

En el análisis de ultra-trazas usando la técnica ICP-MS no es común obtener LOD a nivel de ppb, sin embargo no se puede asegurar que la técnica haya fallado en este rubro, lo que se supone es que el flujo del nebulizador fue muy alto por lo tanto la muestra no tuvo el tiempo suficiente para ionizarse.

Los LOD obtenidos en este trabajo se compararon con los reportados por D'Illio en 2010 (ver **Tabla 19**). La comparación hace notar que los límites reportados y los obtenidos son diferentes para los cuatro isótopos.

Tabla 19. Comparación de LOD obtenidos contra los reportados por (D'Ilio, 2010)

Isótopo	Resultados experimentales	Resultados reportados
	LOD (ppb)	LOD (ppb)
⁷⁵ As	0.12	0.696
¹¹¹ Cd	0.11	0.030
²⁰² Hg	0.27	0.197
²⁰⁸ Pb	0.07	0.168

14.3. Intervalo de trabajo

Con los LOD y LOQ calculados el intervalo de trabajo se puede reportar, siendo el punto inferior el LOQ y el punto superior el punto más alto de la curva de calibración.

Tabla 20. Intervalos de trabajo obtenidos

Isótopo	Límite inferior (ppb)	Límite superior (ppb)
⁷⁵ As	0.42	10.0
¹¹¹ Cd	0.35	10.0
²⁰² Hg	0.90	10.0
²⁰⁸ Pb	0.23	10.0

14.4. Sesgo

El sesgo se evalúa con el MRC de hígado de bovino el cual es un material para evaluar la precisión en métodos de análisis de tejidos animales y muestras biológicas.

Se pesaron 0.1090 g de MRC y al finalizar la digestión la disolución resultante se llevó a aproximadamente 10 mL con agua desionizada teniendo una masa final de 11.8622 g.

Los valores de concentración teóricos del MRC de acuerdo a la masa pesada y a la masa final de la disolución se calculan con la **ecuación 9**.

Ecuación 9:
$$\frac{0.1090 \text{ g}}{11.8622 \text{ g}} \times C. \text{ reportada del MRC} = C. \text{ teórica}$$

Usando la **ecuación 9** los valores teóricos son los siguientes.

Tabla 21. Concentración del analito reportada en el MRC y concentración calculada para la masa pesada

	C. reportada (ppb)	C. teórica (ppb)
As	19.60	0.180
Cd	97.00	0.891
Hg	5.36	0.049
Pb	62.80	0.577

La intensidad de los analitos, así como la concentración resultante usando las curvas de calibración en el MRC son las siguientes.

Tabla 22. Intensidad de los isótopos en el análisis y concentración asociada

	⁷⁵ As	¹¹¹ Cd	²⁰² Hg	²⁰⁸ Pb
Intensidad (cps)	604.326	5424.824	717.707	18500.482
C (ppb)	0.195	0.94	0.339	0.629

Con estos resultados se calcula el sesgo (%b) usando la **ecuación 3**.

Tabla 23. Sesgo en el análisis del MRC

Isótopo	%b
⁷⁵ As	8.16
¹¹¹ Cd	5.41
²⁰² Hg	589.03
²⁰⁸ Pb	9.01

Los resultados de sesgo indican qué tan aproximado fue el valor que se obtuvo experimentalmente contra el valor de referencia del MRC. En el caso del Hg se tiene un sesgo muy grande debido a que la concentración esperada está por debajo del LOD y debido a la sensibilidad de la técnica cualquier contaminación de Hg en la muestra que supere al LOD será leída por el instrumento.

14.5. Recobro

Para evaluar este parámetro se utilizó de nueva cuenta el MRC, pero esta vez usando la **ecuación 5**.

Tabla 24. Recobro obtenido

Isótopo	%R
⁷⁵ As	108.27
¹¹¹ Cd	105.46
²⁰² Hg	688.29
²⁰⁸ Pb	91.74

Para que un recobro sea aceptable éste debe estar entre 80 y 120%. Para el As, Cd y Pb se cumple este parámetro lo que significa que los resultados obtenidos de las muestras son confiables y se asegura que se obtiene una buena recuperación de los analitos durante todo el proceso del análisis.

Para el Hg ocurre lo mismo que en el sesgo, es decir, la concentración esperada en el MRC es más baja que el LOD calculado lo que significa que no se pueden esperar lecturas confiables en ese rango.

14.6. Precisión

La precisión es un parámetro que ayuda a evaluar el error entre mediciones de una muestra durante el análisis. Para evaluar este parámetro se necesita la desviación estándar relativa (Relative Standard Deviation por sus siglas en inglés %RSD) que es la medida de la variación entre las lecturas de una misma muestra respecto al promedio de sus mediciones. Los resultados deben de cumplir con un %RSD<10% debido a que así se garantiza que los resultados de las mediciones en una muestra no varían más allá del 10% y el error asociado entre cada medición no es significativo.

El %RSD para los 12 pares de muestras entre cordón y placenta y la muestra de MRC están por debajo del 10%.

Los %RSD de las muestras analizadas se presentan en la **Tabla 31** del **Anexo 2**.

14.7. Resultados de las muestras

De los pares de muestras analizadas se obtuvieron los siguientes resultados.

Para iniciar el cálculo de los resultados se restó la intensidad de cada blanco de digestión a su respectivo lote de muestras digeridas. Los lotes de cada digestión se muestran en el **Anexo 3**.

Con la intensidad neta calculada de cada muestra (**Anexo 4**) se utilizaron las ecuaciones lineales de las curvas de calibración para calcular la concentración de los isótopos en las muestras en unidades de concentración ppb ($\mu\text{g/L}$).

Con las concentraciones calculadas se utiliza la **Ecuación 10** para hacer la conversión de unidades de $\mu\text{g/L}$ a $\mu\text{g/g}$.

$$\text{Ecuación 10: } \text{Resultado} \frac{\mu\text{g}}{\text{L}} \times \frac{1\text{L}}{1\text{kg}} \times \frac{1\text{kg}}{1000\text{g}} \times \frac{\text{masa final (g)}}{\text{masa muestra (g)}} = \text{Resultado} \frac{\mu\text{g}}{\text{g}}$$

Los resultados reportados en ppb y $\mu\text{g/g}$ se presentan en el **Anexo 5** y una representación gráfica de los resultados se muestra a continuación.

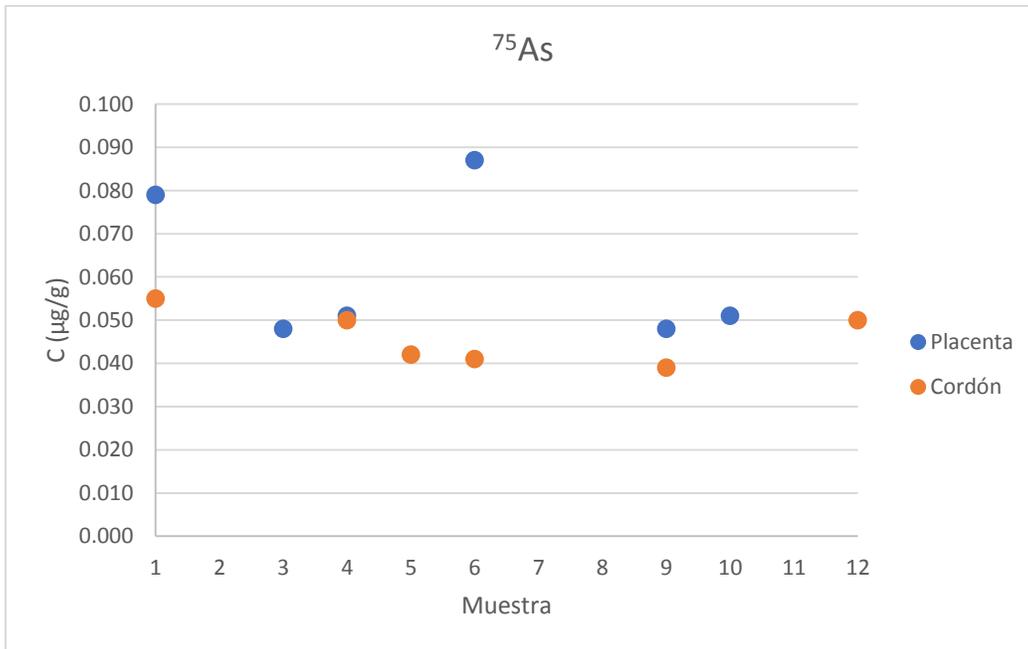


Figura 22. Distribución gráfica de los resultados en ^{75}As

Para el ^{75}As se observa que los tejidos acumulan a este isótopo siendo la placenta el que más lo acumula, esto puede interpretarse como la eficiencia de la placenta ante este isótopo para proteger al feto de su exposición. Para el caso de las muestras 2, 7 y 8 los tejidos de placenta y cordón tuvieron concentraciones menores al LOD lo que se interpreta como la baja exposición de los individuos analizados a este isótopo.

Los rangos de concentración del isótopo en los tejidos son los siguientes.

Tabla 25. Rangos de concentraciones para ^{75}As

^{75}As	
Tejido	Rango (µg/g)
Placenta	0.048-0.087
Cordón umbilical	0.039-0.055

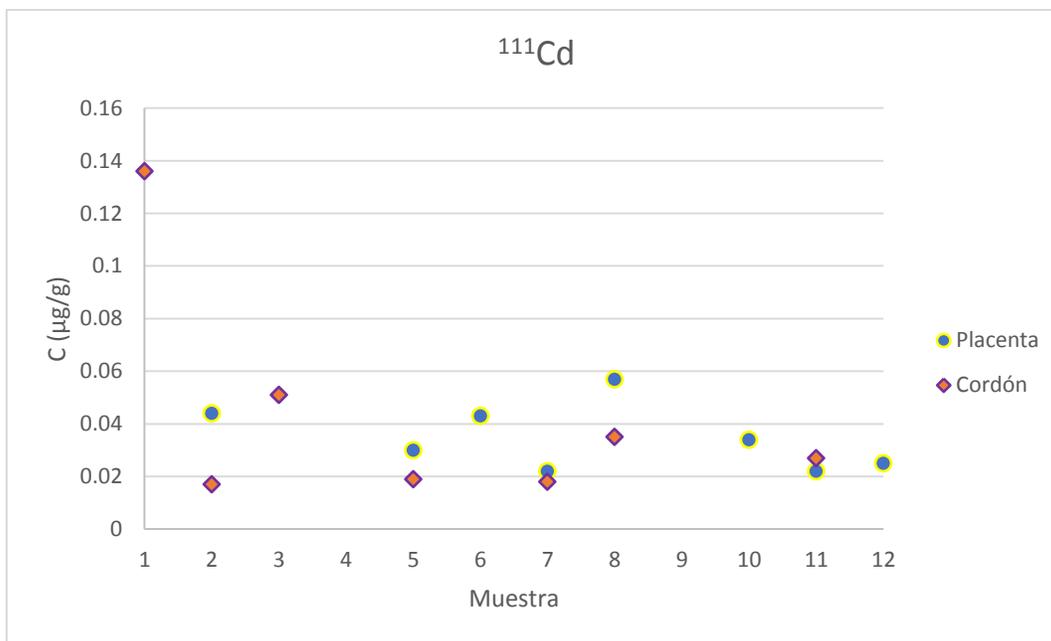


Figura 23. Distribución gráfica de los resultados en ^{111}Cd

Para el isótopo ^{111}Cd los resultados sugieren que los tejidos son una barrera efectiva, aunque es importante mencionar que cuando se tienen concentraciones altas de Cd en el organismo se activa la síntesis de la enzima llamada metalotioneína, la cual ayuda a expulsar al elemento del cuerpo. Para las muestras 4 y 9 se obtuvieron concentraciones por debajo del LOD.

Los rangos de concentración son los siguientes.

Tabla 26. Rangos de concentraciones para ^{111}Cd

^{111}Cd	
Tejido	Rango (µg/g)
Placenta	0.022-0.057
Cordón umbilical	0.017-0.136

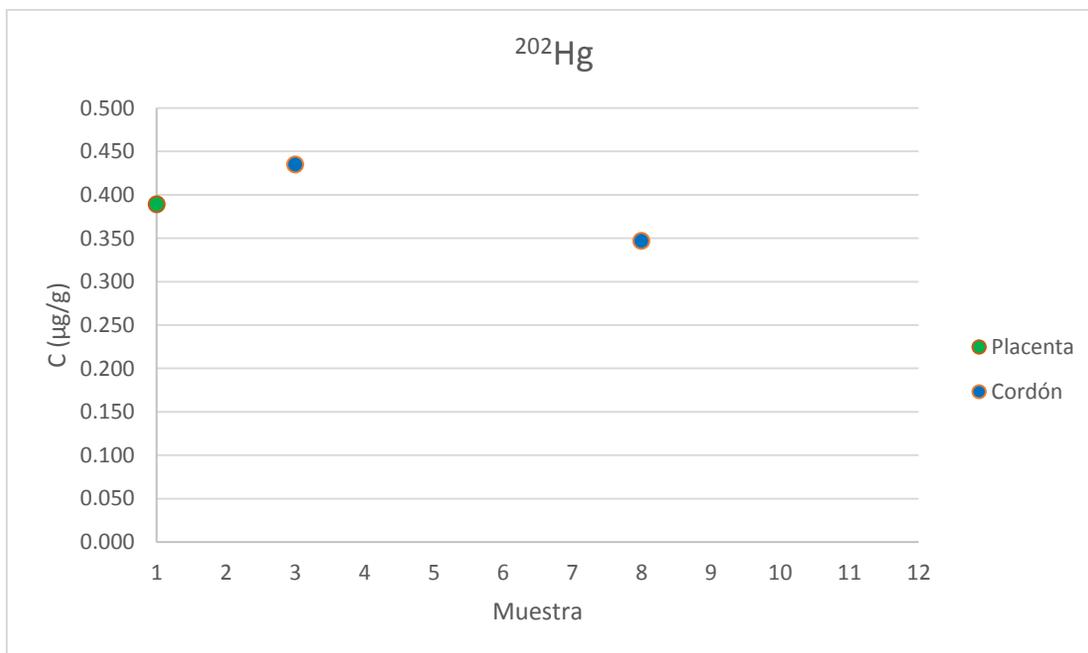


Figura 24. Distribución de los resultados en ^{202}Hg

Los resultados obtenidos en las muestras de cordón y placenta tuvieron valores por debajo del LOD excepto para las muestras 1, 3 y 8 sin embargo estos resultados no son confiables ya que los parámetros de validación de sesgo y recobro no fueron satisfactorios.

A pesar de esto, los resultados obtenidos pueden ser utilizados para caracterizar los tejidos y tener una idea de cómo éstos actúan ante la presencia de Hg en el cuerpo. Así se puede proponer la hipótesis de que al no existir concentraciones detectables en los tejidos estudiados éstos fueron permeables al Hg dejando pasar el elemento de la madre al feto o que no existió exposición a este isótopo durante el periodo de gestación. Para la placenta sólo una muestra presentó un valor de concentración superior al LOD por lo que no se presenta un rango de concentraciones.

Los rangos de concentración son los siguientes.

Tabla 27. Rangos de concentración para ^{202}Hg

^{202}Hg	
Tejido	Rango (µg/g)
Placenta	0.389*
Cordón umbilical	0.347-0.435

*Sólo se obtuvo un valor confiable para una muestra, por lo tanto, no se presenta un rango asociado

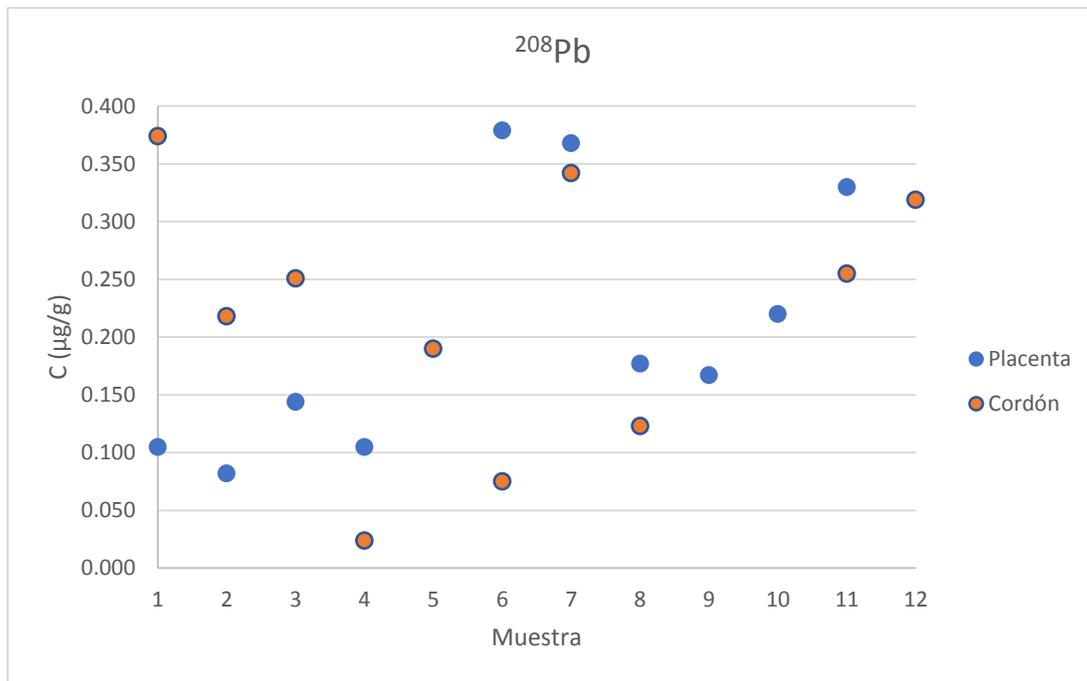


Figura 25. Distribución gráfica de los resultados en ^{208}Pb

Como se mencionó anteriormente, el Pb es el contaminante por excelencia, al que toda la población está expuesta debido a las diferentes fuentes de emisión como industria minera, quema de combustibles fósiles, entre otros.

En los tejidos estudiados prácticamente todas las muestras tuvieron Pb en concentraciones por arriba del LOD lo que significa que los individuos tuvieron una exposición alta al Pb durante la gestación. Es importante mencionar que el Pb se integra muy fácilmente a la sangre y a tejidos blandos lo que ocasiona la acumulación en tejidos debido al transporte en la sangre.

La efectividad de la barrera placentaria contra el Pb parecer ser alta ya que las concentraciones encontradas en este tejido son elevadas a comparación de los otros isótopos estudiados, igualmente para las muestras de cordón umbilical.

Los rangos de concentraciones obtenidos son los siguientes.

Tabla 28. Rangos de concentraciones para ^{208}Pb

^{208}Pb	
Tejido	Rango (µg/g)
Placenta	0.082-0.379
Cordón umbilical	0.024-0.374

La NOM-199-SSA1-2000 establece una concentración máxima de Pb en sangre de mujeres embarazadas y en periodo de lactancia en un valor de 5 µg/dL equivalente a 0.05 µg/g, las muestras analizadas superan este valor

En general los resultados obtenidos sugieren una alta exposición a As, Cd, Hg y Pb durante el periodo de gestación y debido a que las vías metabólicas de eliminación de sustancias tóxicas apenas se están desarrollando en el feto, la acumulación de elementos potencialmente tóxicos aumenta dando como resultado daños a nivel genético.

A continuación, se comparan los rangos de concentración obtenidos con dos trabajos internacionales reportados en años anteriores con sangre de cordón umbilical y placenta como tejidos estudiados.

Tabla 29. Comparación de resultados obtenidos con resultados reportados internacionalmente

Isótopo	Rangos obtenidos (µg/g)		Rangos reportados (µg/g)	
	<i>Placenta</i>	<i>Cordón umbilical</i>	<i>Placenta</i> ⁶	<i>Sangre de cordón umbilical</i> ⁷
⁷⁵ As	0.048-0.087	0.039-0.087	0.006-0.013	No estudiado
¹¹¹ Cd	0.022-0.057	0.017-0.136	0.002-0.005	0.03-0.05
²⁰² Hg	0.389	0.347-0.435	0.001-0.004	0.16-0.29
²⁰⁸ Pb	0.082-0.379	0.024-0.374	0.009-0.028	0.12-0.22

Los resultados obtenidos en las placentas analizadas son mayores que los reportados por Osada *et al* en 2002, de igual forma es un buen punto comparativo ya que la metodología reportada en el artículo es similar a la de este proyecto.

Los resultados obtenidos en cordón umbilical no tienen un estudio comparativo internacional, pero existen resultados publicados por Chem *et al* en 2014 con una matriz de estudio semejante: sangre de cordón umbilical. La comparación de resultados sugiere que el cordón umbilical retiene a los elementos estudiados mientras que la sangre es poco afín a éstos.

⁶ Osada, H., Watanabe, Y., Nishimura, Y., Yukawa, M., Seki, K., Sekiya, S. (2002). Profile of trace element concentrations in the feto-placental unit in relation to fetal growth. *Acta Obstetricia et gynecologica Scandinavica*.(81) pp: 931-937

⁷ Chem, Z., Myers, R., Wei, T., Bind, E., Kassim, P., Wang, G., Ji, Y., Hong, X., Caruso, D., Bartell, T., Gong, Y., Strickland, P., Navas-Acien, A., Guallar, E., Wang, X. (2014). Placental transfer and concentrations of cadmium, mercury, lead and selenium in mothers, newborns and young children. *J Expo Schi Environ Epidemio*. 24(5) pp: 537-544

15. CONCLUSIONES

15.1. Sobre la validación del método

Se desarrolló e implementó una metodología de análisis para determinar los isótopos ^{75}As , ^{111}Cd , ^{202}Hg y ^{208}Pb en tejidos (placenta y cordón umbilical) por medio de ICP-MS con previa digestión de muestras en horno de microondas.

Se evaluaron los parámetros de validación de intervalo de trabajo, LOD, LOQ, sensibilidad, sesgo, precisión y recobro.

- Los intervalos de trabajo mostrados en la **Tabla 20** presentaron una relación lineal mayor a 0.995 para todos los analitos, por lo tanto estos intervalos son linealmente aceptables.
- El LOD y LOQ obtenidos son altos para la técnica de análisis debido a los parámetros de trabajo utilizados en el equipo. Los LOD obtenidos son semejantes a los reportados en artículos internacionales mostrados en la **Tabla 4**.
- La sensibilidad de la técnica para determinar a los isótopos estudiados es alta debido a los valores que se obtienen en las pendientes de las curvas de calibración.
- Se evaluó el sesgo usando un MRC de hígado de bovino y los porcentajes calculados son favorables para los isótopos ^{75}As , ^{111}Cd y ^{208}Pb ya que se encuentran por debajo de 10% excepto por el ^{202}Hg , esto debido a que la concentración esperada se encuentra por debajo del LOD.
- Se evaluó el recobro usando MRC y se obtuvo un %R satisfactorio para los isótopos ^{75}As , ^{111}Cd y ^{208}Pb excepto para el ^{202}Hg el cual fue insatisfactorio ya que la concentración esperada en el MRC era menor al LOD.
- La precisión del método se evaluó utilizando los %RSD de cada muestra y todos los porcentajes obtenidos tienen un valor <10% lo que significa que las variaciones entre las mediciones de una misma muestra no varían más allá del 10%.
- La selectividad del método no se evaluó directamente, pero al no tener presencia de interferencias de algún tipo durante el estudio se concluye que la técnica para este análisis es selectiva para los cuatro isótopos estudiados a pesar de que el ^{202}Hg falló en los parámetros de sesgo y recobro.

La metodología desarrollada en este trabajo presenta parámetros de validación satisfactorios para ^{75}As , ^{111}Cd y ^{208}Pb . En el caso del isótopo ^{202}Hg la validación no es satisfactoria.

15.2. Sobre las muestras analizadas

Los resultados obtenidos muestran que la placenta es un órgano efectivo para impedir el paso de elementos como el As, Cd y Pb.

Para el Pb analizado en las muestras de placenta y cordón umbilical la concentración del ^{208}Pb están por arriba de la concentración máxima establecida por la NOM-199-SSA1-2000, estas concentraciones pueden servir para tener un panorama muy amplio sobre la exposición de la población en edad gestacional al Pb.

A nivel nacional solamente se mantiene vigente la norma para Pb en sangre por lo que puede considerarse trabajar en normas para cuantificar otros EPT en tejidos.

Para el Hg los resultados no fueron satisfactorios debido a que la validación falló para el isótopo ^{202}Hg , sin embargo, los resultados obtenidos pueden ser usados para caracterizar a los tejidos y en este caso, al no haber presencia detectable de ^{202}Hg en los tejidos analizados se puede concluir que la placenta y el cordón umbilical no son órganos que representen una barrera efectiva contra el Hg o que no existió exposición al isótopo durante la etapa gestacional.

Los rangos de concentraciones obtenidos en este trabajo son mayores a los reportados en otros trabajos internacionales, es normal que no coincidan o se aproximen ya que se trata del estudio de distintas poblaciones en diferentes zonas geográficas, esto funciona como punto de comparación ya que hasta la fecha no se han reportado trabajos similares a nivel nacional, es importante empezar a tener bancos de información sobre la concentración de EPT en tejidos humanos ya que así se pueden desarrollar normas para poder controlar las emisiones de contaminantes y así disminuir el grado de exposición.

16. APORTACIONES

El presente trabajo puede considerarse como un preámbulo para iniciar el planteamiento de normas oficiales que estandaricen las concentraciones de EPT en tejidos con el fin de iniciar controles a la exposición de la población especialmente cuando están en etapa vulnerable como en la gestación, infancia y senectud, además los resultados obtenidos en este trabajo funcionan como un panorama general a la exposición que tiene la población vulnerable a los EPT.

17. RECOMENDACIONES

Debido a que se obtuvieron LOD y LOQ altos para los que se obtienen en ICP-MS se recomienda pesar más muestra para poder ampliar la concentración esperada.

Ajustar el flujo del nebulizador a un valor más bajo al establecido para poder bajar los LOD y LOQ.

Para que la validación sea exitosa para el ^{202}Hg se puede pesar más MRC y muestras de cordón umbilical y placenta, así aumenta el valor de la concentración teórica del elemento para que ésta sea mayor al LOD y obtener un sesgo y recobro satisfactorios.

Se puede acoplar el ICP-MS a un generador de hidruros para poder analizar de forma más específica al ^{202}Hg .

18. ANEXO 1. Curvas de calibración y residuales

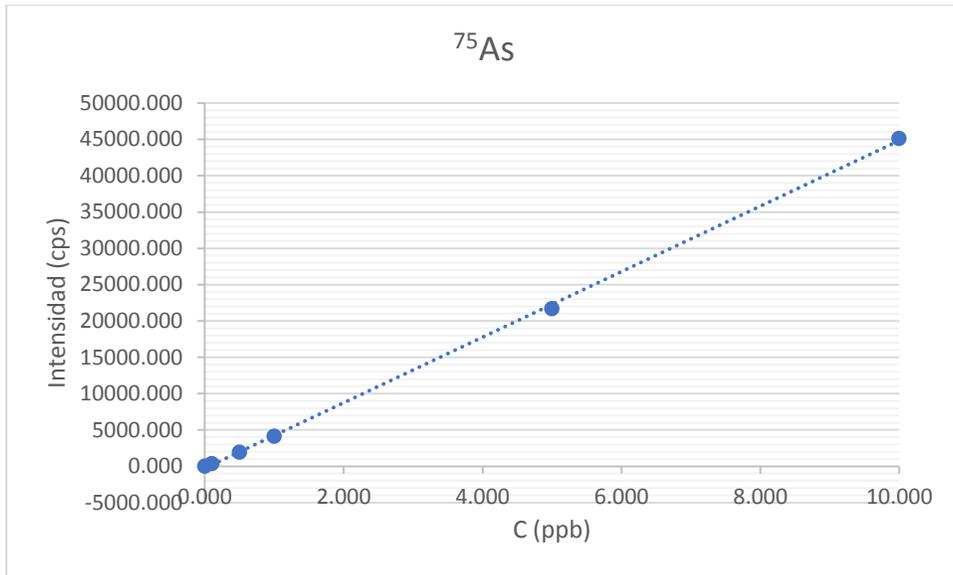


Figura 26. Curva de calibración ^{75}As

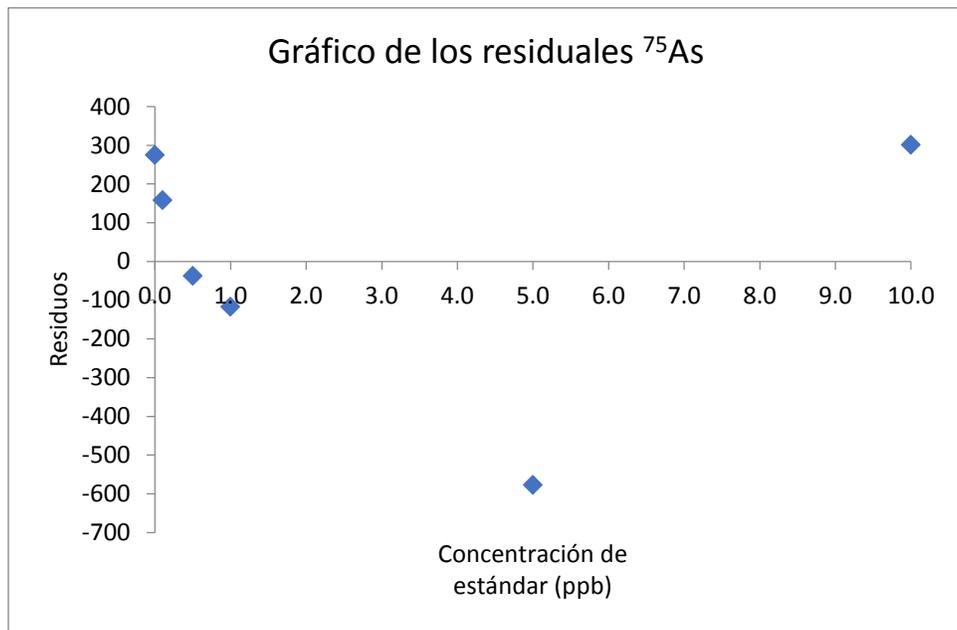


Figura 27. Gráfico de residuales de ^{75}As

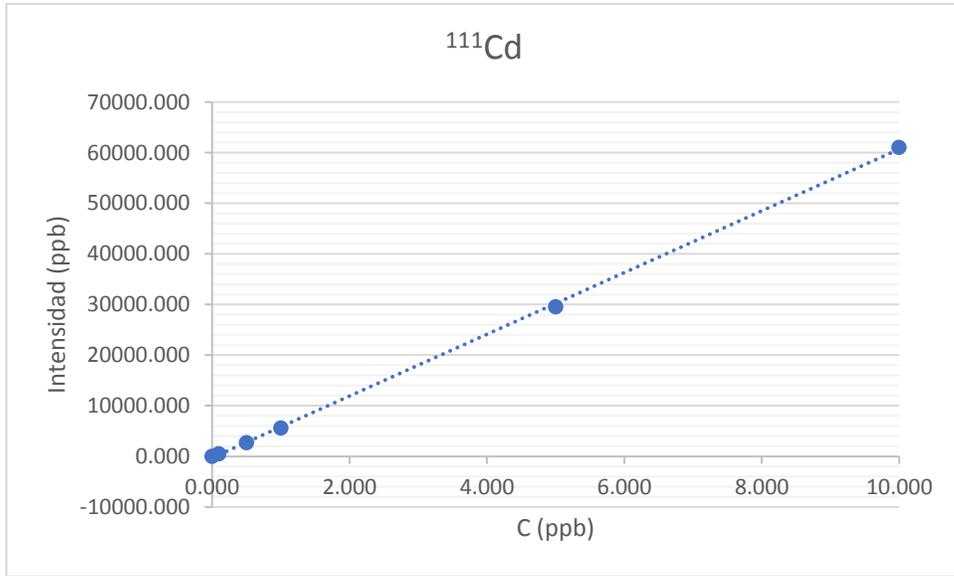


Figura 28. Curva de calibración ¹¹¹Cd

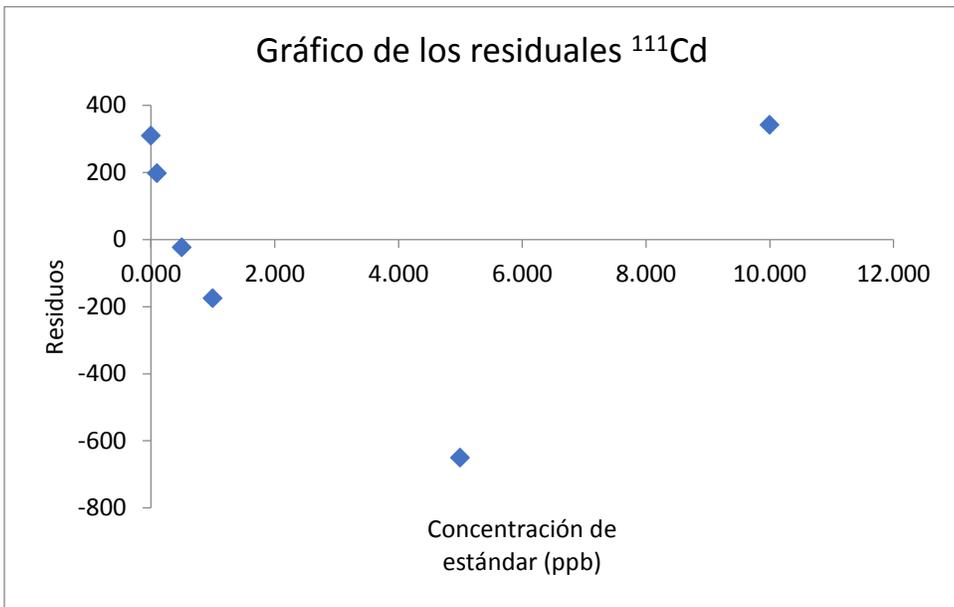


Figura 29. Gráfico de residuales de ¹¹¹Cd

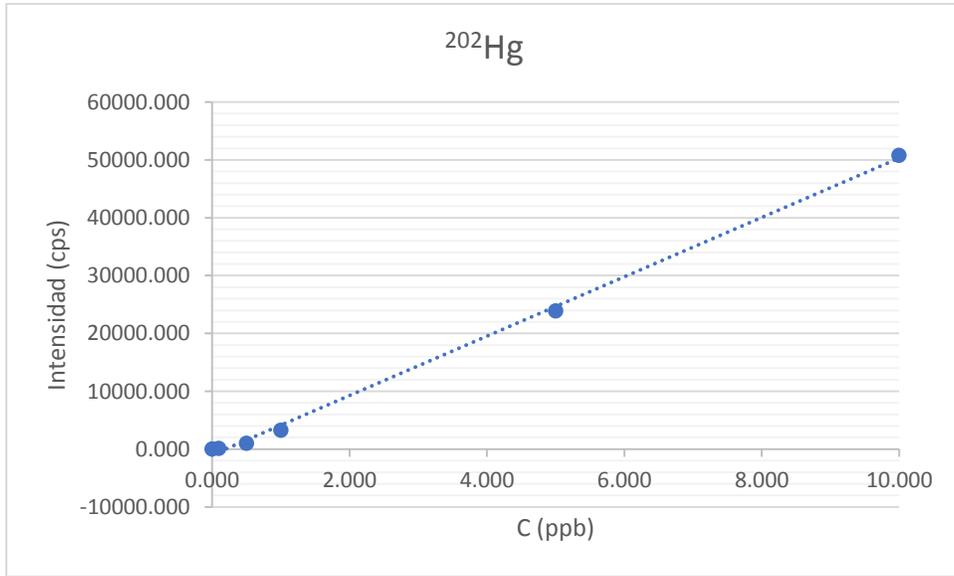


Figura 30. Curva de calibración ²⁰²Hg

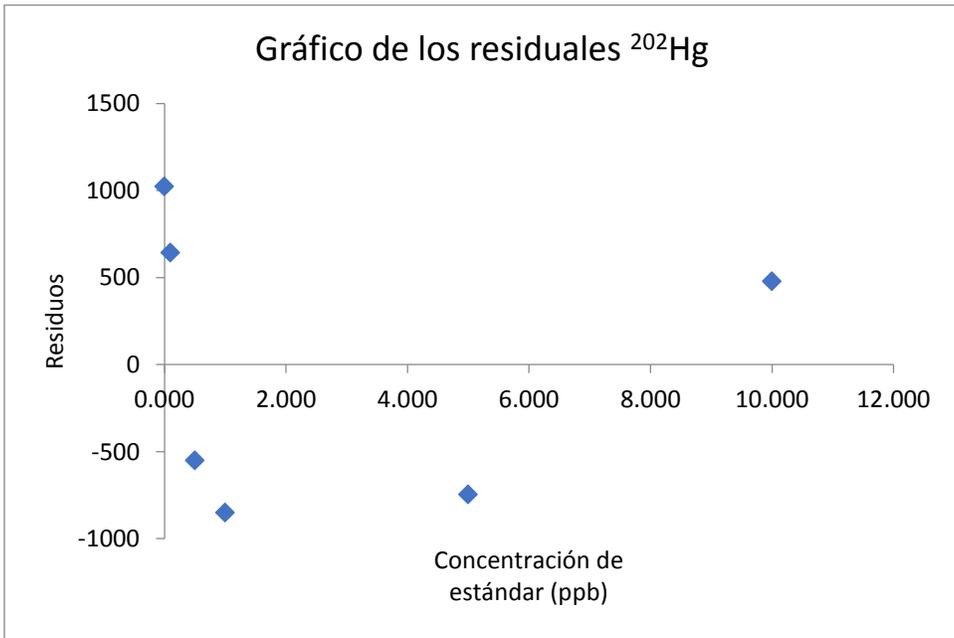


Figura 31. Gráfico de residuales de ²⁰²Hg

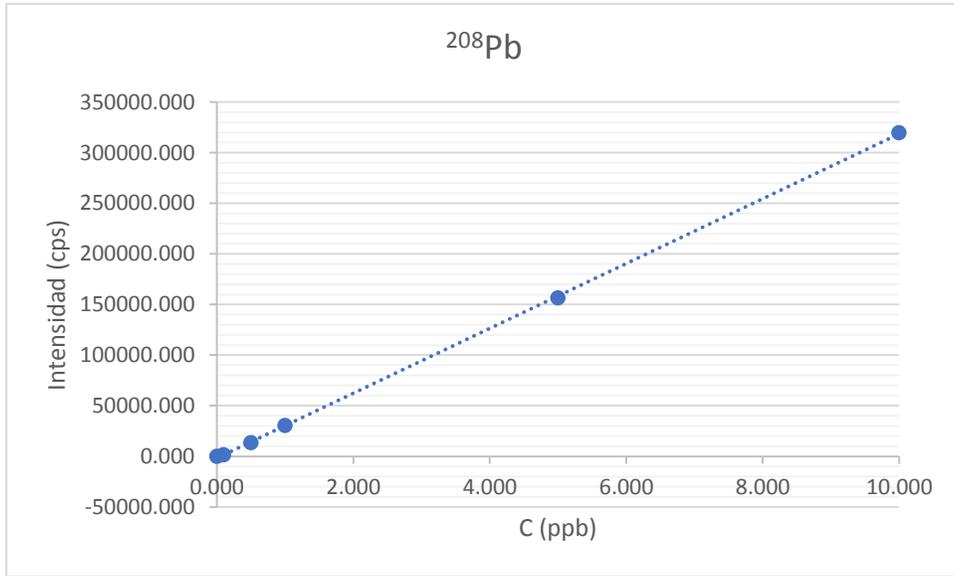


Figura 32. Curva de calibración ^{208}Pb

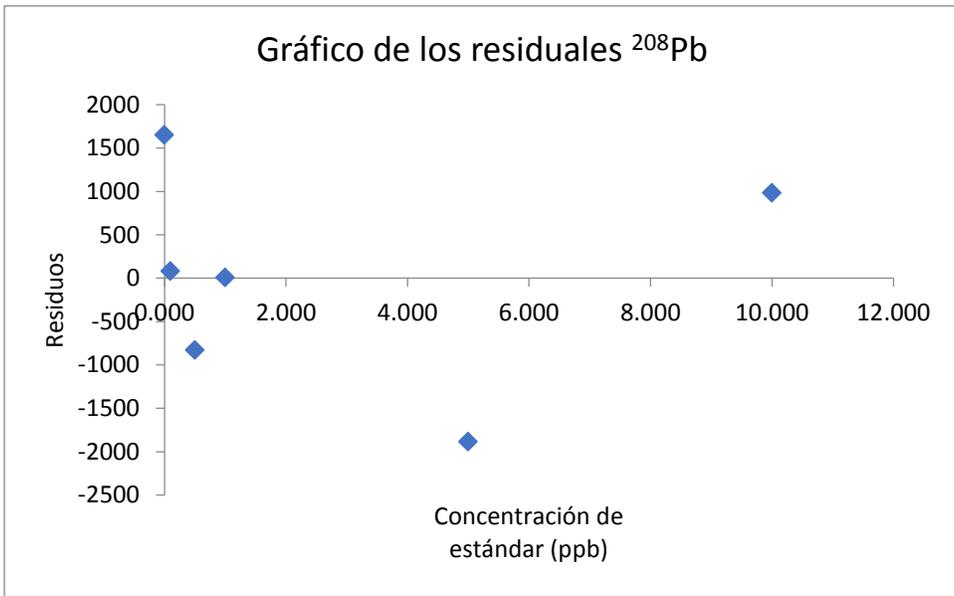


Figura 33. Gráfico de residuales de ^{208}Pb

19. ANEXO 2. %RSD de las muestras analizadas

Tabla 30. %RSD de las muestras

<i>Par</i>	Muestra	Tipo	%RSD ⁷⁵As	%RSD ¹¹¹Cd	%RSD ²⁰²Hg	%RSD ²⁰⁸Pb
1	10660	Placenta	2.9%	1.1%	1.7%	1.2%
	10661	Cordón	2.3%	6.1%	0.8%	0.4%
2	12680	Placenta	5.5%	5.5%	1.0%	2.4%
	12681	Cordón	4.7%	4.1%	3.4%	3.7%
3	12730	Placenta	4.6%	2.3%	2.9%	2.9%
	12731	Cordón	1.5%	3.7%	1.7%	1.9%
4	13360	Placenta	2.4%	1.9%	3.7%	1.7%
	13361	Cordón	0.9%	6.6%	3.1%	1.8%
5	13740	Placenta	1.3%	2.5%	3.5%	1.6%
	13741	Cordón	2.2%	5.8%	0.8%	2.2%
6	14140	Placenta	4.4%	2.3%	1.6%	1.3%
	14141	Cordón	2.1%	6.0%	1.1%	0.8%
7	14690	Placenta	3.2%	1.8%	1.7%	0.5%
	14691	Cordón	4.9%	1.5%	1.1%	2.5%
8	14770	Placenta	3.6%	3.1%	2.4%	0.3%
	14771	Cordón	1.5%	1.3%	1.3%	1.4%
9	14820	Placenta	2.2%	2.1%	2.2%	0.5%
	14821	Cordón	1.0%	3.1%	1.1%	1.4%
10	14940	Placenta	2.6%	0.6%	2.9%	0.2%
	14941	Cordón	4.0%	4.9%	0.9%	2.2%
11	16310	Placenta	1.8%	3.6%	2.2%	0.9%
	16311	Cordón	0.8%	0.5%	4.4%	2.9%
12	16880	Placenta	1.3%	0.8%	4.5%	0.3%
	16881	Cordón	3.3%	4.9%	2.1%	2.2%
<i>MRC</i>	Std 1577c	Hígado	1.3%	1.2%	4.6%	1.3%

20. ANEXO 3. Lotes de digestión de las muestras y la intensidad en cps obtenidas

Tabla 31. Lote 1

Muestra	Tipo	⁷⁵ As (cps)	¹¹¹ Cd (cps)	²⁰² Hg (cps)	²⁰⁸ Pb (cps)
Blanco 1	Blanco 1	960.369	293.003	1506.104	3856.413
14771	Cordón	2008.5	1806.1	15613.2	7029.1
12731	Cordón	1427.4	1918.8	14222.4	8642.7
10661	Cordón	2672.6	6642.2	1671.8	13340.0

Tabla 32. Lote 2

Muestra	Tipo	⁷⁵ As (cps)	¹¹¹ Cd (cps)	²⁰² Hg (cps)	²⁰⁸ Pb (cps)
Blanco 2	Blanco 2	1126.382	516.676	2785.636	1826.437
13360	Placenta	2997.0	477.3	1222.7	4823.9
14820	Placenta	3004.3	1123.0	1432.1	6997.8
12730	Placenta	2982.0	923.0	794.4	6212.2
13360	Placenta	2997.0	477.3	1222.7	4823.9

Tabla 33. Lote 3

Muestra	Tipo	⁷⁵ As (cps)	¹¹¹ Cd (cps)	²⁰² Hg (cps)	²⁰⁸ Pb (cps)
Blanco 3	Blanco 3	542.346	140.667	1606.775	4099.055
16310	Placenta	1698.4	1097.4	749.4	13738.5
10660	Placenta	3131.7	513.3	16548.6	6630.7
14770	Placenta	1728.1	2632.6	1537.1	8489.3
12680	Placenta	2041.5	2397.5	591.3	6432.5

Tabla 34. Lote 4

Muestra	Tipo	⁷⁵ As (cps)	¹¹¹ Cd (cps)	²⁰² Hg (cps)	²⁰⁸ Pb (cps)
Blanco 4	Blanco 4	438.008	145.667	1164.727	4139.952
14141	Cordón	2139.5	354.0	2356.9	6549.7
16880	Placenta	1565.8	1136.7	973.4	46449.2
14140	Placenta	3485.1	2057.5	2551.6	14246.2

Tabla 35. Lote 5

<i>Muestra</i>	Tipo	⁷⁵ As (cps)	¹¹¹ Cd (cps)	²⁰² Hg (cps)	²⁰⁸ Pb (cps)
<i>Blanco 5</i>	Blanco 5	600.015	206.668	1668.116	8555.526
<i>14690</i>	Placenta	1976.5	1101.0	2355.2	18822.5
<i>14691</i>	Cordón	1381.7	880.4	2023.8	18032.9
<i>13740</i>	Placenta	2062.1	1380.1	1644.8	7104.6
<i>14940</i>	Placenta	2580.2	1948.8	2898.0	15352.0

Tabla 36. Lote 6

<i>Muestra</i>	Tipo	⁷⁵ As (cps)	¹¹¹ Cd (cps)	²⁰² Hg (cps)	²⁰⁸ Pb (cps)
<i>Blanco 6</i>	Blanco 6	371.673	101.000	1286.073	5520.349
<i>14941</i>	Cordón	1675.4	449.3	2961.3	6481.7
<i>16311</i>	Cordón	1441.4	1179.4	2260.8	12292.2
<i>12681</i>	Cordón	1703.8	840.0	2048.5	12473.6

Tabla 37. Lote 7

<i>Muestra</i>	Tipo	⁷⁵ As (cps)	¹¹¹ Cd (cps)	²⁰² Hg (cps)	²⁰⁸ Pb (cps)
<i>Blanco 7</i>	Blanco 7	245.336	108.667	1071.052	1478.846
<i>13741</i>	Cordón	1906.5	979.7	1526.4	7558.0
<i>16881</i>	Cordón	2014.8	295.7	2541.6	10525.1
<i>14821</i>	Cordón	2056.1	387.7	1813.8	1848.1
<i>13361</i>	Cordón	2508.9	368.0	1551.1	2170.6
<i>Std 1577c</i>	Hígado	849.662	5533.491	1788.759	19979.328

21. ANEXO 4. Intensidad neta de las muestras analizadas

Tabla 38. Intensidad neta

Par	Muestra	Tipo	⁷⁵ As (cps)	¹¹¹ Cd (cps)	²⁰² Hg (cps)	²⁰⁸ Pb (cps)
1	10660	Placenta	2589.331	372.675	14941.805	2531.630
	10661	Cordón	1712.214	6349.207	165.660	9483.595
2	12680	Placenta	1499134	2256.867	-1015.43	2333.407
	12681	Cordón	1332.096	739.024	762.408	6953.272
3	12730	Placenta	1855.597	406.354	-1991.282	4385.783
	12731	Cordón	467.036	1625.793	12716.307	4786.282
4	13360	Placenta	1870.599	-39.335	-1562.917	2997.414
	13361	Cordón	2263.551	259.338	480.032	691.77
5	13740	Placenta	1462.134	1173.398	-23.355	-1450.938
	13741	Cordón	1661.124	871.033	455.363	6079.2
6	14140	Placenta	3047.084	1911.814	1386.834	10106.248
	14141	Cordón	1701.485	208.337	1192.134	2409.774
7	14690	Placenta	1376.455	894.374	687.078	10267.003
	14691	Cordón	781.719	673.692	355.694	9477.363
8	14770	Placenta	1185.759	2491.909	-69.692	4390.207
	14771	Cordón	1048.105	1513.111	14107.091	3172.698
9	14820	Placenta	1877.934	606.368	-1353.565	5171.389
	14821	Cordón	1810.812	279.005	742.73	369.3
10	14940	Placenta	1980.218	1742.131	1229.845	6796.481
	14941	Cordón	1303.759	348.34	1675.234	961.377
11	16310	Placenta	1156.089	956.708	-857.422	9639.483
	16311	Cordón	1069.733	1078.382	974.773	6771.831
12	16880	Placenta	1127.744	991.044	-191.361	42309.274
	16881	Cordón	1769.473	187.003	1470.507	9046.26

22. ANEXO 5. Concentraciones reportadas en ppb ($\mu\text{g/L}$) y $\mu\text{g/g}$. (<LOD es un resultado obtenido menor al LOD)

Par	Muestra	Masa muestra (g)	Masa final (g)	Tipo	⁷⁵ As (ppb)	¹¹¹ Cd (ppb)	²⁰² Hg (ppb)	²⁰⁸ Pb (ppb)	⁷⁵ As ($\mu\text{g/g}$)	¹¹¹ Cd ($\mu\text{g/g}$)	²⁰² Hg ($\mu\text{g/g}$)	²⁰⁸ Pb ($\mu\text{g/g}$)
1	10660	0.0948	11.854	Placenta	0.63	<LOD	3.11	0.842	0.079	<LOD	0.389	0.105
	10661	0.0962	11.9538	Cordón	0.44	1.09	<LOD	3.013	0.055	0.136	<LOD	0.374
2	12680	0.1132	11.8331	Placenta	<LOD	0.42	<LOD	0.780	<LOD	0.044	<LOD	0.082
	12681	0.1198	11.7689	Cordón	<LOD	0.17	<LOD	2.223	<LOD	0.017	<LOD	0.218
3	12730	0.1159	11.7858	Placenta	0.47	<LOD	<LOD	1.421	0.048	<LOD	<LOD	0.144
	12731	0.0736	11.953	Cordón	<LOD	0.32	2.68	1.546	<LOD	0.051	0.435	0.251
4	13360	0.1109	11.783	Placenta	0.48	<LOD	<LOD	0.987	0.051	<LOD	<LOD	0.105
	13361	0.1332	11.8076	Cordón	0.56	<LOD	<LOD	0.267	0.050	<LOD	<LOD	0.024
5	13740	0.0944	11.6025	Placenta	<LOD	0.24	<LOD	<LOD	<LOD	0.030	<LOD	<LOD
	13741	0.121	11.8222	Cordón	0.43	0.19	<LOD	1.950	0.042	0.019	<LOD	0.190
6	14140	0.0997	11.7723	Placenta	0.74	0.36	<LOD	3.207	0.087	0.043	<LOD	0.379
	14141	0.1245	11.6707	Cordón	0.44	<LOD	<LOD	0.804	0.041	<LOD	<LOD	0.075
7	14690	0.104	11.7497	Placenta	<LOD	0.20	<LOD	3.257	<LOD	0.022	<LOD	0.368
	14691	0.1048	11.8975	Cordón	<LOD	0.16	<LOD	3.011	<LOD	0.018	<LOD	0.342
8	14770	0.096	11.9377	Placenta	<LOD	0.46	<LOD	1.422	<LOD	0.057	<LOD	0.177
	14771	0.1004	11.8335	Cordón	<LOD	0.30	2.95	1.042	<LOD	0.035	0.347	0.123
9	14820	0.1186	11.9072	Placenta	0.48	<LOD	<LOD	1.666	0.048	<LOD	<LOD	0.167
	14821	0.1374	11.7183	Cordón	0.46	<LOD	<LOD	<LOD	0.039	<LOD	<LOD	<LOD
10	14940	0.1158	11.7359	Placenta	0.50	0.34	<LOD	2.174	0.051	0.034	<LOD	0.220
	14941	0.1086	11.8096	Cordón	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
11	16310	0.1104	11.8994	Placenta	<LOD	0.21	<LOD	3.061	<LOD	0.022	<LOD	0.330
	16311	0.1000	11.752	Cordón	<LOD	0.23	<LOD	2.166	<LOD	0.027	<LOD	0.255
12	16880	0.0987	11.7869	Placenta	<LOD	0.21	<LOD	13.262	<LOD	0.025	<LOD	1.584
	16881	0.1066	11.8076	Cordón	0.45	<LOD	<LOD	2.876	0.050	<LOD	<LOD	0.319

23. REFERENCIAS

1. Cotton, F. A., Wilkinson, G. (3°). (1999). *Advanced Inorganic Chemistry: A Comprehensive Text*. EUA: Interscience Publishers
2. The Merck Index. Recuperado de <https://www.rsc.org/Merck-Index/>
3. Bautista, F. (1999) *Introducción al estudio de la contaminación del suelo por metales pesados*. México: Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán
4. Klaassen, C.D., Watkins III, J.B. (5°). (2001). *Manual de Toxicología: La ciencia básica de los tóxicos*. EUA: McGraw-Hill Interamericana
5. Environmental Protection Agency. *Integrate Risk Information System (IRIS)*. United States of America. Recuperado de: https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/subst/0141_summary.pdf
6. Environmental Protection Agency. *Integrate Risk Information System (IRIS)*. United States of America. Recuperado de: https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/subst/0370_summary.pdf
7. Ramírez. J.S. (2006). *Liofilización de alimentos*. Cali: Universidad del Valle Cali, Colombia
8. Jennings, T.A. (2002). *Lyophilization: introduction and basic principles*. Boca Raton, Florida: Interpharm.
9. Taylor, H.E. (2001). *Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry: Practices and Techniques*. San Diego: Academic Press
10. Thomas, R. (2001). *A Beginner's Guide to ICP-MS*.
11. Morillas, P.P. (2016). Guía Eurachem: *La adecuación al uso de los métodos analíticos, una guía de laboratorio para validación de métodos y temas relacionados*. España: Eurolab
12. Miller, J.N., Miller, J.M. (2002). *Estadística y quimometría para Química Analítica*. Madrid: Pearson Educación
13. Carlson, B.M. (5°). (2014). *Embriología humana y biología del desarrollo*. México: Elsevier
14. Baeza Hernández, M.G. (2005). *Validación de un método de digestión ácida en horno de microondas para la cuantificación de selenio por absorción atómica en materia prima y fluido ruminal*. (Tesis de Licenciatura, UNAM). Recuperado de: <http://132.248.9.195/pd2007/0616918/Index.html>
15. Baranowska, I. (1992). Lead and cadmium in human placentas and maternal neonatal blood (in a heavily polluted area) measured by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Environmental Medicine*. (52) pp: 229-223
16. Al-Saleh, I., Shinwari, N., Mashhour, A., El Din Mohamed, G., Rabah, A. (2011). Heavy metals (lead, cadmium and mercury) in maternal, cord blood and placenta of healthy women. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. (214) pp: 79-101

17. Sakamoto, M., Yasutake, A., Domingo, J.L., Man Chan, H., Kubota, M., Murata, K. (2013). Relationships between trace element concentrations in chorionic tissue of placenta and umbilical cord tissue: Potential use as indicators for prenatal exposure. *Environment International*. (60) pp: 106-111.
18. Kozikowska, I., et al. (2013). Mercury concentrations in human placenta, umbilical cord, cord blood and amniotic fluid and their relations with body parameters of newborns. *Environmental Pollution*. (182) pp: 256-262
19. Castro-Bedriñana, J., Chirinos-Peinado, D., Ríos-Ríos, E. (2013). Niveles de plomo en gestantes neonatos en la ciudad de La Oroya, Perú. *Revista Peruana Médica Experta en Salud Pública*. 30(3) pp: 393-398
20. Kim, Y., et al. (2015). Biomonitoring of lead, cadmium, total mercury and methylmercury levels in maternal blood and in umbilical cord blood at birth in South Korea. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. (12) pp: 13482-13493
21. D'Ilio, S., Majorani, C., Petrucci, F., Violante, N., Senofonic, O. (2010). Method validation for the quantification of As, Cd, Hg and Pb in blood by ICP-MS monitoring purposes. *Analytical Methods*. (2) pp: 2049-2054
22. Kippler, M., Waheedul Houque, A.M., Raqib, R., Ohrvik, H., Ekstrom, E., Vahter, M. (2010). Accumulation of cadmium in human placenta interacts with the transport of micronutrients to the fetus. *Toxicology Letters*. (192) pp: 162-168
23. Guo, Y., Huo, X., Li, Y., Wu, K., Liu, J., Huang, J., Zheng, G., Xiao, Q., Wang, Y., Chen, A., Xu, X. (2010). Monitoring of lead, cadmium, chromium and nickel in placenta from an e-waste recycling town in China. *Science of the total environment*. (408) pp: 3113-3117
24. Chem, Z., Myers, R., Wei, T., Bind, E., Kassim, P., Wang, G., Ji, Y., Hong, X., Caruso, D., Bartell, T., Gong, Y., Strickland, P., Navas-Acien, A., Guallar, E., Wang, X. (2014). Placental transfer and concentrations of cadmium, mercury, lead and selenium in mothers, newborns and young children. *J Expo Schi Environ Epidemiol*. 24(5) pp: 537-544
25. Gilman, C., Soon, R., Sauvage, L., Ralston, N., Berry, M. (2015). Umbilical cord blood and placental mercury, selenium and selenoprotein expression in relation to maternal fish consumption. *Journal of trace elements in medicine and biology*. (30) pp: 17-24
26. Gundacker, C., Frölich, S., Graf-Rohrmeister, K., Eibenberger, B., Jessenig, V., Gicic, D., Prinz, S., Wittman, K., Zeisler, H., Vallant, B., Pollak, A., Husslein, P. (2010). Perinatal lead and mercury exposure in Austria. *Science of the total environment*. (408) pp: 5744-5749
27. Harrington, J., Young, D., Fry, R., Weber, F., Summer, S., Levine, K. (2011). Validation of a metallomics analysis of placenta tissue by ICP-MS. *Biological trace elements research*. pp: 1-10
28. Jin, L., Zhang, L., Li, Z., Liu, J., Ye, R., Ren, A. (2013). Placental concentrations of mercury, lead, cadmium and arsenic and the risk of neural

- tube defects in a Chinese population. *Reproductive toxicology*. (35) pp: 25-31
29. Osada, H., Watanabe, Y., Nishimura, Y., Yukawa, M., Seki, K., Sekiya, S. (2002). Profile of trace element concentrations in the feto-placental unit in relation to fetal growth. *Acta Obstetrica et gynecologica Scandinavica*. (81) pp: 931-937
 30. NOM-199-SSA1-2000. Salud Ambiental. Niveles de plomo en sangre y acciones como criterios para proteger la salud de la población expuesta no ocupacionalmente.
 31. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, Comisión de control analítico y ampliación de cobertura. *Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos*. 2011. Ciudad de México, México.