



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ANÁLISIS DE ELEMENTOS PRESENTES EN MUESTRAS DE HÍGADO DE
RATA EN CONDICIONES DE FIBROSIS HEPÁTICA USANDO
ESPECTROSCOPÍA DE EMISIÓN ATÓMICA CON PLASMA ACOPLADO
INDUCTIVAMENTE

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUIMICA

PRESENTA

LEILANIE ESPINOSA FERREIRO



Cd. Mx.

AÑO 2019



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: MÁRQUEZ HERRERA CIRO ELISEO

VOCAL: Profesor: PAZ DÍAZ BLANCA

SECRETARIO: Profesor: GUTIERREZ FLORES SELENA

1er. SUPLENTE: Profesor: ROSALES CÉSAR MIGUEL ANGEL

2° SUPLENTE: Profesor: HERNANDEZ MENDOZA ILSE IRENE

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO 208 Y 209 EDIFICIO "D" DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA
QUÍMICA METALÚRGICA. FACULTAD DE QUÍMICA UNAM**

ASESOR DEL TEMA:

MÁRQUEZ HERRERA CIRO ELISEO

SUSTENTANTE:

ESPINOSA FERREIRO LEILANIE

ÍNDICE DE CONTENIDO

PORTADA.....	1
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	5
ÍNDICE DE TABLAS	7
ÍNDICE DE FIGURAS	8
1 MARCO TEÓRICO: HÍGADO.....	11
1.1 CARACTERÍSTICAS Y GENERALIDADES.....	11
1.2 LÓBULOS Y SEGMENTOS.....	12
1.2.1 <i>Nomenclatura de Couinaud.</i>	12
1.2.2 <i>Anatomía del hígado de rata con respecto al humano.</i>	12
1.3 FIBROSIS HEPÁTICA.....	14
1.3.1 <i>Descripción de la enfermedad.</i>	14
1.3.2 <i>Cirrosis en México.</i>	16
1.3.3 <i>Estudios preliminares de contenido de elementos en hígado.</i>	17
2 MARCO TEÓRICO: ESPECTROSCOPIA DE EMISIÓN ÓPTICA CON PLASMA ACOPLADO INDUCTIVAMENTE (ICP-OES).....	17
2.1 GENERALIDADES DE LA TÉCNICA.....	17
2.1.1 <i>Fundamento Teórico y generalidades.</i>	17
2.1.2 <i>Sistema de introducción de la muestra.</i>	22
2.1.3 <i>Plasma acoplado inductivamente.</i>	27
2.1.4 <i>Espectroscopía de emisión atómica.</i>	31
2.1.5 <i>Procesamiento de datos.</i>	39
2.1.6 <i>Ventajas y desventajas de la técnica.</i>	45
2.2 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	46
2.2.1 <i>Digestión de la muestra.</i>	46
2.3 VALIDACIÓN DEL MÉTODO.....	48
2.3.1 <i>Precisión.</i>	49
2.3.2 <i>Sesgo y recobro.</i>	51
2.3.3 <i>Límite de detección (LOD).</i>	52
2.3.4 <i>Intervalo dinámico.</i>	52
2.3.5 <i>Sensibilidad.</i>	53
2.3.6 <i>Selectividad.</i>	56
2.3.7 <i>Robustez.</i>	56
3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	56
4 OBJETIVOS.....	56
4.1 GENERAL.....	56
4.2 PARTICULARES.....	57
5 HIPÓTESIS.....	57
6 METODOLOGÍA.....	57
6.1 MUESTREO PARA EL HÍGADO DE RATA.....	57
6.1.1 <i>Inducción de cirrosis.</i>	57
6.1.2 <i>Muestreo.</i>	58

6.2	INSTRUMENTACIÓN Y EQUIPO.	62
6.2.1	<i>Secado de muestra.</i>	62
6.2.2	<i>Digestión de la muestra.</i>	63
6.2.3	<i>Análisis químico de la muestra.</i>	63
6.3	MATERIAL Y REACTIVOS.....	64
6.4	PREPARACIÓN DEL EQUIPO.	65
6.5	MÉTODO EMPLEADO.	65
6.5.1	<i>Optimización de condiciones.</i>	65
6.5.2	<i>Desarrollo experimental.</i>	66
6.5.3	<i>Validación preliminar del método empleado.</i>	68
7	RESULTADOS.	82
7.1	LONGITUD DE ONDA SELECCIONADA.	82
7.2	DETERMINACIÓN DE ELEMENTOS EN LAS MUESTRAS.....	82
7.2.1	<i>Contenido de analito por muestra.</i>	82
7.2.2	<i>Clasificación del contenido de elementos en función de la concentración promedio.</i>	90
7.2.3	<i>Análisis de Resultados.</i>	97
8	CONCLUSIONES.	101
9	ANEXOS.	103
10	REFERENCIAS.	105

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ABREVIACIONES

AC	-Lóbulo anterior caudado	HSD	- <i>Honestly-significant-difference</i>	NAZ	- <i>Normal Analytical Zone</i>
ADN	-Ácido desoxirribonucleico	ICP	-Plasma acoplado inductivamente	Neb	-Nebulizador
ANOVA	-Análisis de varianza	ICP-AES	Espectroscopía de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente	PC	-Lóbulo posterior caudado
ASTM	- <i>American Society for Testing and Materials</i>			PHZ	- <i>Preheating-Zone</i>
Aux	-Auxiliar		Espectroscopía de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente	PMT	-Tubo fotomultiplicador
CAS	- <i>Chemical Abstract Service</i>	ICP-OES		PNT	-Protocolo normalizado de trabajo
CCD	-Dispositivo de carga acoplado			QC	- <i>Quality Control</i>
CID	-Dispositivo de inyección de carga	IRL	-Lóbulo derecho segmento izquierdo	RF	-Radiofrecuencia
CL	-Lóbulo caudado	IRZ	- <i>Inicial Radiation Zone</i>	RL	-Lóbulo derecho
CP	-Proceso caudado	IUPAC	-Unión Internacional de Química Aplicada	RML	-Lóbulo medial derecho
CTD	-Dispositivo de inyección de carga	LLL	-Lóbulo lateral izquierdo	SMR	- <i>Standard reference material</i>
Ec.	-Ecuación			SRL	-Lóbulo derecho segmento derecho
F0	-Ausencia de fibrosis	LML	-Lóbulo medial izquierdo	TM	-Tetratiomolibdato
F1	-Fibrosis portal	LOL	-Límite de detección	UNAM	-Universidad Nacional Autónoma de México
F2	-Fibrosis periportal	LOQ	-Límite de cuantificación	UV	-Ultravioleta
F3	-Puentes de fibrosis entre espacios porta	MCN	-Micronebulizador concéntrico	VGN	- <i>V-groove</i>
F4	-Cirrosis	ML	-Lóbulo medio	LOD	-Límite de detección
		NAFLD	- <i>Non-alcoholic fatty liver disease</i>		

SÍMBOLOS

Ar	-Argón	Co	-Cobalto	HNO₃	-Ácido nítrico
As	-Arsénico	Cs	-Cesio	K	-Potasio
Be	-Berilio	Cu	-Cobre	KCl	-Cloruro de potasio
Ca	-Calcio	é	-Electrón	KH₂PO₄	-Fosfato de potasio
CCl₄	-Tetracloruro de carbono	Fe	-Hierro		
Cd	-Cadmio	H₂O₂	-Peróxido de hidrógeno		

Li	-Litio	Ni	-Níquel	Si	-Silicio
Mg	-Magnesio	P	-Fosforo	SiO₂	-Óxido de silicio
Mn	-Manganeso	Pb	-Plomo	Sr	-Estroncio
Mo	-Molibdeno	PBS	-Amortiguador fosfato salino	Ti	-Titanio
Na	-Sodio	Rb	-Rubidio	Tl	-Talio
Na₂HPO₄	Fosfato sódico	Sb	-Antimonio	V	-Vanadio
NaCl	Cloruro de sodio	Se	-Selenio		
<i>UNIDADES Y ECUACIONES.</i>					
α	-Nivel de significancia	L	-Litro	ppm	-Partes por millón
°C	-Grados Celsius	m	-Metro	psi	-Libras por pulgada cuadrada
μ	-Valor real cuantitativo	m_{calibración}	-Pendiente de una recta	RSD	-Desviación estándar relativa
μL	-Microlitro	m_d	-Masa digerida	σ	-Desviación estándar poblacional
μS/cm	-Siemens sobre metro	mg	-Miligramo	s	-Segundos
μm	-Micrómetro	mg/Kg	-Miligramos sobre kilogramo	S_b	-Desviación estándar de la señal del blanco
c	-Velocidad de la luz	mg/L	-Miligramo sobre litro	S_d	-Desviación estándar de la señal de la muestra
C	-Concentración	MHz	-Megahertz	v	-Frecuencia
ΔE	-Diferencia de energía	min	-Minuto	V	-volumen
cv	-Coeficiente de variación	mL	-Mililitro	V_a	-Volumen de aforo
E	Sesgo	N	-Número de experimentos	W	Watt
g	-Gramo	nm	-Nanómetro	\bar{x}, \bar{X}	-Media/Mediana
h	-Constante de Plank	λ	-Longitud de onda	% R	-Porcentaje de recuperación relativa o recobro.
h	-Hora	p	-Probabilidad	\bar{B}	-Promedio de la señal detectada en el blanco
J	-Joule	ppb	-Partes por billón	λ	-Longitud de onda
K	-Kelvin	s²	Varianza		
Kg	-Kilogramo				

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. COMPARACIÓN ANATÓMICA ENTRE EL HÍGADO DE RATA Y EL HÍGADO HUMANO.....	13
TABLA 2. RESUMEN DE LOS ESTUDIOS PUBLICADOS SOBRE EL CONTENIDO DE ELEMENTOS EN HÍGADO DE RATA.....	17
TABLA 3. CRITERIOS NUMÉRICOS PARA ELEGIR MÉTODOS ANALÍTICOS ⁴⁸	49
TABLA 4. PARÁMETROS DE CALIDAD DE LA PRECISIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS ⁶³	50
TABLA 5. INTERVALO LINEAL REPORTADO PARA ALGUNOS METALES.....	53
TABLA 6. GRUPOS DE RATAS CON FIBROSIS INDUCIDA	58
TABLA 7. COMPOSICIÓN DEL AMORTIGUADOR FOSFATO SALINO.....	58
TABLA 8. MUESTRAS RECIBIDAS POR EL LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO.....	61
TABLA 9. ESTADÍSTICAS DEL PUNTAJE METAVIR DE IMÁGENES POR MUESTRA PARA LOS DIFERENTES GRUPOS.....	62
TABLA 10. OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS PARA MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	66
TABLA 11. PROGRAMA DE DIGESTIÓN PARA EL EQUIPO MILESTONE "HIGH PERFORMANCE MICROWAVE DIGESTION UNIT 1200".....	67
TABLA 12. RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE RECOBRO PARA EL CONTROL DE CALIDAD.....	68
TABLA 13. ESTÁNDARES UTILIZADOS (PERKINÉLMER) Y LAS CONCENTRACIONES DE LOS ELEMENTOS CONTENIDOS.....	69
TABLA 14. VOLUMEN DE ALÍCUOTA UTILIZADO PARA LA REALIZACIÓN DE LOS PUNTOS EN LA CURVA DE CALIBRACIÓN.....	71
TABLA 15. CONCENTRACIÓN DE LOS ELEMENTOS EN EL PUNTO DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN.....	71
TABLA 16. PARÁMETROS PARA LA VALIDACIÓN DE MÉTODO.....	77
TABLA 17. RESULTADOS UTILIZADOS PARA LA PRUEBA DE ANÁLISIS DE VARIANZA.....	79
TABLA 18. RESULTADOS DE REPETIBILIDAD.....	80
TABLA 19. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE TUKEY.....	80
TABLA 20. LONGITUD DE ONDA DE ANÁLISIS DE LOS ANALITOS.....	82
TABLA 21. EVALUACIÓN DE FIBROSIS POR MUESTRA. F0, F1, F2, F3 Y F4 CORRESPONDEN AL PUNTAJE METAVIR Y FM SON MUESTRAS DE HÍGADO SANO FUERA DEL MODELO.....	93
TABLA 22. RESULTADOS EXPERIMENTALES DEL CONTENIDO DE ELEMENTOS MEDIANTE ICP-OES PARA MUESTRAS DE HÍGADO DE RATA EN CONDICIONES DE FIBROSIS HEPÁTICA.....	104

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ASPECTO ESPONJOSO Y GENERALIDADES DEL HÍGADO. IMAGEN MODIFICADA ²	11
FIGURA 2. NOMENCLATURA DE COUINAUD ³	12
FIGURA 3. ANATOMÍA DEL HÍGADO DE RATA EN COMPARACIÓN CON EL HÍGADO. IMAGEN MODIFICADA ⁴	13
FIGURA 4. MODELO ATÓMICO DE BOHR; CUANDO LA ENERGÍA ES ABSORBIDA POR UN ÁTOMO, EL ELECTRÓN PASA A UN ORBITAL CON MAYOR ENERGÍA, A ESTE PROCESO SE LE CONOCE COMO "EXCITACIÓN" LUEGO EL ÁTOMO DECAE A UN NIVEL ENERGÉTICO MÁS BAJO EMITIENDO UN FOTÓN, HN..	18
FIGURA 5. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA EXCITACIÓN, IONIZACIÓN Y EMISIÓN. LAS LÍNEAS HORIZONTALES REPRESENTAN LOS NIVELES DE ENERGÍA ATÓMICOS, LAS LÍNEAS VERTICALES LAS ENERGÍAS DE TRANSICIÓN QUE PUEDEN SER RADIACIÓN O TÉRMICAS.....	19
FIGURA 6. ESPECTRO DE EMISIÓN PARA DIFERENTES ELEMENTOS. IMAGEN MODIFICADA ³⁵	20
FIGURA 7. ESQUEMA GENERAL DEL ICP-OES. IMAGEN MODIFICADA ³⁷	22
FIGURA 8. NEBULIZADOR NEUMÁTICO CONCÉNTRICO A LA DERECHA Y NEBULIZADOR CROSS-FLOW A LA IZQUIERDA. IMAGEN MODIFICADA ⁴¹	25
FIGURA 9. ESQUEMA GENERAL DE LA CONEXIÓN DE LA BOMBA PERISTÁLTICA, CÁMARA DE VACÍO Y NEBULIZADOR. IMAGEN MODIFICADA ⁴¹	26
FIGURA 10. ESQUEMA GENERAL DE LA ANTORCHA DE ICP Y EL PROCESO DE FORMACIÓN DE PLASMA CON DIVISIÓN DEL PLASMA Y LA TEMPERATURA APROXIMADA EN COLOR ROJO. IMAGEN MODIFICADA ⁴³	28
FIGURA 11. PROCESO DE LA MUESTRA EN EL PLASMA. IMAGEN MODIFICADA ⁴⁴	29
FIGURA 12. EJEMPLO DEL ESTADO SINGULETE Y EL ESTADO TRIPLETE PARA EL O ₂ . REPRODUCCIÓN ⁴⁵	30
FIGURA 13. REJILLA DE DIFRACCIÓN SEPARANDO UN HAZ DE LUZ EN DOS LONGITUDES DE ONDA.	33
FIGURA 14. ESQUEMA BÁSICO DEL ICP-AES A INICIOS DE LOS NOVENTAS ⁴¹	33
FIGURA 15. ESPECTRÓMETRO DE EMISIÓN DE LECTURA DIRECTA CON PLASMA ACOPLADO POR INDUCCIÓN. EL POLICROMADOR SIGUE EL DISEÑO DE PASCHEN-RUNGE. ESTÁ FORMADO POR UNA RED CÓNCAVA Y GENERA UN ESPECTRO ALREDEDOR DE UN CÍRCULO DE ROWLAND. RENDIJAS DE SALIDA SEPARADAS AÍSLAN CADA LÍNEA DEL ESPECTRO Y UN TUBO FOTOMULTIPLICADOR APARTE TRANSFORMA LA INFORMACIÓN ÓPTICA QUE PROVIENE DE CADA CANAL EN UNA SEÑAL ÓPTICA. ...	34
FIGURA 16. VISTA AXIAL (DERECHA) Y VISTA RADIAL (IZQUIERDA) ⁵¹	35
FIGURA 17. DIAGRAMA ÓPTICO DE UN ESPECTRÓMETRO EN ESCALERA (EHELLE) CON UN DISPOSITIVO DE INYECCIÓN DE CARGA A LA IZQUIERDA (CID) ⁴⁸ . DIAGRAMA ÓPTICO DEL ESPECTRÓMETRO DE ESCALERA (EHELLE) PARA CCD-ICP-OES OPTIMA A LA DERECHA ⁴⁰	36
FIGURA 18. ABSORCIÓN DE FOTONES POR RED CRISTALINA DE SILICIO Y LA FORMACIÓN DE PARES ELECTRÓN-HUECO. REPRODUCCIÓN ³³	37
FIGURA 19. ESQUEMA DE LA DIFERENCIA DE ENERGÍA PARA LAS BANDAS DE UN CONDUCTOR, SEMICONDUCTOR Y AISLANTE (DERECHA) ⁵² . ESQUEMA DEL DOPAJE DE SILICIO CON FÓSFORO (IZQUIERDA) ⁵³	38
FIGURA 20. ESPECTRÓMETRO DE ESCALERA (EHELLE) CON UNA CONFIGURACIÓN SEGMENTADA DE DISPOSITIVOS DE ACOPLAMIENTO DE CARGA (SDC) ⁴⁸	38
FIGURA 21. LÍMITES DE DETECCIÓN PARA LOS DIFERENTES ELEMENTOS CON ^{54, 55}	39
FIGURA 22. DESVIACIÓN SIMPLE DE FONDO ASCENDENTE, A LA DERECHA SE OBSERVA LA CORRECCIÓN CONSIDERANDO EL BLANCO.....	42
FIGURA 23. VARIACIÓN DE PENDIENTE DE FONDO, A LA DERECHA SE OBSERVA LA CORRECCIÓN DE LA LÍNEA BASE.	43
FIGURA 24. EJEMPLIFICACIÓN DEL TRASLAPE ESPECTRAL DIRECTO	44

FIGURA 25. EJEMPLIFICACIÓN DE LA DESVIACIÓN COMPLEJA DE FONDO.....	44
FIGURA 26. BOMBA DE ALTA PRESIÓN PARA LA DESCOMPOSICIÓN CON MICROONDAS ⁵⁹	47
FIGURA 27. EJEMPLO DE CURVA DE CALIBRACIÓN CON RESPUESTA LINEAL ⁶⁶	54
FIGURA 28. A. EJEMPLO TÍPICO DE UNA CURVA DE RESPUESTA OBTENIDA CON UN MÉTODO INSTRUMENTAL. SE IDENTIFICAN LAS CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO 'INTERVALO DE TRABAJO', 'INTERVALO LINEAL', 'SENSIBILIDAD ANALÍTICA', 'LOD' Y 'LOQ'. B. EJEMPLO TÍPICO DE UNA CURVA OBTENIDA CON UN PROCEDIMIENTO DE MEDICIÓN EN EL QUE SE REPRESENTA LA CONCENTRACIÓN MEDIDA EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA DE ENSAYO ⁶¹	55
FIGURA 29. CARA VISCERAL DEL HÍGADO. 1. LÓBULO LATERAL DERECHO; 2. LÓBULO MEDIAL DERECHO; 4. LÓBULO LATERAL IZQUIERDO; 5. LÓBULO MEDIAL IZQUIERDO; 6. PROCESO CAUDADO DEL LÓBULO CAUDADO ¹⁹	59
FIGURA 30. ESTUFA HERAUS RB360.....	63
FIGURA 31. HORNO DE MICROONDAS "HIGH PERFORMANCE MICROWAVE DIGESTION UNIT 1200" CON TUBOS, TAPAS Y CAMISAS DE DIGESTIÓN.....	63
FIGURA 32. EQUIPO ICP-OES OPTIMA 4300 DV UBICADO EN LA FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM. 64	
FIGURA 33. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA EL COBRE.....	72
FIGURA 34. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA EL CALCIO.....	72
FIGURA 35. CURVA DE CALIBRACIÓN HIERRO.....	72
FIGURA 36. CURVA DE CALIBRACIÓN MAGNESIO.....	72
FIGURA 37. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL MANGANESO.....	72
FIGURA 38. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA EL MOLIBDENO.....	73
FIGURA 39. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA EL ZINC.....	73
FIGURA 40. DESVIACIÓN DE FONDO SIMPLE. A LA DERECHA SE ENCUENTRA EL ESPECTRO DE EMISIÓN PARA EL CALCIO SIN LA TRASLACIÓN DE LA LÍNEA BASE. A LA IZQUIERDA SE ENCUENTRA EL ESPECTRO CORREGIDO.....	74
FIGURA 41. CORRIMIENTO DEL PUNTO MÁXIMO DE INTENSIDAD. A LA DERECHA SE ENCUENTRA EL ESPECTRO DE EMISIÓN PARA EL COBRE PREVIO A LA CORRECCIÓN DEL MÉTODO. A LA IZQUIERDA SE ENCUENTRA EL ESPECTRO AJUSTADO A LA LONGITUD DE ONDA CORRECTA PARA EL COBRE.....	74
FIGURA 42. ESPECTRO DE EMISIÓN PARA EL CA.....	75
FIGURA 43. ESPECTRO DE EMISIÓN PARA EL CU.....	75
FIGURA 44. ESPECTRO DE EMISIÓN PARA EL FE.....	75
FIGURA 45. ESPECTRO DE EMISIÓN PARA EL MG.....	75
FIGURA 46. ESPECTRO DE EMISIÓN PARA EL MN.....	76
FIGURA 47. ESPECTRO DE EMISIÓN PARA EL MO.....	76
FIGURA 48. ESPECTRO DE EMISIÓN PARA EL ZN.....	76
FIGURA 49. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE MG DE CA EN CADA KG DE MUESTRA.....	84
FIGURA 50. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE MG DE CU EN CADA KG DE MUESTRA.....	85
FIGURA 51. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE MG DE FE EN CADA KG DE MUESTRA.....	86
FIGURA 52. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE MG DE MG EN CADA KG DE MUESTRA.....	87
FIGURA 53. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE MG DE MN EN CADA KG DE MUESTRA.....	88
FIGURA 54. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE MG DE ZN EN CADA KG DE MUESTRA.....	89
FIGURA 55. ELEMENTOS MINORITARIOS PRESENTES EN LA MUESTRA CON LA CONCENTRACIÓN PROMEDIO.....	90
FIGURA 56. ELEMENTOS TRAZA PRESENTES EN LA MUESTRA CON CONCENTRACIÓN PROMEDIO.....	91
FIGURA 57. GRÁFICA DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES PARA LOS ELEMENTOS TRAZAS.....	91
FIGURA 59. GRÁFICA DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES PARA EL ZINC.....	92
FIGURA 58. GRÁFICA DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES PARA LOS ELEMENTOS MINORITARIOS. ..	92

FIGURA 60. GRÁFICA DEL CONTENIDO DE CA (MG/KG) EN FUNCIÓN DE LA FASE DE FIBROSIS INDUCIDA.	94
FIGURA 61. GRÁFICA DEL CONTENIDO DE CU (MG/KG) EN FUNCIÓN DE LA FASE DE FIBROSIS INDUCIDA.	95
FIGURA 62. GRÁFICA DEL CONTENIDO DE FE (MG/KG) EN FUNCIÓN DE LA FASE DE FIBROSIS INDUCIDA.	95
FIGURA 63. GRÁFICA DEL CONTENIDO DE MG (MG/KG) EN FUNCIÓN DE LA FASE DE FIBROSIS INDUCIDA.	96
FIGURA 64. GRÁFICA DEL CONTENIDO DE MN (MG/KG) EN FUNCIÓN DE LA FASE DE FIBROSIS INDUCIDA.	96
FIGURA 65. GRÁFICA DEL CONTENIDO DE ZN (MG/KG) EN FUNCIÓN DE LA FASE DE FIBROSIS INDUCIDA.	97

1 MARCO TEÓRICO: HÍGADO.

1.1 CARACTERÍSTICAS Y GENERALIDADES.

El órgano visceral más grande en el cuerpo humano es el hígado, tiene un aspecto esponjoso y representa del 2-5 % de la masa corporal con un peso de 1.3 a 1.7 kg; realiza un papel muy importante en los procesos metabólicos; alrededor de 500 funciones orgánicas son realizadas por él, tiene múltiples funciones endocrinas, exocrinas y de almacenamiento. La parte superficial, denominada parénquima hepático, está constituida principalmente por hepatocitos que se encargan de filtrar las toxinas en la sangre. El hígado se encuentra penetrado por túneles que contienen las redes interdigitales de los vasos que transportan fluidos, como sangre o linfa, hacia o desde una estructura o parte del cuerpo ¹.

En la Figura 1 se muestra el hígado y algunos de sus componentes con sus respectivas ubicaciones. Del lado derecho se observa el resultado de un experimento que consiste en llenar la vena porta con un material plástico amarillo permitiendo observar la ruta del tallo principal de las venas en las fisuras hepáticas ².

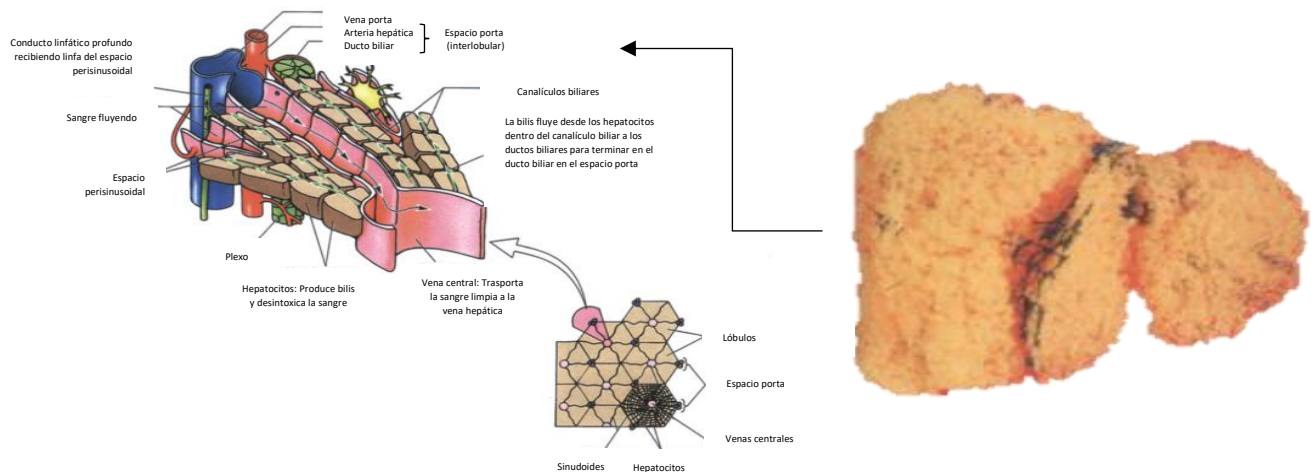


Figura 1. Aspecto esponjoso y generalidades del hígado. Imagen modificada ².

1.2 LÓBULOS Y SEGMENTOS.

1.2.1 Nomenclatura de Couinaud.

Según la clasificación de Couinaud, el hígado se divide en ocho segmentos funcionales independientes. Los segmentos se numeran en el sentido de las agujas del reloj tal como se muestra en Figura 2. Los segmentos II y III, reciben el nombre conjunto de "segmento lateral izquierdo del hígado" y "lóbulo izquierdo topográfico". El segmento IV es el segmento medial del lóbulo izquierdo. Los segmentos II, III y IV forman conjuntamente el "lóbulo izquierdo funcional del hígado". A su vez, el lóbulo derecho funcional está formado por los segmentos V y VIII (segmentos anteriores) y los segmentos VI y VII (segmentos posteriores). El segmento I o lóbulo caudado, se encuentra en la parte posterior ³.

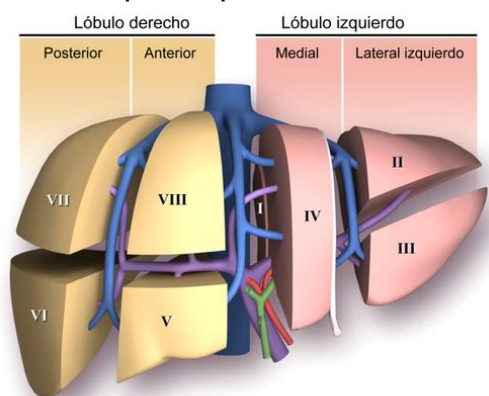


Figura 2. Nomenclatura de Couinaud ³.

1.2.2 Anatomía del hígado de rata con respecto al humano.

Las estructuras fundamentales del hígado de rata y el humano son similares, aunque no se observe con facilidad, los lóbulos del hígado de rata son equivalente a los sectores propuestos, por Couinaud, del hígado humano.

El hígado de rata está dividido en lóbulo derecho, lóbulo medio, lóbulo lateral izquierdo y lóbulo caudado. En la Figura 3 se observa el lóbulo caudado (CL) formado por el proceso caudado (CP), lóbulo anterior caudado (AC), y lóbulo posterior caudado (PC) ⁴.

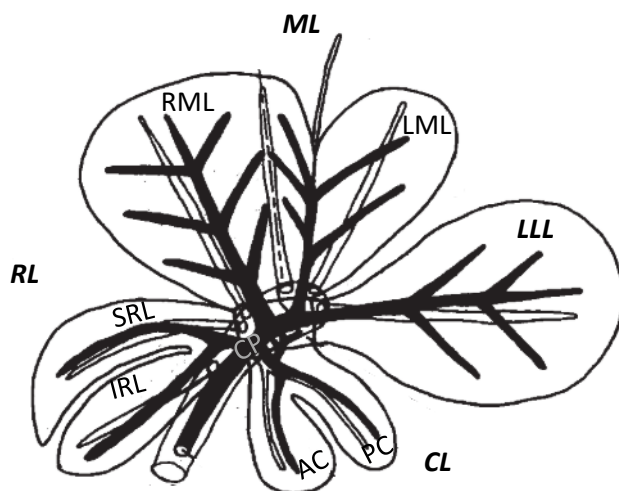


Figura 3. Anatomía del hígado de rata en comparación con el hígado. Imagen modificada ⁴.

Detallando la información presentada en la Tabla 1, el lóbulo caudado en la rata representa el segmento I en el hígado humano; el lóbulo lateral izquierdo (LLL) representa el segmento II, el lóbulo medio (ML) representa el segmento III en el lado izquierdo (LML) mientras que en el derecho (RML) representa el IV, V y VII. Adicionalmente el lóbulo derecho (RL) en la rata dividido en lado izquierdo (IRL) y derecho (SRL) representa los segmentos VI y VII respectivamente ⁵.

Hígado de rata	Hígado Humano
Lóbulo de Spiegel (caudado)	Segmentos I
Lóbulo izquierdo	Segmento II (segmento lateral izquierdo)
Lóbulo medio	
Componente izquierdo	Segmento III
Componente derecho	Segmentos IV, V and VIII
Lóbulo derecho	Segmento VI y VII (segmento lateral derecho)

Tabla 1. Comparación anatómica entre el hígado de rata y el hígado humano.

1.3 FIBROSIS HEPÁTICA.

1.3.1 Descripción de la enfermedad.

La fibrosis hepática es el cambio progresivo en la densidad de la matriz extracelular en el parénquima hepático, que al persistir se desarrolla cirrosis ⁶. La cirrosis hepática se caracteriza por ser una enfermedad crónica, en donde el tejido se sustituye por tejido cicatricial evitando que el hígado realice sus funciones metabólicas correctamente, es decir evita la entrada de sangre al hígado y por lo tanto la cantidad de nutrientes que llegan al órgano, además disminuye la producción de proteínas ⁷. Diversos procesos bioquímicos durante la fibrosis hepática pueden estar relacionados con el cambio en el contenido de metales en el hígado, en la sangre o en otros tejidos en el cuerpo. Se han publicado varios estudios al respecto ^{8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15}. También se ha evaluado el efecto aislado de algunos elementos y de los fármacos derivados de éstos sobre la fibrosis ^{14, 16, 17, 18}. Los puntos más importantes de los estudios se enlistan a continuación:

- La acumulación intracelular de **calcio** es la forma más común por la cual ocurre la muerte celular por intoxicación ⁸. El Ca es necesario para la actividad de reticulación (unión de cadenas poliméricas) de las enzimas como la transglutaminasa 2 (TG2) ⁹. La TG2 induce la muerte celular de los hepatocitos ¹⁰ por lo que un aumento de Ca podría ser un indicador de la progresión de la fibrosis ¹⁹.
- En el hígado el **cobre** desempeña un papel importante en la defensa contra las especies reactivas de oxígeno y en la respiración mitocondrial. Para pacientes con enfermedades de hígado graso (no alcohólico) conocido como NAFLD, por sus siglas en inglés, se ha encontrado un exceso de lípidos en los hepatocitos adicionalmente presentan bajos niveles de cobre en el hígado. El exceso de carbohidrato y líquidos se ha vinculado con la inducción de la

oxidación mitocondrial, que resulta en estrés oxidativo (ocasiona daño a tejidos) que afecta las mitocondrias. Se sabe que el estrés oxidativo puede dañar la cadena transportadora de electrones. El Cu por ser un elemento que se puede oxidar (CuII) o reducir (CuI) permite realización de reacciones redox. Por lo tanto, un desbalance en la concentración de cobre puede afectar el desarrollo de enfermedades en el hígado. Los procesos de autorregulación de cobre también pueden afectar los procesos de autorregulación de Fe y Zn en el cuerpo ¹⁴.

- El **magnesio** actúa como antioxidante. Incrementa la producción de superóxido dismutasa (Cu y Zn) uno de los principales antioxidantes en los organismos. La deficiencia de este metal desequilibra la reparación del tejido y aumenta la producción de radicales de oxígeno en la célula ¹⁴.
- El **manganeso** actúa como cofactor de las enzimas encargadas de la síntesis de colágeno ²⁰. La presencia de grandes cantidades de Mn puede relacionarse con la fibrosis hepática ¹¹. Se ha observado un aumento de la concentración de Mn para la cirrosis vinculada al consumo de alcohol ¹⁵. El humano cuenta con una superóxido dismutasa con Mn ¹⁶.
- El **hierro** es parte integral de la progresión de la cirrosis hepática como catalizador en formación de especies altamente reactivas de oxígeno que en altas concentraciones pueden ocasionar daño y muerte celular. La retención de lípidos y modificaciones a proteínas y ADN contribuyen a lesiones hepáticas inducidas por hierro ¹².
- En modelos con animales se ha demostrado que el ion tetratiomolibdato (TM) inhibe drásticamente la fibrosis hepática funcionando como desinflamatorio ¹⁷. El ion TM tiene carga 2- y se caracteriza por ser una entidad de coordinación de **molibdeno** ²¹. El mecanismo para la regulación de fibrosis es dependiente del

cobre ²² y el TM inhibe la acción de las proteínas por ser un quelatante de este metal, lo que ocasiona un aumento de las especies reactivas de oxígeno provocando daño celular ¹⁸. Ambos postulados son contradictorios entre sí, por lo que el efecto del molibdeno y los mecanismos de reacción en estos procesos todavía no se han esclarecido. Además, las propiedades químicas del metal aislado comparadas con los compuestos de coordinación como el ion TM pueden variar significativamente.

- Se ha asociado la disminución de **zinc** y a una de sus proteínas más importantes (metalotioneína) con las enfermedades de hígado ocasionadas por alcohol. La inhibición del estrés oxidativo y la inhibición de la muerte celular es uno de los factores asociados a la capacidad antioxidante de este metal. La prevención de lesiones ocasionadas por el consumo de alcohol en el hígado es independiente de la concentración de metalotioneína, sin embargo una vez desarrollada la enfermedad el decremento de ésta contribuye al progreso de la cirrosis ¹³.

1.3.2 Cirrosis en México.

En México se ha manifestado un patrón descendente en los últimos 20 años, aunque la cirrosis se mantiene como una de las diez principales causas de muerte tanto en hombres como en mujeres.

La cirrosis hepática es causada por múltiples factores; agresiones continuas al hígado asociadas al consumo reiterado de alcohol, infecciones virales ya sea hepatitis B o hepatitis C, o la presencia del denominado hígado graso. En 2013, la cirrosis hepática era la cuarta causa de pérdidas de salud y se ubicaba en el quinto lugar de la mortalidad general y en el cuarto de las muertes prematuras ²³. En 2017 se conserva el quinto lugar de mortalidad general y descendió al quinto lugar para el caso de muertes prematuras ²⁴.

1.3.3 Estudios preliminares de contenido de elementos en hígado.

Se han realizado diversos estudios sobre el contenido de elementos en hígado de rata con diversas metodologías y técnicas^{25, 26, 27, 28, 29, 30}. En la Tabla 2 se resumen las concentraciones reportadas para Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo y Zn por diferentes grupos de investigación:

Año-Autor	Ca $\left[\frac{mg}{Kg}\right]$	Cu $\left[\frac{mg}{Kg}\right]$	Fe $\left[\frac{mg}{Kg}\right]$	Mg $\left[\frac{mg}{Kg}\right]$	Mn $\left[\frac{mg}{Kg}\right]$	Mo $\left[\frac{mg}{Kg}\right]$	Zn $\left[\frac{mg}{Kg}\right]$
2013- Shimamura ²⁵	37.5	5.2	643	260	3.0	0.85	32.3
1999-Han ²⁶	26.1	4.1	297	198	NA	NA	25.1
1992- Gélinas ²⁷	1.9	3.39	151	211	2.11	0.53	23
1990- Uchino ²⁸	NA	14.6	1080	NA	9.1	NA	89.1
2000- Takahashi ²⁹	38.5	5.0	297	225	2.7	0.98	30.4
1999- Cockel ³⁰	118.3	13.5	321.4	666.0	7.5	NA	88.5

Tabla 2. Resumen de los estudios publicados sobre el contenido de elementos en hígado de rata.

2 MARCO TEÓRICO: ESPECTROSCOPÍA DE EMISIÓN ÓPTICA CON PLASMA ACOPLADO INDUCTIVAMENTE (ICP-OES).

2.1 GENERALIDADES DE LA TÉCNICA.

2.1.1 Fundamento Teórico y generalidades.

La espectroscopía de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente ICP-OES (*Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy*³¹) es una técnica analítica de emisión atómica que permite analizar múltiples

elementos en una muestra mediante el espectro de emisión utilizando plasma como fuente de excitación de los electrones ³². Adicionalmente es posible el análisis en diversas matrices y con alta sensibilidad, estas características permiten el análisis de contenido de elementos en muestras biológicas a niveles de ppm lo que resulta conveniente para el estudio presentado en esta tesis.

La técnica se fundamenta con el modelo atómico de Bohr, en donde se representa un núcleo formado por neutrones y protones (Figura 4) que se encuentra rodeado de electrones que viajan en orbitales discretos alrededor de él ³³.

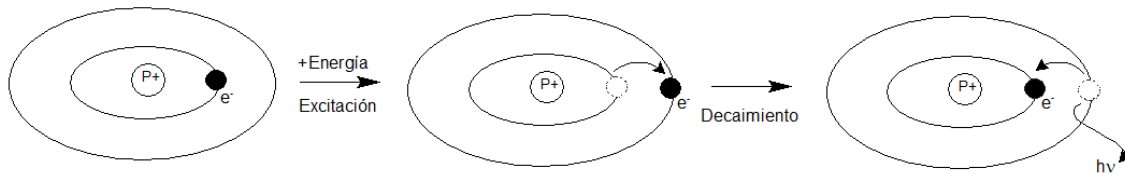


Figura 4. Modelo atómico de Bohr; cuando la energía es absorbida por un átomo, el electrón pasa a un orbital con mayor energía, a este proceso se le conoce como "excitación" luego el átomo decae a un nivel energético más bajo emitiendo un fotón, $h\nu$.

Este modelo ayuda a establecer que cada átomo tiene orbitales, donde es posible que los electrones viajen. Cada uno de los orbitales tiene un nivel de energía asociado y regularmente mientras más alejado se encuentran del núcleo mayor es la energía asociada a ellos. Cuando los electrones están cerca del núcleo y bajos de energía, el átomo se encuentra en su estado más estable, conocido como fundamental o basal. Se define como excitación al fenómeno en el cual el electrón es promovido de un orbital basal a uno más lejano del núcleo y de mayor energía. Cuando se añade energía a un átomo como consecuencia de la absorción de radiación electromagnética o por la colisión con otras partículas existen dos eventos altamente probables: la energía puede ser utilizada para incrementar la velocidad del átomo o el electrón puede absorber la energía y excitarse.

Un electrón es menos estable en su estado excitado y regresará a un estado más estable mediante la pérdida de energía a través de una colisión con otra partícula o por la emisión de radiación electromagnética, conocida como fotón, al perder la energía ganada el electrón regresará al orbital más cercano al núcleo que se encuentre disponible ³³.

Si la energía absorbida por el átomo es lo suficientemente grande, un electrón puede ser completamente dissociado del átomo, dejando un ion con carga positiva, es decir se ioniza. A este proceso se le asocia el nombre de potencial de ionización y es diferente para cada elemento. Los iones también tienen estados fundamentales y estados excitados que se originan por los mismos procesos ³³.

Durante este fenómeno de decaimiento y des-excitación de los átomos y los iones, se producen emisiones de radiación como se muestran en la Figura 5. Estas emisiones ocurren en la zona del ultravioleta-visible del espectro electromagnético.

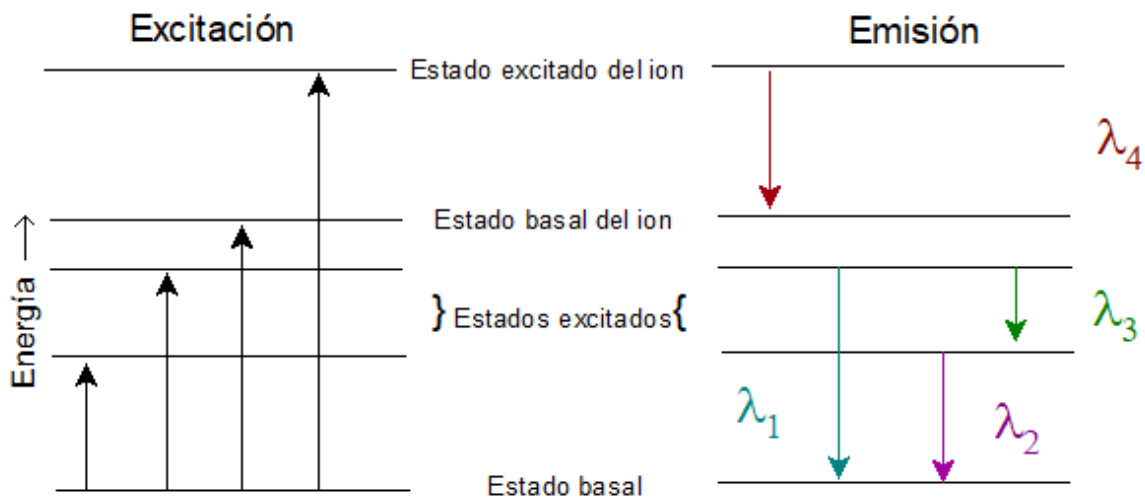


Figura 5. Representación esquemática de la excitación, ionización y emisión. Las líneas horizontales representan los niveles de energía atómicos, las líneas verticales las energías de transición que pueden ser radiación o térmicas.

Las líneas emitidas (Figura 6) y la longitud de onda asociada a cada una se usan para la identificación cualitativa de los elementos presentes en la muestra de estudio. El estudio cuantitativo puede llevarse a cabo midiendo la intensidad de radiación, el número de fotones emitidos a una longitud de onda determinada será directamente proporcional a la concentración del elemento en la muestra ³⁴.

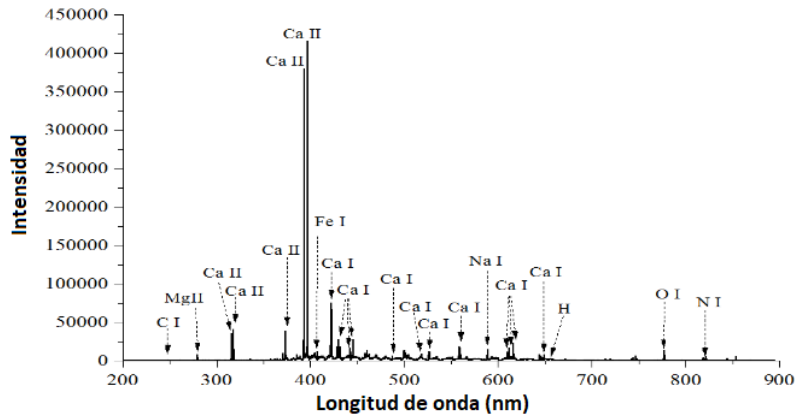


Figura 6. Espectro de emisión para diferentes elementos. Imagen modificada ³⁵.

La diferencia entre los niveles energéticos de las transiciones define la longitud de onda de la radiación involucrada. Tales transiciones están descritas por la ecuación de Plank (**Ecuación 1**):

Ecuación 1

$$\Delta E = h\nu$$

Donde:

ΔE = Diferencia de energía entre dos niveles [=] J de cada fotón

h = Constante de Plank [=] $6.63 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$

ν = Frecuencia [=] $\frac{1}{\text{s}}$

En espectroscopía de emisión atómica, la longitud de onda λ , se usa habitualmente en vez de frecuencia, por lo que es necesario sustituir la Ecuación 2 en la Ecuación 1:

Ecuación 2

$$v = \frac{c}{\lambda}$$

$$c = \text{velocidad de la luz [=]} 3 \times 10^8 \frac{m}{s}$$

$$\lambda = \text{longitud de onda [=]} m$$

Ecuación 3

$$\Delta E = \frac{hc}{\lambda}$$

La Ecuación 3 muestra que la energía y la longitud de onda son inversamente proporcionales, es decir al incrementar la energía la longitud de onda disminuye. Cada elemento tiene un conjunto de niveles energéticos característicos y por lo tanto tendrá un conjunto de longitudes de onda de emisión y absorción que permitirán distinguirlo de otro. La emisión de radiación electromagnética se presenta en su mayoría en la región espectral de ultravioleta-visible ($\approx 190-750$). Sin embargo, las longitudes de onda regionales espectrales adyacentes son superpuestas, por lo que la región más utilizada para espectroscopía analítica es de 160-800nm que adicionalmente brinda precisión, flexibilidad y costos relativamente baratos comparada con otras técnicas que usan energía en la zona de los rayos x o rayos γ ³³.

El equipo de ICP-OES esta constituido por un espectrómetro de emisión óptica y un plasma de acoplamiento inductivo (ICP), se trata de una fuente de ionización generada al aplicar energía en una bobina de carga, la cual rodea el extremo superior de la antorcha y se encuentra conectada a un generador de radiofrecuencia (RF) ³⁶.

Desde el punto de vista de su aplicación en la espectroquímica, el plasma se define como un gas parcialmente ionizado, eléctricamente neutro y confinado en un campo electromagnético. Su aplicación se fundamenta en las temperaturas notablemente superiores (entre 4000 y 10000K) que llega a alcanzar, esto permite que se disocien las combinaciones químicas, incluidas las más refractaria ³².

La introducción de la muestra se realiza continuamente y en estado líquido por medio de una bomba peristáltica pasando por un sistema de nebulización que produce un aerosol, este es transportado por el argón hacia el canal central del plasma. El aerosol de la muestra es desolvatado, vaporizado, atomizado, excitado y/o ionizado³³. El esquema general para un equipo de ICP-AES se presenta en la Figura 7.

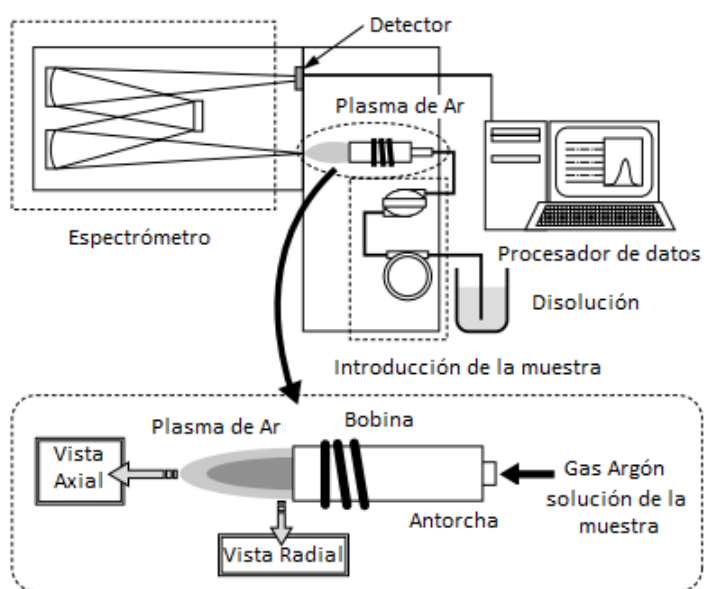


Figura 7. Esquema general del ICP-OES. Imagen modificada ³⁷.

2.1.2 Sistema de introducción de la muestra.

La principal característica o finalidad del sistema de introducción de muestra es introducir la máxima cantidad de analito al plasma de la forma

más eficaz y/o apropiada. Existen una gran variedad de dispositivos para introducir muestras líquidas, sólidas o gas hacia el plasma. La selección del sistema adecuado es útil para minimizar los efectos de las interferencias ³⁸.

Las muestras analizadas por medio de ICP-OES se encuentran en estado líquido debido a la homogeneidad de la muestra, fácil manejo y facilidad para preparar disoluciones estándar para realizar curvas de calibración. Los principales componentes de la introducción de la muestra son:

- A. Nebulizador: Genera el aerosol.
- B. Cámara de expansión o de rocío: Filtra el aerosol y lo transporta al plasma.
- C. Sistema de desolvatación: Reduce la masa del disolvente movido al plasma.
- D. Tubo inyector: Introduce el aerosol a la base del plasma.

Nebulizador

El proceso de generación de aerosoles requiere utilizar energía por medio del nebulizador para convertir el líquido en un aerosol fino, éste debe de entrar al plasma con una velocidad de inyección (flujo de gas menor a 1-2 L min⁻¹) tal que el tiempo de residencia sea en el intervalo de milisegundos, requerido para una atomización y excitación eficientes ³⁹. Al combinar la baja presión y la alta velocidad del gas, rompen la solución en un aerosol fino y reproducible, el cual proporciona una buena sensibilidad y estabilidad ⁴⁰.

Las características de los aerosoles son dependientes de la cantidad de energía transferida, usualmente los nebulizadores se clasifican en función del tipo de energía utilizada:

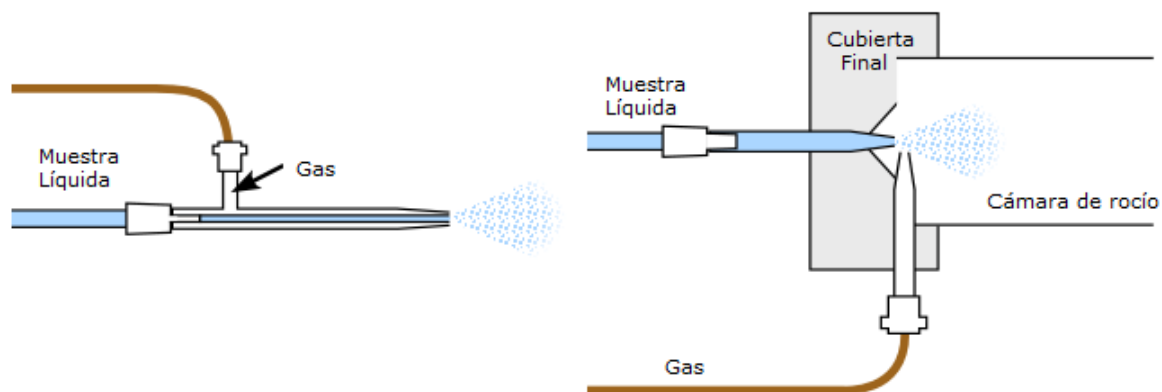
- a) **Energía cinética** del vapor de gas (nebulizador neumático) o del líquido (nebulizador hidráulico).

- b) **Energía mecánica** como resultado de aplicar externamente una fuerza de rotación (nebulizadores rotativos) o de vibración (nebulizador ultrasónico).
- c) **Energía de repulsión** de cargas acumuladas en la superficie (nebulizadores electroestáticos).

En los equipos de plasma acoplados inductivamente se utilizan nebulizadores neumáticos, estos se basan en la fuerza de arrastre de un gas fluyendo por la superficie de un líquido y desplazando partes de éste produciendo pequeñas gotas dispersas de la muestra líquida. Los nebulizadores neumáticos se clasifican de acuerdo a la geometría de la interacción entre el gas y el líquido en:

- a) **Nebulizador neumático concéntrico:** El gas fluye concéntricamente alrededor del tubo capilar.
- b) **Nebulizadores *cross-flow* o flujo cruzado:** El gas fluye en forma perpendicular con respecto al líquido.

En ambos nebulizadores (Figura 8) el líquido es forzado a través de un tubo capilar y el gas en la salida fluye de forma diferente con respecto al líquido. Aunque la mayoría de los nebulizadores neumáticos presentan baja eficiencia de transporte (2 % en ICP-AES) y las muestras con alto contenido de sales tienden a precipitar sales en los tubos capilares, en la actualidad siguen utilizándose por la facilidad, robustez y su bajo costo ³⁸.



© 2008 Dunnivant & Ginsbach

Figura 8. Nebulizador neumático concéntrico a la derecha y nebulizador cross-flow a la izquierda. Imagen modificada ⁴¹.

Se han diseñado diferentes nebulizadores para mejorar la eficiencia de transporte y el problema de precipitación de sales. La mayoría de ellos son de tipo *cross-flow* (basados en el principio de Babington como el de ranura "VGN", el nebulizador cónico, el micronebulizador concéntrico "MCN" y el nebulizador de rejilla Hildebrand) éstos emplean una bomba peristáltica para bombear la disolución al nebulizador, ocasionando que el flujo no sea dependiente de parámetros como la viscosidad o la tensión superficial, permitiendo que el lavado del nebulizador y la cámara sea más rápido³³.

Bomba peristáltica.

La bomba peristáltica consiste en una serie de rodillos los cuales empujan la solución de la muestra a través de las mangueras, utilizando un proceso conocido como peristalsis. La muestra por analizar nunca se encuentra en contacto directo con la bomba, pero sí entra en contacto con las mangueras de polipropileno que la transportan del recipiente al nebulizador, de esta forma se evita la contaminación de la muestra; sin embargo, provoca un constante deterioro en las mangueras transportadoras. Se debe realizar un mantenimiento regular asegurando

que las condiciones son idóneas, de no ser así, se debe actuar rápidamente a fin de cumplir con los parámetros requeridos ³³.

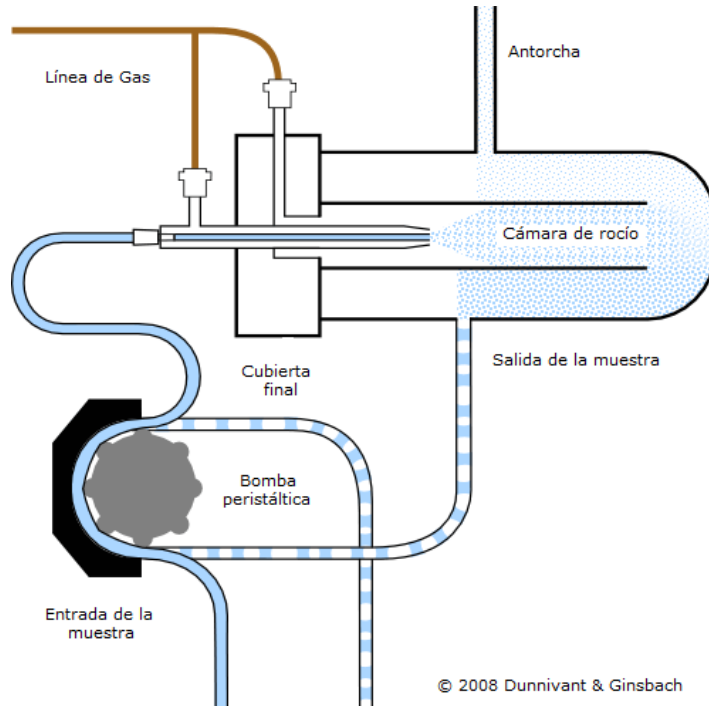


Figura 9. Esquema general de la conexión de la bomba peristáltica, cámara de vacío y nebulizador. Imagen modificada ⁴¹.

La muestra se bombea hacia el nebulizador a través de una bomba peristáltica como se muestra en la Figura 9. Después la muestra pasa por el nebulizador creando un aerosol fino. Las gotas más grandes de agua se condensan en la parte lateral de la cámara de rocío y son retiradas a través de la manguera de drenado (salida de la muestra). Las gotas más finas de agua se mueven con el flujo de argón y entran en el plasma, la entrada es uniforme y se encuentra regulada por el nebulizador. La proporción de la muestra introducida varía en función de la rotación de los rodillos, adicionalmente regula el tamaño de gota, si son mayores de 5 μm de diámetro aumenta la probabilidad de interferir con la estabilidad del plasma ⁴¹.

2.1.3 Plasma acoplado inductivamente.

El ICP (*Inductively Coupled Plasma*) por sus siglas en inglés, es la fuente más común para generar plasma. Se acopla la energía de un generador de radiofrecuencia con un gas a través de un campo magnético que se induce a través de una bobina de cobre, la bobina rodea el tubo externo de la antorcha, el tubo se encuentra hueco y contiene agua de refrigeración corriendo por él. La energía de radiofrecuencia es administrada a una frecuencia de 27 a 40 MHz, que se traduce en una potencia eléctrica de 500 a 2000 W ⁴².

Antorcha.

Un flujo de gas argón es dirigido a presión atmosférica hacia la antorcha que consiste en tres tubos concéntricos de cuarzo, la bobina de cobre también llamada de carga, rodea el extremo superior de la antorcha, para iniciar el proceso de producción de plasma es necesario aplicar un chispazo ³³. La energía de alta frecuencia es transferida al flujo de gas que rodea con forma de remolino a la antorcha; los electrones absorben la energía y colisionan con los átomos para formar el plasma con una temperatura de 6000 hasta 8000 K. Con el flujo, geometría y frecuencia adecuados se forma un plasma con forma toroidal, en donde el aerosol de la muestra pasa por la parte central del plasma, éste es dirigido, con el gas que los transporta, a través del tubo central. El flujo de gas entre el tubo exterior y el tubo intermedio se introduce de forma tangencial para evitar que la alta temperatura alcanzada por el plasma afecte la antorcha y al instrumento ³⁹. Las colisiones subsecuentes entre los átomos del gas ocasionan un efecto en cadena volviendo al plasma "autosustentable". Adicionalmente el campo magnético ocasiona que los iones y electrones fluyan horizontalmente al plano de la bobina, calentando el argón (especie neutra) por intercambio de energía de colisión produciendo una zona de

alta temperatura ⁴². En la Figura 10 se ilustra el esquema general de la antorcha y el proceso de formación del plasma ⁴³.

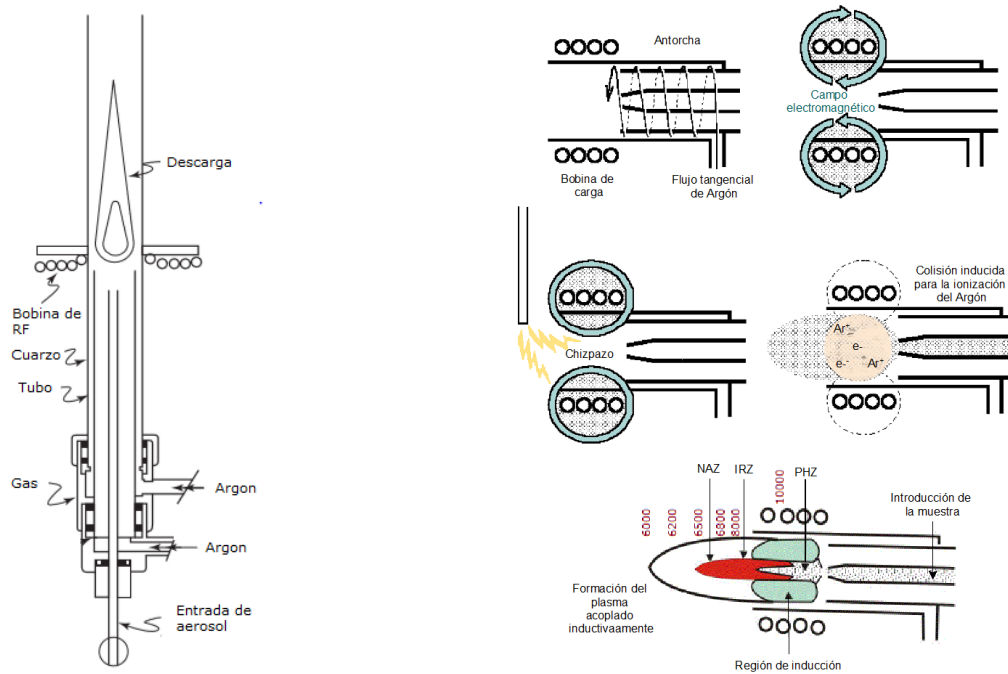


Figura 10. Esquema general de la antorcha de ICP y el proceso de formación de plasma con división del plasma y la temperatura aproximada en color rojo. Imagen modificada ⁴³.

En función de los procesos que sufra la muestra el plasma puede dividirse en varias zonas. La región de inducción (núcleo del plasma), es la parte donde la energía de la bobina de inducción es acoplada. El primer proceso es la desolvatación, el disolvente de la muestra es eliminado y se producen partículas microscópicas que se descomponen por medio de vaporización y atomización en la zona PHZ (*Preheating-Zone* por sus siglas en inglés). En la zona IRZ y NAZ (*Inicial Radiation Zone* y *Normal Analytical Zone*, por sus siglas en inglés) se lleva a cabo el siguiente proceso que consisten en ionizar la muestra para que los átomos emitan la radiación característica que permite su cuantificación con la finalidad de relacionarla con la concentración del analito en la muestra ⁴⁰. La región

que se utiliza para análisis químico se encuentra a una temperatura de 5000-6000 K y se conoce como "cola de fuego" ⁴².

El proceso de la muestra dentro del plasma se detallada en la Figura 11:

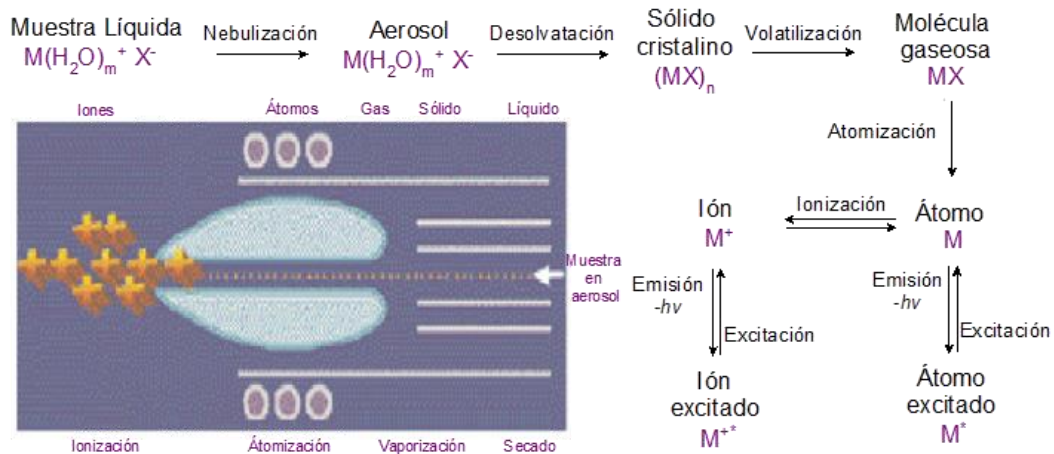
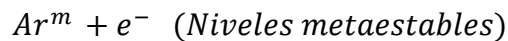
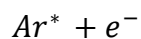
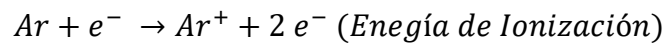


Figura 11. Proceso de la muestra en el plasma. Imagen modificada ⁴⁴.

Ionización de la muestra.

El mecanismo para la excitación y ionización de los átomos de las muestras no se ha entendido en su totalidad a la fecha ³³. Se ha planteado que al ionizarse los átomos del gas se forma el plasma por medio de las siguientes reacciones:



Los electrones ganan tanta energía que pueden ionizar al gas presente, por medio de este proceso aumenta el número de electrones libres y de esta forma se genera el plasma a alta temperatura, también se ha planteado la formación de átomos de argón excitados, donde los electrones se encuentran en niveles más altos de energía. Un caso especial serían los estados metaestables del argón, por tratarse de tripletes (ver Figura 12) no pueden decaer directamente, por medio de la

emisión de radiación, a estados de menor energía de diferente multiplicidad. Estos estados metaestables decaerán por medio de colisiones ³⁹.

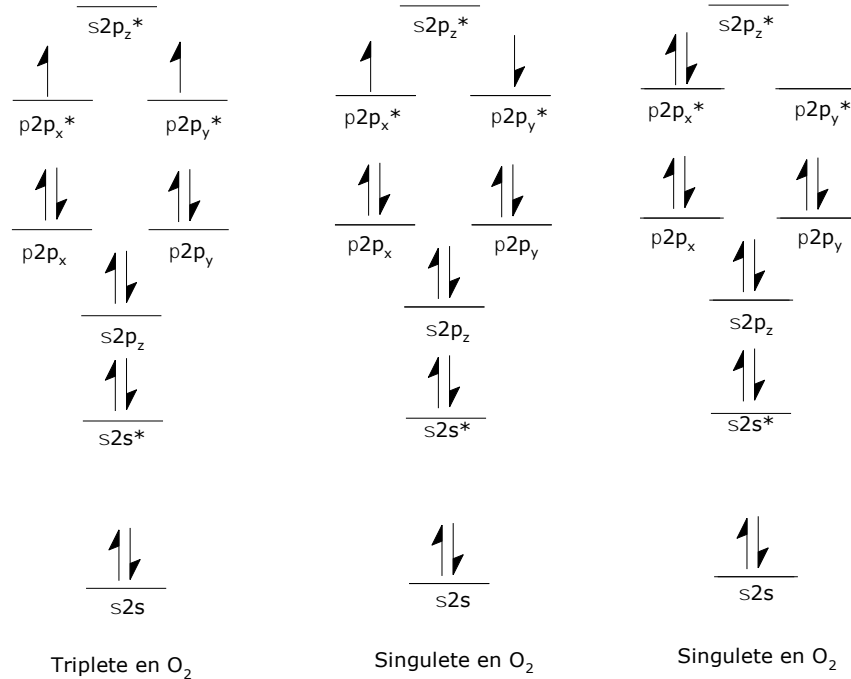
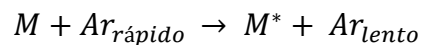
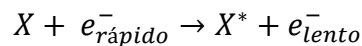


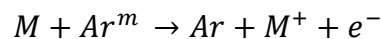
Figura 12. Ejemplo del estado singlete y el estado triplete para el O₂. Reproducción ⁴⁵.

Los principales procedimientos planteados son los siguientes:

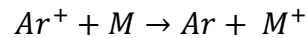
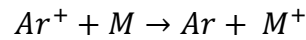
- Excitación/ionización térmica: Causada por las energías de colisión entre los átomos, iones o electrones. Donde la especie con * denota un estado excitado.



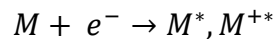
- Ionización/excitación de Penning: Causada por las colisiones entre átomos en estado basal y especies metaestables de argón.



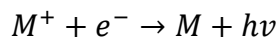
- Ionización/excitación por transferencia de carga: Causada por la transferencia de carga entre iones y átomos.



- Impacto electrónico: Causado por el impacto de un electrón a algún átomo del analito.



- Recombinación radiactiva: Causada por la reacción entre un ion del analito y un electrón.



Se asocia la alta concentración de estados metaestables del gas argón con la alta insensibilidad del plasma en presencia de elementos fácilmente ionizables, adicionalmente el efecto *Penning* explica el predominio de las líneas iónicas en ICP-OES ³⁹.

2.1.4 Espectroscopía de emisión atómica.

Con la técnica de ICP-OES es posible determinar de forma cuantitativa 76 elementos de la tabla periódica. Se trata de una técnica flexible que permite elegir entre varias longitudes de onda de emisión diferentes para cada elemento y medir la emisión de varios elementos simultáneamente ⁴⁶. En la literatura, con regularidad, no se distingue entre ICP-AES (*Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy*) e ICP-OES, dado que el fundamento de la técnica es el mismo y la mayor diferencia radica en emplear un sistema óptico sofisticado (espectrofotómetro) para el caso del ICP-OES ⁴⁷.

Sistema óptico.

La luz emitida por las especies excitadas en el plasma tiene diferentes longitudes de ondas, esto significa que la emisión del plasma es

policromática. El sistema óptico recolecta la emisión producida por el plasma y el espectrómetro aísla las longitudes de onda del analito, para identificar y medir la intensidad de cada longitud de onda sin interferencias la radiación policromática debe ser separada.

Esta separación de la luz se realiza con un monocromador, que separa una longitud de onda a la vez, o con un sistema de canales múltiples simultáneos, que separa varias longitudes de onda a la vez, estos últimos se dividen en dos tipos generales: policromadores y espectrógrafos. El sistema óptico recolecta la emisión producida por el plasma, el espectrómetro aísla las longitudes de onda del analito. El sistema de canales múltiples consta de prismas parabólicos que redireccionan la luz emitida. Esta luz pasa por una rejilla de difracción (se trata de una rejilla Echelle, sin embargo, también existen otros dos tipos de rejillas, la *ruled* y la holográfica), la cual tiene como función separar la luz policromática en radiación monocromática formando un haz de luz. Dicho proceso se genera por las líneas que tiene la superficie de la rejilla Echelle, y por medio de espejos es dirigida a la rendija de salida hacia el detector, este espejo tiene una densidad de 600 a 4200 líneas por milímetro ⁴⁰. La luz será difractada en un ángulo que dependerá de la longitud de onda y de la densidad de líneas de la rejilla ³³. Este fenómeno se ejemplifica en la Figura 13.

El principio de separación de luz es el mismo para el monocromador, el policromador y el espectrógrafo. El policromador tiene una serie de tubos fotomultiplicadores para efectuar la detección y el espectrógrafo se basa en dispositivos bidimensionales de inyección de carga o en dispositivos de acoplamiento de carga como transductores ⁴⁸.

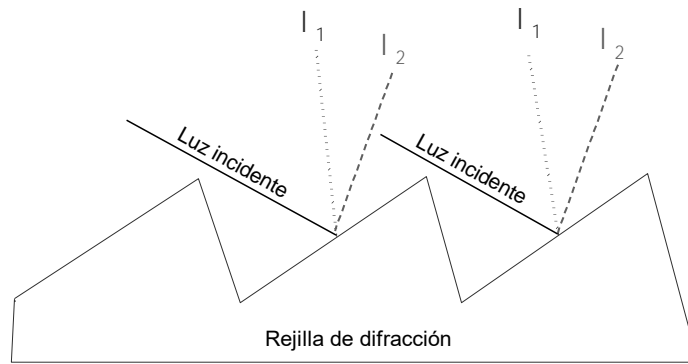


Figura 13. Rejilla de difracción separando un haz de luz en dos longitudes de onda.

En términos generales, un espectrómetro dispersivo consiste en un colimador en la entrada, un elemento dispersivo y un colimador de salida donde se pone un detector. Para el caso del policromador más utilizado, el elemento dispersivo es fijo y las medidas se realizan simultáneamente en diferentes puntos del plano focal, esto se logra con una superficie curva (círculo de Rowland detallado en la Figura 14 y 15) ^{41, 48}. En la actualidad se utilizan dos sistemas colocados perpendicularmente, para dispersar, una rejilla y un prisma o dos gradillas de dispersión. En este arreglo uno de los componentes, generalmente el prisma, se utiliza para realizar un predispersión de la luz ⁴⁹.

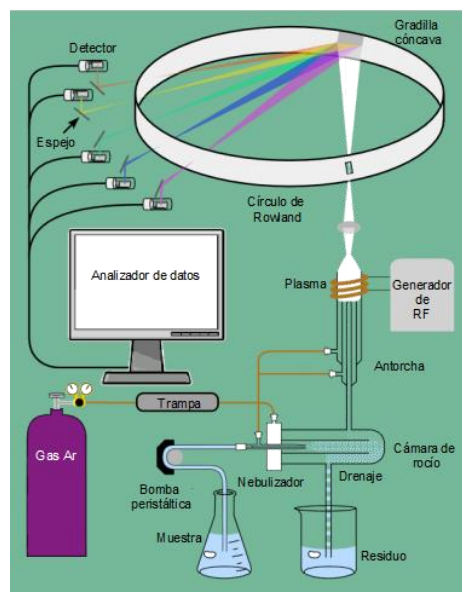


Figura 14. Esquema básico del ICP-AES a inicios de los noventas ⁴¹.

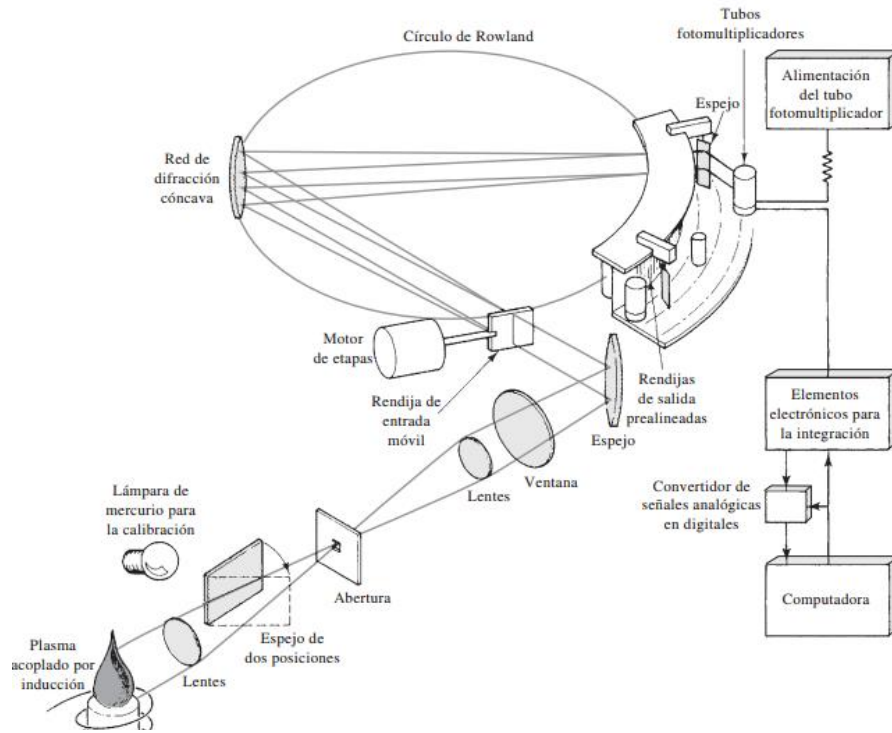


Figura 15. Espectrómetro de emisión de lectura directa con plasma acoplado por inducción. El policromador sigue el diseño de Paschen-Runge. Está formado por una red cóncava y genera un espectro alrededor de un círculo de Rowland. Rendijas de salida separadas aíslan cada línea del espectro y un tubo fotomultiplicador aparte transforma la información óptica que proviene de cada canal en una señal óptica.

En los inicios de técnica la zona analítica normal era observada por un costado del plasma operando en orientación vertical, este tipo de vista se le conoce como radial (ver lado derecho de la Figura 16). En las últimas décadas se han propuesto diversas modificaciones al equipo, una de ellas permite rotar el plasma a una posición horizontal (ver lado izquierdo de la Figura 16) para que la zona analítica normal sea observada por el final del plasma, con esta mejora es posible una disminución de la señal del ruido debido a un aumento de la longitud de trayectoria de observación permitiendo que los límites de detección mejoren de 3-10 veces. Esta configuración es conocida como vista axial³³, sin embargo, pueden ocurrir limitaciones con respecto al intervalo dinámico lineal y mayores interferencias de elementos fácilmente ionizados como consecuencia de la mayor influencia de los cambios geométricos del plasma⁵⁰.

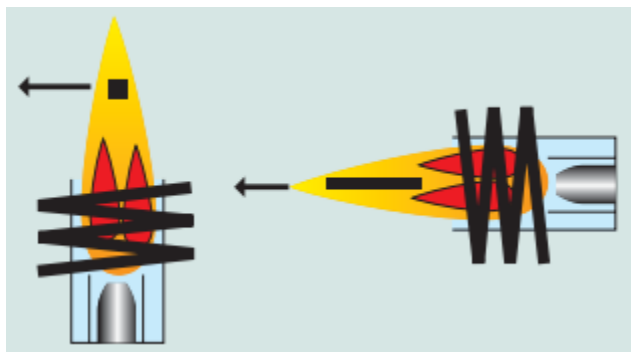


Figura 16. Vista axial (derecha) y vista radial (izquierda) ⁵¹.

Sistema de detección.

En la década de los 60, se introducen a la industria eléctrica los dispositivos de estado sólido. La necesidad comercial por las cámaras de video ocasionó la reducción de costos en este tipo de tecnología, sin embargo, esto no fue suficiente para mejorar los sistemas de detección en ICP-AES, como consecuencia se desarrollaron nuevos detectores altamente sensibles y de mejor resolución para aplicaciones espectroscópicas. Los sensores de silicio responden a la luz, esto permite, integrarlos en un arreglo lineal y en arreglos bidimensionales formando un detector fotosensible ³³.

Para la detección de la luz en ICP-OES se puede utilizar un tubo fotomultiplicador (PMT), un dispositivo de carga acoplado (CCD) o un dispositivo de inyección de carga (CID). Estos últimos dos pertenecen a una categoría denominada como dispositivos de transferencia de carga (CTD).

Para poder detectar varias longitudes de ondas, simultáneamente, es necesario este tipo de detector de dos dimensiones. Los dispositivos de transferencia de carga y en particular los dispositivos de inyección de carga son ideales para acoplarse con el espectrómetro de Echelle (Figura 17) debido a que permiten un aumento de la relación señal/ruido. Sin embargo, comparado con los detectores CCD el nivel de ruido es más alto

y requieren ser enfriados con nitrógeno líquido para reducir esta señal. La ventaja para el CID es que el modo de lectura es no destructivo mientras que el del CCD es destructivo ³⁹.

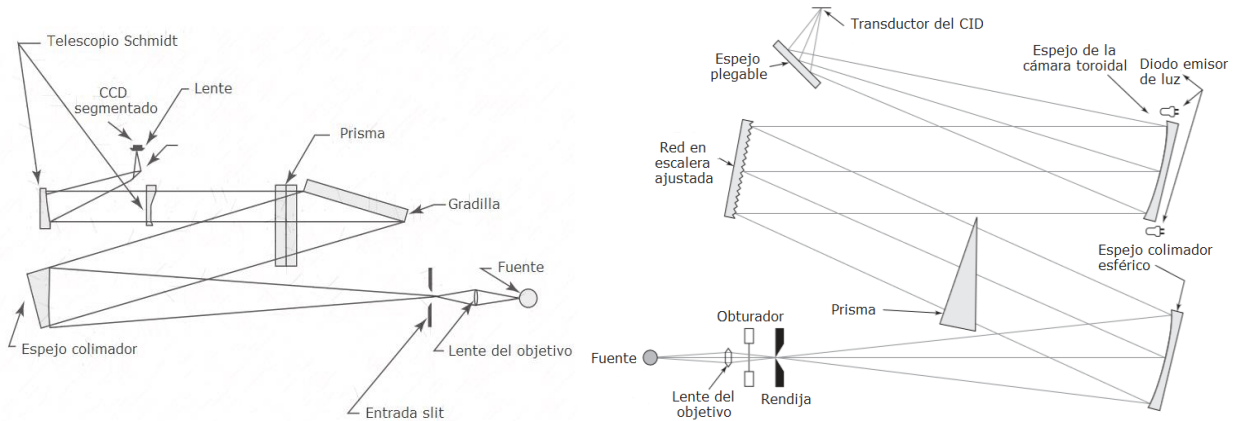


Figura 17. Diagrama óptico de un espectrómetro en escalera (Echelle) con un dispositivo de inyección de carga a la izquierda (CID) ⁴⁸. Diagrama óptico del espectrómetro de escalera (Echelle) para CCD-ICP-OES Optima a la derecha ⁴⁰.

Los dispositivos de transferencia de carga (CTD) son detectores multicanal de estado sólido formados por bloques que están compuestos de cristales de silicio de alta pureza que se encuentran unidos en una red tridimensional, es decir, consisten en varios electrodos conductores que se superponen a una capa aislante de óxido de silicio (SiO_2) y que forma una serie de capacitores de un material semiconductor metálico (ver Figura 18). El enlace Si-Si puede romperse por la energía de los fotones con longitud de onda visible o ultravioleta. Cuando el enlace se rompe, se forma un par electrón hueco el cual consiste en liberar un electrón dentro de la estructura reticular formando un orificio en la estructura cristalina. La capa aislante separa los electrodos de la zona dopada para almacenar la carga ⁴⁰.

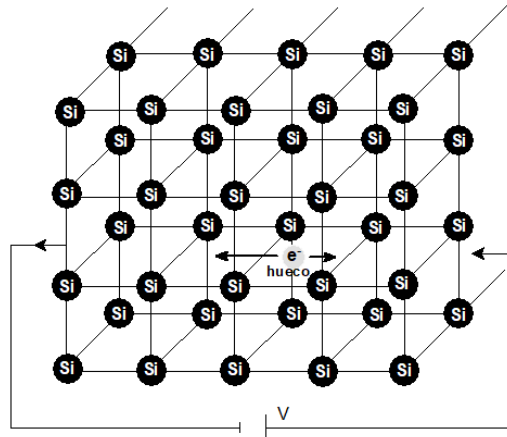


Figura 18. Absorción de fotones por red cristalina de silicio y la formación de pares electrón-hueco. Reproducción ³³.

En esta zona dopada (para el caso de Si se suele hacer un dopaje con P como se representa a la derecha de la Figura 19) los electrones tendrán la mayor movilidad relativa mientras que los huecos tendrán menor movilidad relativa. Cuando los electrones están cargados negativamente con respecto al Si, se crea una región de inversión de carga bajo los electrodos, convirtiéndose en una región energéticamente favorable para que los huecos estén en ese lugar. La promoción de un electrón a la banda del semiconductor (a la izquierda en la Figura 19) por la absorción de un fotón, crea este hueco móvil que migra y se recoge en la región de inversión. La cantidad de carga generada en un detector CTD es medida moviendo la carga para recolectarla con un amplificador (CCD), o midiendo el cambio de voltaje inducido por el movimiento (CID). Describiendo el segundo proceso si se aplica un voltaje a través del bloque, los electrones que se liberan se moverán en la dirección contraria al campo eléctrico aplicado ³⁹. La corriente generada es proporcional a la cantidad de fotones que llegaron. Los elementos CTDs son llamados pixeles, su tamaño va de 6 a 30 μm , cada pixel es capaz de almacenar una carga generada por los fotones ³³.

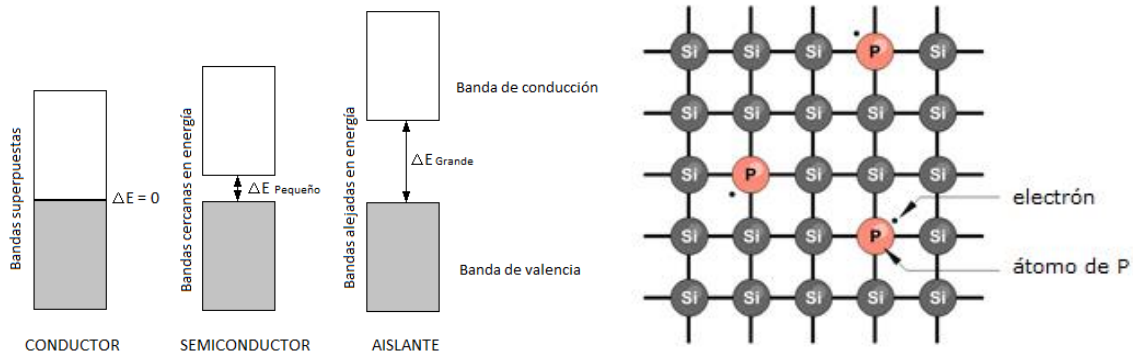


Figura 19. Esquema de la diferencia de energía para las bandas de un conductor, semiconductor y aislante (derecha) ⁵². Esquema del dopaje de Silicio con Fósforo (izquierda) ⁵³.

Se ha introducido un nuevo tipo de detector CCD, el dispositivo detector de transferencia de carga segmentada (SDC), presentado en la Figura 20, ha sido diseñado para la colección individual segmentada de fotones. Este detector está formado por más de 200 subconjuntos de colectores acomodados en una placa de silicio con patrón bidimensional asociado con el Echellograma producido por el espectrómetro. Los subconjuntos mencionados corresponden a los elementos que se pueden analizar por medio del ICP-OES ⁴⁰.

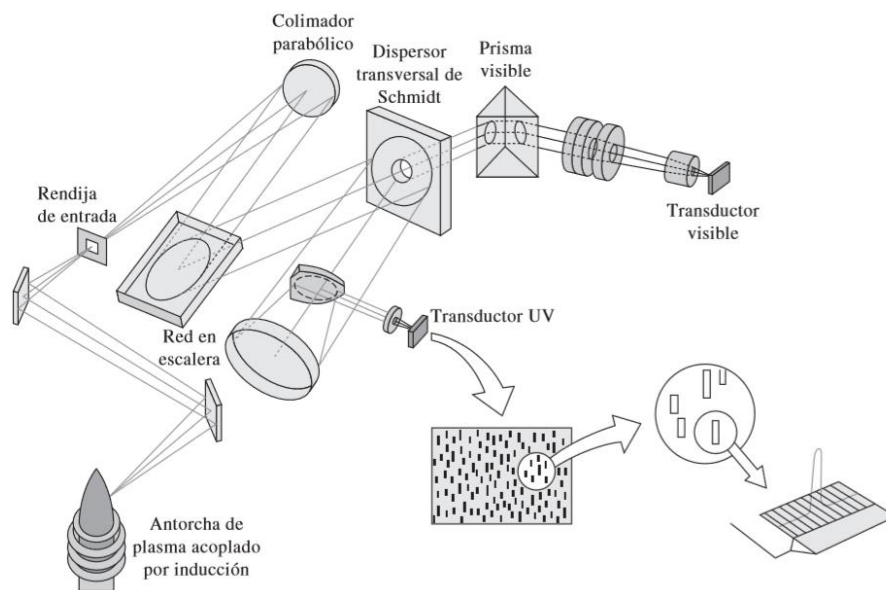


Figura 20. Espectrómetro de escalera (Echelle) con una configuración segmentada de dispositivos de acoplamiento de carga (SDC) ⁴⁸.

Interferencias.

La mayoría de los métodos espectroquímicos presentan errores asociados a 4 tipos de interferencias diferentes:

- a) **Físicas**: viscosidad u otras propiedades de disolución de la muestra.
- b) **Químicas**: generadas por compuestos con baja eficiencia para atomizarse u otro tipo de reacciones químicas que reducen la concentración de un elemento.
- c) **Ionización**: debidas a cambio en el equilibrio asociado a la ionización.
- d) **Espectrales**: Señales no deseadas que interfieren con la señal para un elemento, pueden ser causadas por la superposición de líneas de emisión o absorción.

Las interferencias físicas están relacionadas con los procesos de nebulización y transporte de la muestra al plasma, los cambios en la viscosidad o en la tensión superficial pueden provocar errores en la determinación que pueden ser reducidos mediante diluciones o bien modificando el flujo de entrada con la bomba peristáltica.

Muestras con altas concentraciones de ácidos o sólidos disueltos se ven más afectadas por estos cambios en las propiedades físicas de la disolución. La acumulación de sales en el extremo del nebulizador representa otro problema para éstas disoluciones con altas concentraciones ya que pueden afectar el flujo del aerosol provocando inestabilidad instrumental ³³.

La mayoría de las interferencias químicas en las determinaciones espectroquímicas son ocasionadas por fenómenos vinculados a la evaporización de la muestra, es decir, la muestra tiene una baja eficiencia de atomización, cuando un elemento o molécula en la muestra causa que otro analito se vaporice más o menos rápido se dice que interfiere

químicamente al analito. Un ejemplo clásico es la reducción de la señal de absorción de calcio en presencia de aluminio, sin embargo, en ICP-OES estas interferencias son poco observadas y para los casos donde se presentan se puede aumentar la radiofrecuencia generada (RF) y reducir el flujo interno de argón para eliminarlas. Adicionalmente muestras en matrices complejas pueden presentar este tipo de problemas pero es posible utilizar el método de adiciones estándar para reducir el efecto de la matriz o realizar una calibración multivariable con su respectivo modelo matemático considerando la concentración de ambos elementos o compuestos en la muestra ⁵⁶.

Las interferencias de ionización podrían considerarse una interferencia química, sin embargo, varios autores ³⁷ deciden tratarlas como un apartado diferente.

Estas interferencias son ocasionadas por cambios en la intensidad de la emisión, resultando en un desplazamiento del equilibrio de ionización cuando elementos que son fácilmente ionizables (Na, K, Rb y Cs) coexisten, generalmente esto provoca que la intensidad de líneas de especies neutras aumente y se reducen las líneas asociados a los iones. Este problema afecta mayoritariamente las mediciones para la vista axial del plasma, sin embargo, se resuelve fácilmente usando la vista radial o añadiendo en exceso el elemento con bajo potencial de ionización a la disolución de calibración y a la muestra.

Por último, las interferencias espectrales también conocidas como interferencias de fondo se clasifican en 4 tipos diferentes:

- 1) Desviación simple de fondo: Es el resultado del cambio de intensidad positivo o negativo de la línea de fondo y es constante en un intervalo, alrededor de 0.5nm, en cada lado de la línea del analito. Observar Figura 22.

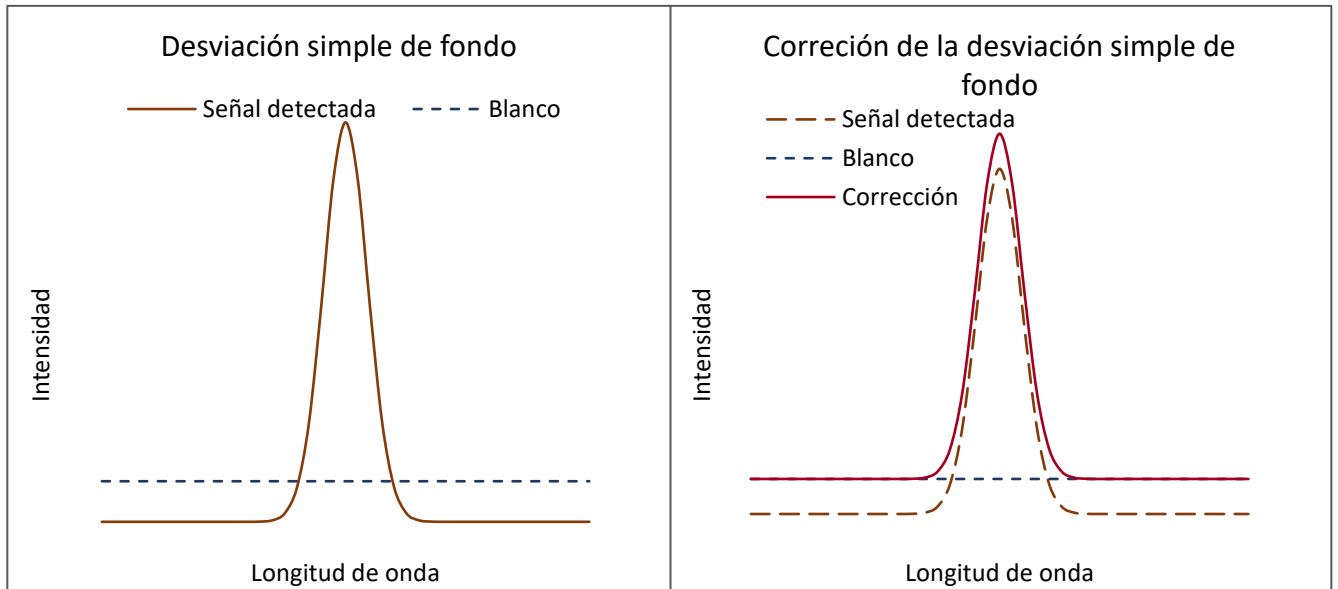


Figura 22. Desviación simple de fondo ascendente, a la derecha se observa la corrección considerando el blanco.

- 2) Variación de pendiente de fondo: Es causada por la presencia de campos eléctricos en el plasma (ensanchamiento de Stark) o por un elemento en alta concentración como consecuencia de la presencia de una línea de emisión atómica o iónica, también puede ser ocasionada cuando el plasma no se encuentra aislado del ambiente atmosférico. Observar Figura 23.

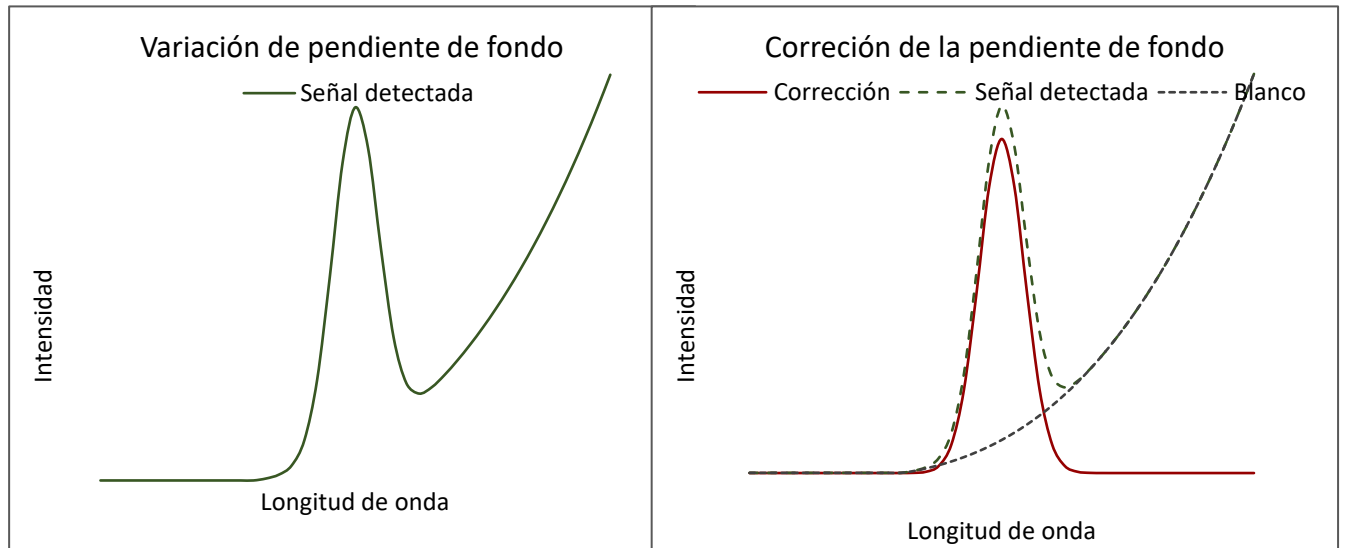


Figura 23. Variación de pendiente de fondo, a la derecha se observa la corrección de la línea base.

3) Traslape espectral directo: Ningún elemento diferente tiene líneas atómicas o de emisión iguales entre sí, sin embargo cada línea espectral tiene un ancho finito, las rejillas de salida usadas en los monocromadores y en los policromadores tienen de igual forma anchuras finitas, en realidad la luz medida en el detector viene de una pequeña gama (intervalo) de longitudes de onda, provocando una limitación en la técnica dado que en la actualidad no se cuenta con un instrumento que permita detectar estas longitudes totalmente separadas unas de otras. En los últimos años se ha mejorado el poder de los espectrómetros permitiendo reducir el número de líneas espectrales traslapadas del analito de estudio. Observar Figura 24.

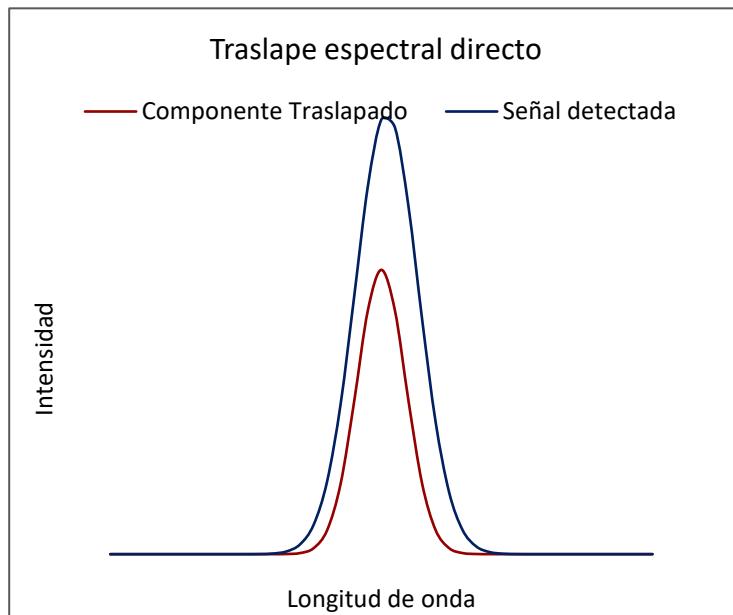


Figura 24. Ejemplificación del traslape espectral directo

4) Desviación compleja de fondo

La intensidad de fondo varía significativamente en ambos lados la línea y se debe a la presencia de múltiples líneas atómicas o de emisión intensas y cercanas entre sí, superponiéndose a la señal detectada para el analito. Observar Figura 25.

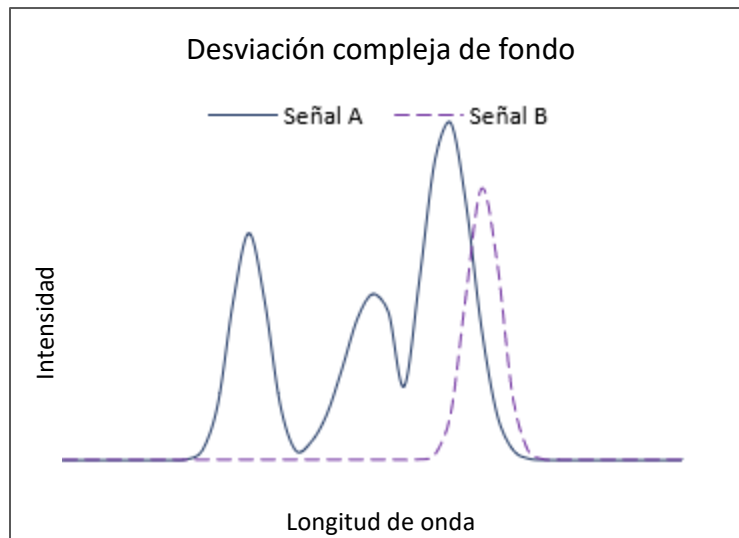


Figura 25. Ejemplificación de la desviación compleja de fondo.

2.1.6 Ventajas y desventajas de la técnica.

*Ventajas*⁵⁷

- Análisis multielemental. Reducción de tiempo para analizar más elementos pues el plasma permite la excitación de la mayoría de los elementos en forma de átomos o iones.
- Eficiente y robusta.
- Facilidad para analizar muestras líquidas.
- Amplio intervalo dinámico. Amplio espectro con más de 70 elementos analizables e intervalo dinámico de concentraciones con varios ordenes de magnitud.
- Pocas interferencias químicas.
- Flexibilidad en la configuración instrumental.
- Amplio intervalo de linealidad.
- Sencillo de operar.
- Bajos límites de detección.
- Disminución de la cantidad de muestra comparado con otras técnicas.
- Técnica que ha avanzado mucho en las últimas décadas.

*Desventajas*⁵⁸.

- Altos costos de inversión, mantenimiento y operación del equipo.
- Uso de espectrómetros de alta resolución más caros comparados con lo de otras técnicas como emisión de flama o absorción atómica.
- Aunque es sencillo de operar se debe tener cuidado con la forma en la que se analizan los resultados.
- La técnica es destructiva.
- Se debe realizar tratamiento previo a las muestras que no son líquidas.

- Pueden presentarse interferencias de tipo espectrales debido a las líneas de emisión de las diferentes especies químicas.

2.2 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras que se analizaron se encontraban en estado sólido, por este motivo se debe realizar un tratamiento a la muestra previo al análisis químico cualitativo y/o cuantitativo que se desee llevar a cabo.

2.2.1 Digestión de la muestra.

Algunas muestras se disuelven fácilmente en agua o en disoluciones acuosas de ácidos y bases comunes, otras requieren reactivos fuertes y tratamientos rigurosos. Elegir correctamente los reactivos y técnicas para la descomposición y disolución de muestras analíticas puede ser crítica para la elaboración del análisis. Debido a que la técnica de ICP-OES tiene mejores resultados con muestras totalmente disueltas es necesario descomponer los sólidos a fin de obtener disoluciones acuosas de los analitos ⁵⁹.

Horno de digestión con Microondas.

Los hornos de microondas se utilizan para la descomposición tanto de muestras inorgánicas como orgánicas. La digestión con microondas se puede llevar a cabo en recipientes abiertos o cerrados, siendo los recipientes cerrados más populares debido a las altas presiones y temperaturas que pueden conseguirse en ellos. Una de las principales ventajas de las descomposiciones con microondas en comparación con otros métodos es la velocidad. La diferencia se debe a los distintos mecanismos por los cuales se transfiere energía a las moléculas en la disolución en ambos métodos, al utilizarse recipientes cerrados se desarrollan temperaturas más altas debido al aumento en la presión, se evitan pérdidas por evaporación, se utilizan cantidades de reactivos menores reduciendo las interferencias por contaminantes y se elimina casi

por completo las pérdidas por componentes volátiles en las muestras. En el método convencional, el calor se transfiere por conducción mientras que en las microondas se transfiere a todas las moléculas de la disolución casi simultáneamente sin calentar el recipiente; en consecuencia, se alcanzan temperaturas de ebullición en toda la disolución de forma muy rápida ⁵⁹.

Recipiente para la digestión.

Los recipientes para la digestión con microondas se fabrican con materiales de bajo costo que son transparentes a las microondas. Dichos materiales son térmicamente estables y resistentes al ataque químico por parte de los diferentes ácidos que se utilizan para las descomposiciones. La descomposición se lleva a cabo en un vaso de teflón que es sostenido por el cuerpo de una bomba (Figura 26). El teflón es transparente a las microondas, tiene un punto de fusión de aproximadamente 300 °C y no es atacado por ninguno de los ácidos comunes. El cuerpo de la bomba es de paredes gruesas, está hecho de un material polimérico que también es transparente a las microondas ⁵⁹.

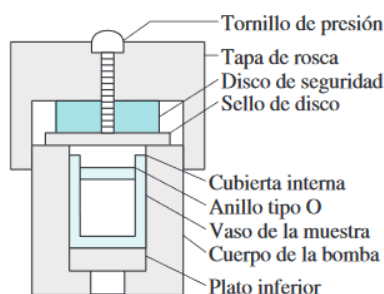


Figura 26. Bomba de alta presión para la descomposición con microondas ⁵⁹.

Digestión con ácido nítrico.

El ácido nítrico concentrado caliente es un oxidante fuerte que disuelve todos los metales comunes, con excepción del aluminio y el cromo, los cuales no son afectados por este reactivo debido a la formación de óxido superficial. El ácido nítrico caliente por sí solo o en combinación con otros

ácidos y agentes oxidantes, como el peróxido de hidrógeno, es ampliamente utilizado para descomponer muestras orgánicas y determinar el contenido de metales traza. El proceso de descomposición, que es llamado calcinación húmeda, convierte a la muestra orgánica en dióxido de carbono y agua. A menos que se lleve a cabo en un recipiente cerrado, los elementos no metálicos, como los halógenos, el azufre y el nitrógeno, se pierden parcial o completamente por volatilización ⁵⁹.

2.3 VALIDACIÓN DEL MÉTODO.

La validación de un método es la confirmación, a través de la aportación de evidencia objetiva, que se han cumplido los requisitos para un uso o aplicación específico, es decir un método debe ser validado cuando es necesario demostrar que sus características de desempeño son adecuadas para el uso previsto ⁶⁰.

Los criterios de desempeño cuantitativos se utilizan para decidir si un método instrumental es adecuado para resolver un problema analítico. Estas características se expresan en términos numéricos que se llaman parámetros de calidad agrupados en Tabla 3.

Las actividades de validación de métodos y el desarrollo de métodos están estrechamente ligadas. La mayoría de las características de desempeño se evalúan durante el desarrollo y también son consideradas durante la validación permitiendo que durante la fase de desarrollo e implementación del método pueden determinarse algunas características de la validación ⁶¹.

La exactitud indica que tan cercano es el resultado de una medición, al valor real cuantitativo determinado (μ), es decir, expresa la proximidad de un resultado a un valor de referencia. Una medida se considera más exacta cuanto más pequeño sea el error de la medida. ⁶².

Criterio	Parámetros de calidad
Precisión	Desviación estándar absoluta, desviación estándar relativa, coeficiente de variación, varianza.
Sesgo	Error sistemático absoluto, error sistemático relativo.
Límite de detección	Blanco más tres veces la desviación estándar del blanco.
Sensibilidad	Sensibilidad de calibración, sensibilidad analítica.
Intervalo dinámico	Límite de cuantificación de la concentración (LOQ) a límite de la linealidad de la concentración (LOL).
Selectividad	Coeficiente de selectividad

Tabla 3. Criterios numéricos para elegir métodos analíticos ⁴⁸.

La validación de métodos trata de investigar la exactitud de los resultados evaluando los efectos sistemáticos y aleatorios sobre resultados individuales. Por lo tanto, normalmente la exactitud se estudia como dos componentes: veracidad y precisión. La veracidad se encuentra estrechamente relacionado con el sesgo y la recuperación del analito en un método, mientras que la precisión esta relacionada con la repetibilidad.

2.3.1 Precisión.

Es el grado de concordancia entre los datos que se obtuvieron de la misma manera. La precisión proporciona una medida del error aleatorio o indeterminado de un análisis. Los parámetros de calidad de la precisión de los métodos analíticos son presentados en la Tabla 4.

Términos	Definición	
Desviación estándar absoluta, s	$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}}$	$\bar{x} = \text{media de } N \text{ medias}$
Desviación estándar relativa (RSD)	$RSD = \frac{s}{\bar{x}}$	
Error estándar de la media s_m	$s_m = \frac{s}{\sqrt{N}}$	$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N}$
Coficiente de variación (CV)	$CV = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \%$	$x_i = \text{valor de la medida}$
Varianza	s^2	

Tabla 4. Parámetros de calidad de la precisión de los métodos analíticos ⁶³.

Repetibilidad.

La "repetibilidad de medición" es una de las medidas de precisión que se pueden obtener, se define como la proximidad de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo mensurando realizadas bajo las mismas condiciones de medición, obtenidas con el mismo método, sobre objetos de prueba idénticos, en el mismo laboratorio, por el mismo operador, usando el mismo equipo y dentro de un intervalo de tiempo corto ⁶⁴. La repetibilidad puede calcularse como la precisión dentro de un grupo mediante ANOVA de un factor ⁶¹.

El análisis de varianza (ANOVA) compara las medias de dos o más poblaciones y prueba si son iguales. Evalúan la importancia de uno o más factores al comparar las medias de la variable de la respuesta. El procedimiento funciona comparando la varianza entre las medias de los grupos y la varianza dentro de los grupos como una manera de determinar si los grupos son todos parte de una población más grande o poblaciones

separadas con características diferentes. Si el valor **p** es menor que el nivel de significancia (α), entonces se concluye que al menos una media es diferente. Para información más detallada sobre las diferencias entre medias específicas, se utilizan métodos de comparaciones múltiples como la prueba HSD de Tukey ⁶⁵. Esta prueba permite comparar las medias entre sí, pero una de las condiciones importantes es que el tamaño de los grupos sea el mismo, es decir tengan el mismo número de repeticiones. En la validación del método el factor es el tiempo así que el ANOVA que se realiza es de un factor pues el resto de las variables en la metodología se mantienen constantes.

2.3.2 Sesgo y recobro.

La veracidad usualmente se expresa cuantitativamente en términos de sesgo (E), se utilizan medidas de tendencia central como la media y mediana (\bar{X}) para calcular el error absoluto o el error relativo ⁶⁶.

Ec. 4

$$E = \bar{X} - \mu$$

Ec. 5

ó
$$E = \frac{\bar{X} - \mu}{\mu} \cdot 100$$

El sesgo está definido como una medida del error sistemático o determinado del método analítico, para determinarlo se necesita analizar uno o más materiales de referencia estándar cuya concentración de analito se conozca. Esta concentración será igual al valor real cuantitativo determinado (μ). Si se repiten las mediciones un suficiente número de veces, alrededor de 20 veces, se puede determinar el valor medio con cierto grado dado de confianza ⁶³. El sesgo total se compone por el sesgo del laboratorio y el sesgo del método.

En el laboratorio de análisis químico 208-209, ubicado en el edificio D del dpto. de Ingeniería Química Metalúrgica en la Facultad de Química de la UNAM, se utiliza la recuperación relativa en porcentaje (%R) que también se conoce como porcentaje de recobro.

Ec. 6

$$\% R = \frac{\bar{x}}{\mu} \cdot 100$$

Para determinar el sesgo se utiliza un estándar certificado, con matriz parecida, como material de referencia. En general este tipo de estándares proporcionan valores trazables ⁶¹. Recordar la Tabla 4 presentada con anterioridad.

2.3.3 Límite de detección (LOD).

El límite de detección (LOD) es la concentración o masa mínima del analito que puede ser detectada con un nivel de confianza conocido. El nivel de confianza está relacionado con la desviación estándar (s_B) y el promedio de la señal detectada en blanco (\bar{B}) por medio de la siguiente ecuación:

Ec. 7

$$LOD = \bar{B} + 3s_B$$

Con esta ecuación el nivel de confianza de la detección será del 95 %.

2.3.4 Intervalo dinámico.

Intervalo dinámico se extiende desde la concentración mínima a la cual se pueden efectuar mediciones cuantitativas, conocida como límite de cuantificación (LOQ) hasta la concentración a la cual la curva de calibración se desvía de la linealidad por una cantidad especificada, conocida como límite de linealidad (LOL) ⁴⁸.

Límite de cuantificación (LOQ).

El límite de cuantificación (LOQ) estará dado por la cantidad de analito que proporciona una señal igual a la del blanco (\bar{B}) más diez veces la desviación estándar del blanco (s_B).

Ec. 8

$$LOQ = \bar{B} + 10s_B$$

En este punto, la desviación estándar es de casi 30 % y disminuye con rapidez a medida que las concentraciones son mayores.

Límite de linealidad (LOL).

Una desviación de 5 % de la linealidad se considera como el límite superior. Las desviaciones de la linealidad son comunes a altas concentraciones debido a las respuestas no ideales de los detectores o a efectos físicos o químicos del analito. Ambos límites ayudan a definir el intervalo lineal de un método analítico ⁴⁸. La espectroscopía de emisión presenta un intervalo lineal bastante amplio (ejemplificado en la Tabla 5) alrededor de 5 a 6 órdenes de magnitud ⁶⁷.

Elemento/Longitud de onda	Intervalo lineal (ppm)
Cu 327.393	300
Mn 257.610	40
Mo 202.031	125

Tabla 5. Intervalo lineal reportado para algunos metales.

2.3.5 Sensibilidad.

Es la variación de la respuesta del instrumento que corresponde a una variación de la magnitud medida, es decir es una medida de la aptitud para discriminar entre pequeñas diferencias de concentración del analito. Hay dos factores que limitan la sensibilidad: la pendiente de la curva de calibración y la reproducibilidad o precisión del dispositivo de medición. De los dos métodos que tienen igual precisión, el que tiene la curva de calibración con mayor pendiente será la más sensible. Al encontrarlos con pendientes iguales para la curva de calibración el que muestre la mejor precisión será el más sensible ⁴⁸.

Curva de calibración.

La calibración determina la relación entre la respuesta analítica y la concentración del analito. Observar Figura 27. La relación se determina mediante estándares químicos.

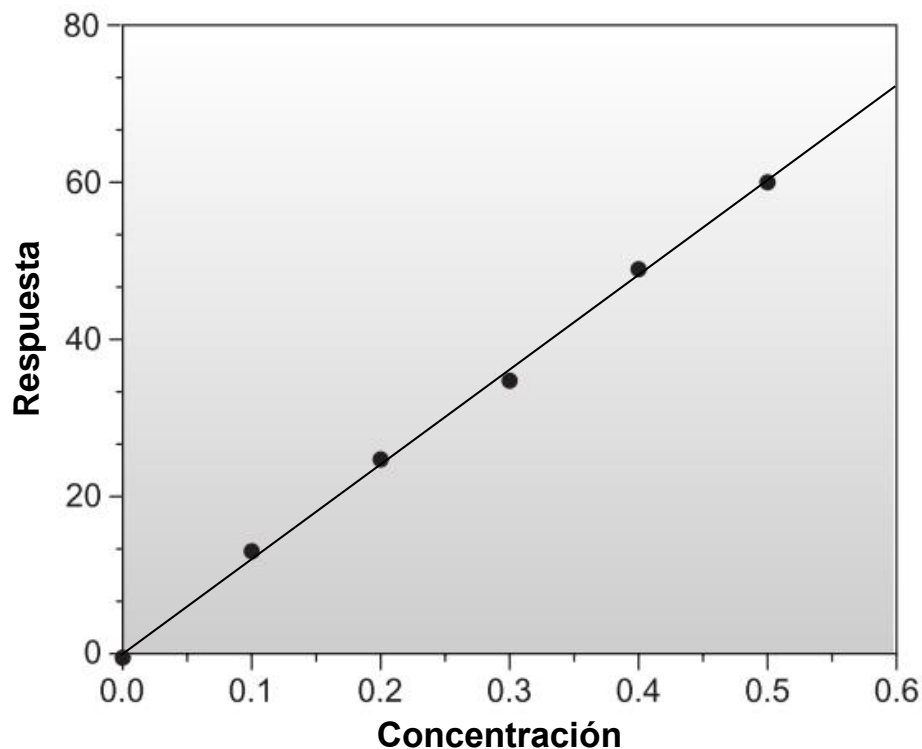


Figura 27. Ejemplo de curva de calibración con respuesta lineal ⁶⁶.

Linealidad.

La linealidad define la habilidad del método para obtener resultados de la prueba proporcionales a la concentración del analito y es un requerimiento fundamental en la práctica del análisis químico cuando se realizan curvas de calibración. La representación gráfica del intervalo de linealidad debe exhibir una buena correlación de los puntos experimentales. Un coeficiente de correlación con valor de uno, indica que los resultados se ajustan perfectamente a una línea recta y un valor igual a cero, indica que no hay ningún tipo de linealidad en los resultados. Este intervalo de linealidad, observado en la Figura 28, permite definir el intervalo de trabajo, para evaluar el intervalo de trabajo, el laboratorio tiene que considerar tanto la linealidad del método como el procedimiento de calibración propuesto indicado en el método ⁶⁴.

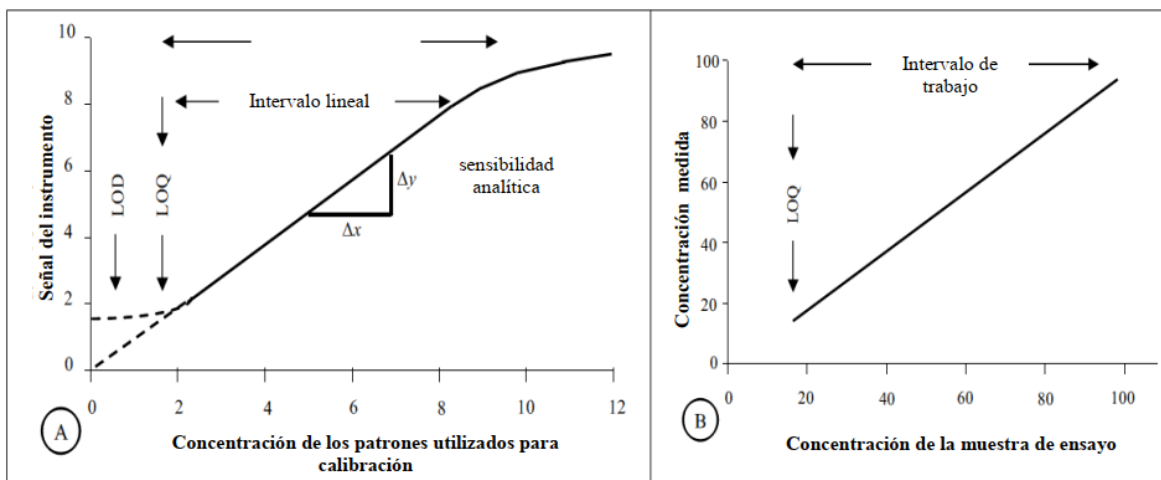


Figura 28. A. Ejemplo típico de una curva de respuesta obtenida con un método instrumental. Se identifican las características de desempeño 'intervalo de trabajo', 'intervalo lineal', 'sensibilidad analítica', 'LOD' y 'LOQ'. B. Ejemplo típico de una curva obtenida con un procedimiento de medición en el que se representa la concentración medida en función de la concentración de la muestra de ensayo ⁶¹.

Al realizar una curva de calibración se recomienda:

- Si el laboratorio se encuentra desarrollando un nuevo método que el número de puntos mínimo sea de cinco o seis para que la variabilidad sea mínima y el intervalo lineal sea suficiente. Se requiere un mínimo de cinco puntos para un intervalo de confianza del 95 % y de ocho puntos para uno del 99 % ⁶⁸. Actualmente el número de puntos utilizados varía de 6 a 10 ⁶¹.
- Realizar cada medición por duplicado o triplicado ⁶¹.
- Los puntos de concentraciones deben encontrarse espaciados uniformemente en el intervalo lineal ⁶¹.
- La concentración de la muestra debe estar incluida en el intervalo de los estándares usados, de preferencia se debe encontrar en un punto intermedio de la recta obtenida.

Al considerar la precisión para el cálculo de la sensibilidad analítica, se obtiene un nuevo término denominado sensibilidad y como cociente de la pendiente de la recta (m) y la desviación estándar de la medida (s_s) ⁶³.

Ec. 9

$$\gamma = \frac{m}{s_s}$$

2.3.6 Selectividad.

Se refiere al grado al cual el método analítico está libre de la interferencia de otras especies contenidas en la matriz de la muestra. Ningún método analítico está libre de interferencias de otras especies y se deben tomar medidas para minimizar los efectos de estas interferencias. Gracias a las características del ICP-OES los espectros de emisión permiten descartar la presencia de interferentes en la muestra.

2.3.7 Robustez.

La "robustez" de un procedimiento analítico es una medida de la capacidad del método para no afectarse por pequeñas variaciones premeditadas de los parámetros del método. La robustez proporciona una indicación de la fiabilidad del método durante su uso normal. El objetivo de esta prueba es optimizar el método desarrollado y establecer las condiciones bajo las cuales se pueden obtener resultados confiables.

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Es necesario desarrollar y validar una metodología para la determinación de los componentes de las muestras biológicas provenientes del hígado de una rata. Adicionalmente, se pretende analizar la tendencia del contenido de elementos en función de la inducción de fibrosis dependiente del tiempo de sacrificio.

4 OBJETIVOS.

4.1 GENERAL.

Desarrollar una metodología analítica utilizando digestión con microondas para la determinación de elementos presentes en muestras de hígado de

rata sano y en distintas etapas de fibrosis hepática, por medio de ICP-OES.

4.2 PARTICULARES.

- Desarrollar una metodología para la digestión de las muestras de hígado de rata utilizando microondas.
- Desarrollar un método para el análisis químico de las muestras de hígado de rata mediante ICP-OES.
- Identificar y cuantificar los elementos de interés en las muestras de hígado de rata.
- Evaluar las interferencias físicas, químicas y espectrales de los elementos analizados (Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo y Zn)
- Identificar y cuantificar los elementos que presentan cambios significativos de concentración en las muestras de hígado de rata.
- Validar parcialmente el método analítico propuesto para la determinación de elementos en muestras de hígado de rata mediante ICP-OES.

5 HIPÓTESIS.

Al lograr el desarrollo de una metodología adecuada para el análisis de la muestra será posible observar alguno de los efectos presentes derivados de la fibrosis hepática inducida.

6 METODOLOGÍA.

6.1 MUESTREO PARA EL HÍGADO DE RATA.

6.1.1 Inducción de cirrosis.

La inducción de fibrosis hepática en ratas y su evaluación histológica se llevó a cabo en la Unidad de Medicina Experimental, UNAM, Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga". En este lugar se estudiaron 20

ratas macho Winstar, de 6 semanas de edad, peso entre 190g y 220g. Se formaron aleatoriamente 4 grupos de 4 ratas a los que se les indujo fibrosis con una disolución al 33 % en aceite de oliva de tetracloruro de carbono (CCl₄). Se les administró intra-peritonealmente una dosis inicial de 250 µL dos veces por semana. La dosis fue ajustada después de aumentar la masa de la rata un 20 % del peso inicial a 1 µL/g por semana. Los grupos de ratas fueron sacrificados en diferentes periodos de inducción de fibrosis. Se añadió otra rata Winstar como "control" a la que se le inyectó aceite de oliva como placebo, para simular las condiciones de crianza y estrés de los animales dando un total de 5 ratas por grupo. El método general se describe en la Tabla 6 ⁶⁹.

Grupo	Total de ratas estudiadas (n)	Tiempo de tratamiento
T1	4 + 1 (control)	4 semanas
T2	4 + 1 (control)	8 semanas
T3	4 + 1 (control)	12 semanas
T4	4 + 1 (control)	18 semanas

Tabla 6. Grupos de ratas con fibrosis inducida

6.1.2 Muestreo.

Para obtener la muestra a analizar se sacrificaron a las ratas y se extrajo el hígado entero para ser conservado en una solución amortiguada con PBS (amortiguador fosfato salino) de formaldehído 3.8 %. La composición del PBS se presenta en la Tabla 7 ¹⁹.

Compuesto	Concentración (mmol/L)
NaCl	137
KCl	2.7
Na₂HPO₄	8.1
KH₂PO₄	1.5

Tabla 7. Composición del amortiguador fosfato salino.

Al laboratorio del grupo de trabajo de la Facultad de Química que elaboró el presente trabajo, se entregaron algunos fragmentos del lóbulo medial derecho (señalado en la Figura 29) de los hígados y otros trozos adicionales pertenecientes al lóbulo lateral izquierdo esto con la finalidad de desarrollar la metodología de análisis de elementos por medio de ICP-OES y poder comparar a futuro esta técnica con la identificación de elementos por medio de Espectroscopía de Rompimiento Inducido por Láser ¹⁹.

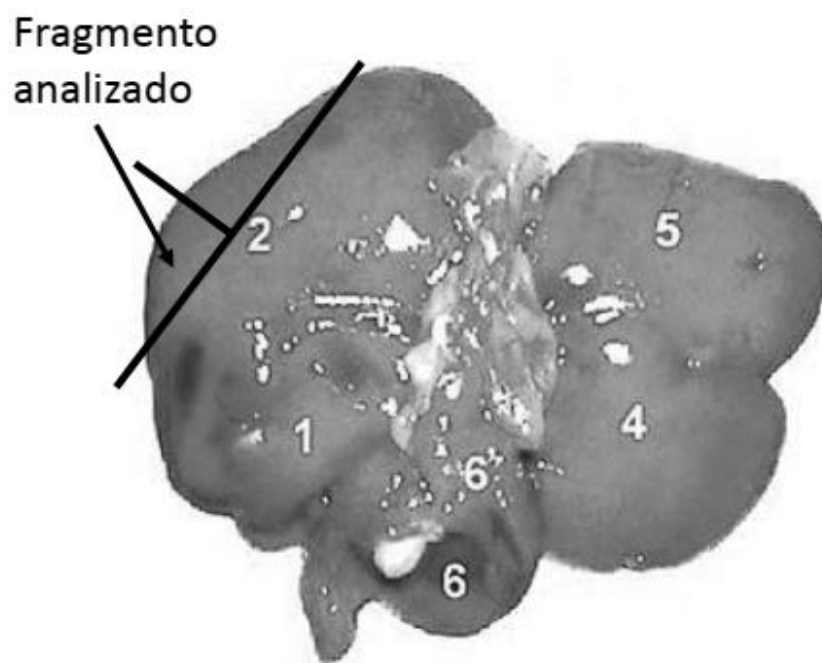


Figura 29. Cara visceral del hígado. 1. Lóbulo lateral derecho; 2. Lóbulo medial derecho; 4. Lóbulo lateral izquierdo; 5. Lóbulo medial izquierdo; 6. Proceso caudado del lóbulo caudado ¹⁹.

Cada hígado fue analizado histológicamente en tres regiones diferentes, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas en los diagnósticos asignados a cada hígado uno ⁷⁰.

La Tabla 8 presenta las muestras analizadas con la nomenclatura registrada en el ICP-OES (Columna 1) y los pesos correspondientes (Columna 2). La descripción de la nomenclatura (Columna 3) reasignada para cada muestra es dependiente de la rata sacrificada en cada grupo, el modelo utilizado, el tiempo de sacrificio y la zona del hígado. Esta

nomenclatura ayuda a identificar las muestras en los resultados y su respectivo análisis.

Las primeras dos letras en la reasignación de nomenclatura significan:

- RA, RB, RC y RD: La primera letra "R" denota que se trata de una muestra de hígado a la que se le inyectó la disolución al 33 % en aceite de oliva de CCl₄. Las cuatro ratas a las que se les indujo cirrosis se identificaron como la letra A, B, C o D, en la segunda posición para diferenciarlas entre sí.
- CN: Se trata de la muestra control de cada grupo (T1, T2, T3 y T4).
- CR: Repetición de la muestra control. Misma muestra sólida, pesada, digerida y analizada por separado.
- FL y FS: La primera letra "F" significa que estas muestras se encuentran fuera del modelo, es decir, se inyectó el aceite de oliva, pero no se criaron en conjunto con el resto de las ratas. Si la muestra fue liofilizada (congelada y posteriormente introducida a una cámara de vacío para separar el contenido de agua por sublimación) la segunda letra será "L". Si la muestra fue secada en con la estufa la segunda letra será "S".

Las 2 letras consecuentes significan:

- T1, T2, T3 y T4: El grupo al que pertenecen, es decir, el momento en que fue sacrificada la rata.
- TD: Ratas fuera de modelo que fueron sacrificadas a las 6 semanas de edad.

Las últimas dos letras denotan la zona del hígado de rata que fue muestreado:

- MD: Se trata de un segmento de lóbulo medial derecho.
- LI: Se trata de un segmento de lóbulo lateral izquierdo.

Nomenclatura de muestras registradas en el equipo	Masa (g)	Reasignación de nomenclatura
M5T2BLP	0.1002	RBT2LI
M5T2ALP	0.1017	RAT2LI
M5T2S (B)	0.0688	CNT2MD
M5T2S (A)	0.067	CRT2MD
M HR SANO	0.0326	FSTDMD
M5T3C	0.0517	RCT3MD
M5T4B	0.0488	RBT4MD
M5T3A	0.0519	RAT3MD
M5T4E	0.0512	RDT4MD
M5T2B	0.052	RBT2MD
M5T4SLP	0.0377	CNT4LI
M5T3CLP	0.0593	RCT3LI
M5T4BLP	0.0496	RBT4LI
Liofilizada	0.0445	FLTDMD
M5T1B	0.1050	RBT1MD
M5T1BLP	0.0510	RBT1LI
M5T3SLP	0.1335	CNT3LI
M5T3S	0.0698	CNT3MD
M5T2A	0.0670	RAT2MD

Tabla 8. Muestras recibidas por el laboratorio de análisis químico

Tres histopatólogos de la Unidad de Medicina Experimental evaluaron (de manera independiente) 160 imágenes para diagnosticar el grado de fibrosis en las 4 ratas inyectadas con CCl₄, dando un total de 16 hígados analizados por medio de 10 cada uno. Las ratas control no fueron inyectadas con CCl₄ por lo que se asumió que no tenían fibrosis. El diagnóstico se hizo de acuerdo con el puntaje METAVIR. La escala METAVIR gradúa la fibrosis en 5 estadios: F0 (ausencia de fibrosis), F1

(fibrosis portal), F2 (fibrosis periportal), F3 (puentes de fibrosis entre espacios porta) y F4 (cirrosis).

Los resultados estadísticos del puntaje METAVIR se obtuvieron de la referencia ¹⁹. En los resultados presentados en la Tabla 9 se observa que la dispersión de la enfermedad no es uniforme.

T1	Moda	Promedio ± σ	T3	Moda	Promedio ± σ
A	F1	1.0 ± 0.0	A	F2	2.4 ± 0.3
B	F3	2.6 ± 0.5	B	F3	3.3 ± 0.7
C	F2	1.7 ± 0.5	C	F3	2.6 ± 0.5
D	F1	1.3 ± 0.5	D	F3	3.1 ± 0.3
T2	Moda	Promedio ± σ	T4	Moda	Promedio ± σ
A	F1	1.4 ± 0.3	A	F4	3.9 ± 0.1
B	F2	1.9 ± 0.5	B	F4	4.0 ± 0.0
C	F2	1.6 ± 0.5	C	F3	2.7 ± 0.5
D	F2	2.0 ± 0.5	D	F4	3.8 ± 0.4

Tabla 9. Estadísticas del puntaje METAVIR de imágenes por muestra para los diferentes grupos.

6.2 INSTRUMENTACIÓN Y EQUIPO.

6.2.1 Secado de muestra.

El secado de la muestra se realizó con una estufa *Heraus* RB360, ver Figura 30, cuenta con orificio en la parte superior donde se colocó un termómetro para verificar que la temperatura estuviera entre 50-80 °C.



Figura 30. Estufa Heraus RB360

6.2.2 Digestión de la muestra.

La digestión de la muestra se realizó con un horno de microondas *High Performance Microwave Digestion Unit 1200*. Cuenta con 6 tubos de teflón para digestión. Ver Figura 31.



Figura 31. Horno de microondas "High Performance Microwave Digestion Unit 1200" con tubos, tapas y camisas de digestión.

6.2.3 Análisis químico de la muestra.

El instrumento utilizado para el análisis químico es un ICP-OES OPTIMA 4300 DV (Figura 32) ubicado en el laboratorio 208-209 del edificio "D" del departamento de Ingeniería Química Metalúrgica de la Facultad de Química en la UNAM.



Figura 32. Equipo ICP-OES OPTIMA 4300 DV ubicado en la Facultad de Química, UNAM.

6.3 MATERIAL Y REACTIVOS.

El material y reactivos empleados durante todo el desarrollo experimental se enlistan a continuación:

Material

- Matraces volumétricos clase A marca Kimax de 10 mL, 25 mL, 50 mL y 100 mL
- Micropipetas marca *Labsystems* 500 μ L, 100 μ L y 50 μ L.
- Espátula de metal.
- Mortero de ágata con pistilo.
- Tubos Falcon polipropileno de 15 mL.
- Vasos de precipitados.
- Vidrio de reloj.
- Termómetro de mercurio.
- Envases de plástico.
- Balanza analítica *Ohaus* modelo *Analytical Plus*.

Reactivos

- Ácido nítrico concentrado 65 % marca *Suprapur*.

- Gas argón Grado 4.8 marca INFRA.
- Estándar Primario S-21 marca PerkinElmer.
- Agua desionizada ASTM tipo 1 (conductividad eléctrica a 25 °C, 0.056 µS/cm).
- Peróxido de Hidrógeno grado analítico marca J.T. Baker.
- Estándar de hígado bovino "SMR 1577c" certificado por el NIST.
- Disoluciones QC (Control de calidad) de 100 ppb de la marca PerkinElmer.

6.4 PREPARACIÓN DEL EQUIPO.

Antes de introducir la muestra, es necesario verificar la limpieza de los inyectores, antorcha, cámara de rocío y nebulizador, así como verificar que funcionen de forma adecuada todos los componentes, posteriormente se enciende el recirculador, el extractor y el equipo; el tanque de argón debe abrirse una vez que se verifique la cantidad necesaria para realizar el análisis (presión de entrada de 80 psi). El equipo ICP-OES requiere encenderse aproximadamente 4 horas previo al experimento. En este tiempo el espectrómetro y el detector alcanzan la temperatura ideal para disminuir la resistividad de los componentes en el equipo (-40 °C).

6.5 MÉTODO EMPLEADO.

6.5.1 Optimización de condiciones.

Con el objetivo de obtener resultados con mejor sensibilidad y precisión se ajustan los parámetros del ICP-OES. Los parámetros utilizados para las muestras biológicas analizadas son óptimos con los valores presentados en la Tabla 10.

Potencia (W)	Flujo de bomba peristáltica (mL/min)	Visión de lectura	Nebulizador (L/min)	Tiempo de lectura (s)	Flujo de Argón		
					Neb (L/min)	Plasma (L/min)	Aux (L/min)
1400	2.0	Axial	0.5	15	0.5	15	0.2

Tabla 10. Optimización de parámetros para muestras biológicas.

6.5.2 Desarrollo experimental.

Las muestras de hígado de rata se conservaron en formaldehído al 3.8 % de alta pureza y posteriormente se realizó el análisis del contenido de elementos vía ICP-OES. El tratamiento de la muestra fue el siguiente:

- A. El formaldehído de la muestra se filtró con un embudo de decantación rápida; pequeños trozos de la muestra se colocaron en un tubo Falcon de 15 mL.
- B. Las muestras se introdujeron en un Horno Heraew entre 50-80°C y se determinó la masa cada 4 h hasta observarse constante. El periodo de secado fue de 1-2 días.
- C. En un mortero de Agatha se molió el hígado hasta obtener un polvo fino de aspecto uniforme.
- D. Se pesaron alrededor de 0.03 a 0.10 g de la muestra seca
- E. Se introdujo la masa pesada en el tubo de digestión.
- F. Se agregaron con 5 mL de HNO₃ suprapuro y 2 mL de H₂O₂ grado analítico al tubo de digestión. La masa pesada por muestra se indica en la Tabla 8 presentada con anterioridad.
- G. Se procedió a tapar los tubos de digestión y colocar las "capuchas" cuidando que no haya residuos líquidos o sólidos en las paredes externas del tubo de digestión, esto con la finalidad de evitar dañar el tubo durante la reacción. Al terminar se ajustaron todos los recipientes al carrusel.

H. Se aplicó el programa para "Muestras orgánicos con reacciones exotérmicas rápidas" detallado en la Tabla 11. El límite de masa para esta digestión es igual a 0.75g de muestra.

Potencia (W)	Tiempo (min)
250	1
0	2
250	5
400	5
600	5

Tabla 11. Programa de digestión para el equipo Milestone "High Performance Microwave Digestion Unit 1200".

- I. Al terminar la reacción se debe manejar con extrema precaución los tubos de digestión debido a que la reacción desprende vapores. Los tubos de digestión se colocaron en un baño de agua fría.
- J. Una vez enfriados, el líquido al interior fue decantando a un matraz aforado de 10 mL y llevado a la línea de aforo con agua desionizada.
- K. La muestra se analizó en un equipo ICP-OES OPTIMA 4300 DV.

Control de calidad.

Para verificar el funcionamiento del ICP-OES, se cuantificaron los elementos de interés con un control de calidad (QC) de 100ppb y se obtuvo el porcentaje de recobro.

Los resultados se presentan en la Tabla 12:

Analito	QC₁	RSD₁	QC₂	RSD₂	QC₃	RSD₃
Ca	91.7997	1.72779	95.8898	4.00436	94.8448	1.36755
Cu	92.2900	1.80920	98.9198	1.35114	98.9088	2.39495
Fe	96.9052	2.11148	93.8801	1.48119	98.2808	0.79107
Mg	93.5563	1.57970	100.836	0.76622	101.231	0.84563
Mn	94.3390	1.36493	95.4743	1.14865	96.3622	1.39293
Mo	93.7149	1.81815	92.4236	2.86801	94.3229	0.32801
Zn	93.8781	1.93168	91.8962	2.47640	92.0156	0.95080

Tabla 12. Resultados del porcentaje de recobro para el control de calidad.

Las detecciones se realizaron 3 veces por triplicado. Todos los porcentajes de recobro se encuentran entre 90 % y el 102 %, con estos resultados se confirmar que el instrumento opera adecuadamente.

6.5.3 Validación preliminar del método empleado.

Para la validación preliminar del método se utilizó un estándar certificado de hígado bovino. En el laboratorio de trabajo se reportan lo siguientes criterios para la validación:

- La desviación estándar y el RSD para la precisión.
- Análisis de Varianza (ANOVA) para determinar la repetibilidad de la técnica.
- El porcentaje de recobro para la veracidad.
- El límite de detección y el límite de cuantificación.
- Las curvas de calibración para evaluar la sensibilidad (pendiente de la curva) y linealidad (coeficiente de correlación lineal).
- Las interferencias espectrales para la selectividad.
- La comparación de otros métodos desarrollados en el equipo de trabajo para la robustez.

Se llama a esta validación “preliminar” pues aún no se ha elaborado un protocolo normalizado de trabajo (PNT), ni se han realizado pruebas de

reproducibilidad (inter-laboratorio), sin embargo, los datos y el estudio realizado hasta el momento confirman el diseño exitoso de la metodología.

Curva de Calibración.

Las curvas de calibración fueron procesadas con software WinLab 32 y se obtuvieron para cada uno de los elementos en el estándar, sin embargo, solo se reportan aquellas que fueron de utilidad para el análisis del contenido de elementos en las muestras.

Preparación de los estándares de calibración.

En la Tabla 13 se enlistan las concentraciones por elemento de los estándares multielementales empleados en las diluciones para la curva de calibración, al realizar esta curva es necesario interpolar por medio de una relación lineal entre la concentración de los estándares de referencia y la intensidad de luz detectada.

Estándar	Elementos presentes y su concentración [mg/L]
Estándar Multielemental de Control de Calidad 21	As, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Sr, Ti, Tl, V, Zn. Todos con C = 100 mg/L

Tabla 13. Estándares utilizados (PerkinElmer) y las concentraciones de los elementos contenidos.

La curva de calibración se determinó con 7 puntos, la preparación de las diluciones y el material empleado se detalla en la Tabla 14 presentada a continuación. Adicionalmente, se emplearon las Ecuaciones 10 y 11, para calcular la concentración final de cada elemento.

Ecuación 10

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Donde:

C_1 = Concentración inicial (estándar de calibración) [=] ppm

V_1 = Volumen de la alícuata (estándar de calibración [=] L

C_2 = Concentración final (punto de la curva de calibración) [=] ppm

V_2 = Volumen final (matraz aforado) [=] L

La concentración inicial para los elementos es la reportada en la Tabla 13, a excepción del primer punto de calibración (0.02 ppm) que se prepara a partir de una disolución de concentración igual a 1 ppm. La concentración final es la utilizada para los 7 puntos de calibración (0.02 ppm, 0.05 ppm, 0.1 ppm, 0.15 ppm, 0.5 ppm, 1 ppm, 5 ppm) donde 1 ppm es equivalente a 1 mg/L.

Para preparar las disoluciones se usaron matraces aforados de 10 mL y 100 mL, por lo tanto, se debe calcular el volumen de la alícuota, tomado con micropipetas de volumen fijo LABSYSTEMS de 50 μ L, 100 μ L y 500 μ L.

El despeje para la Ecuación 11 es el siguiente:

Ecuación 11. Ejemplo de cálculo.

Punto de la curva: 5 ppm/ Matraz: 100 mL/ Estándar: 100 ppm

$$V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1} = \frac{5 \frac{mg}{L} \cdot 10 mL \cdot 1000 \mu L}{100 \frac{mg}{L} \cdot 1 mL} = 500 \mu L$$

Concentración del punto (ppm)	Volumen del matraz (mL)	Concentración del estándar inicial (ppm)	Volumen de alícuota (µL)
0.02	10	1*	200
0.05	100	100	50
0.10	100	100	100
0.15	100	100	150
0.50	10	100	50
1.0	10	100	100
5.0	10	100	500

Tabla 14. Volumen de alícuota utilizado para la realización de los puntos en la curva de calibración.

En la Tabla 15 se enlistan las concentraciones finales esperadas por elemento asociadas a cada punto de calibración.

Elemento	Concentración del punto de calibración (ppm)	Concentración del elemento esperada (ppm)
Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Zn.	0.02, 0.05, 0.10, 0.15, 0.50, 1.0, 5.0.	0.02, 0.05, 0.10, 0.15, 0.50, 1.0, 5.0

Tabla 15. Concentración de los elementos en el punto de la curva de calibración.

Resultados reportados por el software del ICP-OES.

Todas las curvas de calibración (Figura 33 - Figura 39) presentan un coeficiente de correlación lineal alto y superior a 0.999. En la superior izquierda aparece la longitud de onda (nm) para el análisis de cada uno de los analitos.

Ca 317.933

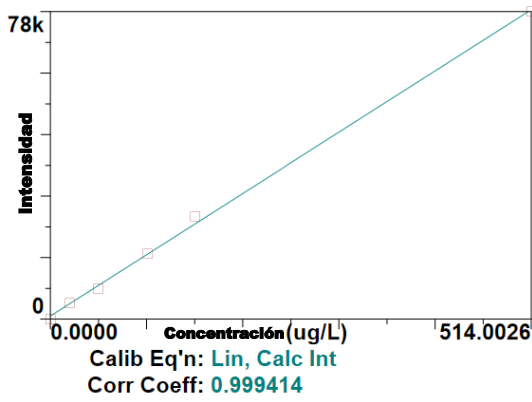


Figura 34. Curva de calibración para el calcio.

Cu 327.393

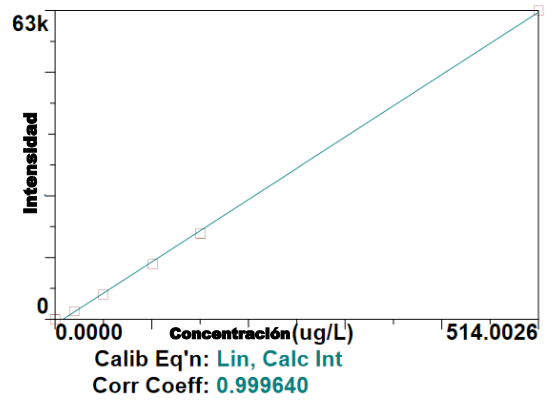


Figura 33. Curva de calibración para el cobre.

Fe 238.204

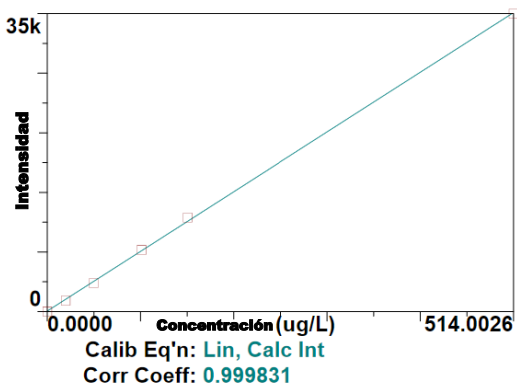


Figura 35. Curva de calibración hierro.

Mg 285.213

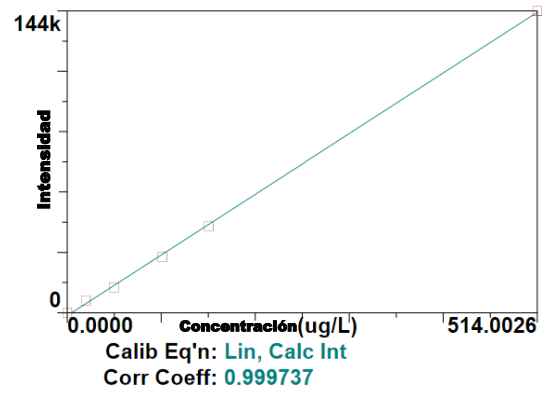


Figura 36. Curva de calibración magnesio.

Mn 257.610

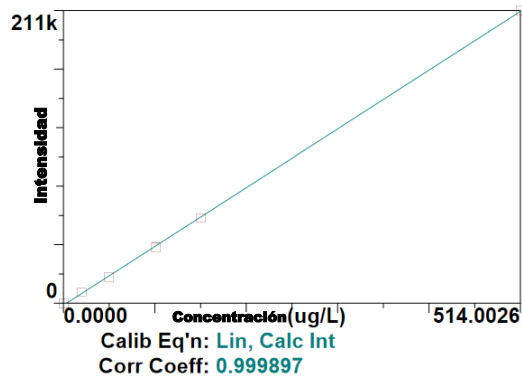


Figura 37. Curva de calibración del manganeso.

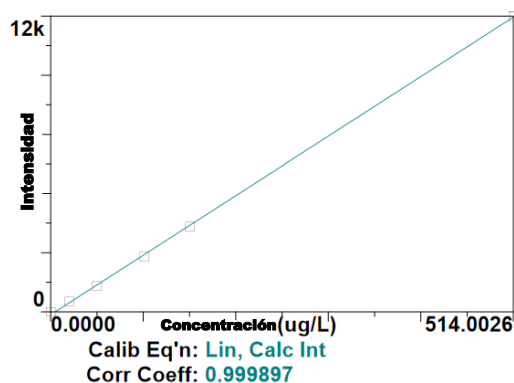
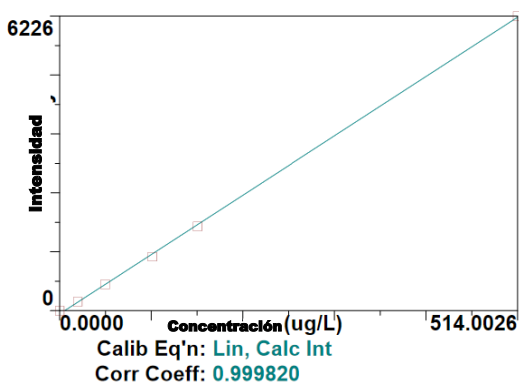


Figura 38. Curva de calibración para el molibdeno Figura 39. Curva de calibración para el zinc

Interferencias espectrales.

Observando los espectros del estándar certificado de hígado de bovino se detectan algunas interferencias en la mayoría de las concentraciones de los elementos propuestos a cuantificar en esta metodología. A continuación, se enlistan esas interferencias:

- Desviación de fondo simple: En la Figura 40 se observa un desplazamiento (menor al 10 % de la intensidad en el punto más alto) hacia abajo de la línea base del espectro, dado que el desplazamiento no se presenta en el blanco ni en los estándares de calibración, pero sí en el blanco de digestión y el estándar de hígado bovino, este desplazamiento se puede atribuir a los efectos de la matriz orgánica de la muestra y a la presencia de los ácidos utilizados para la digestión, sin embargo, el efecto es mínimo e incluso puede estar asociado a la variación de ruido en el instrumento. Esta interferencia se corrige fácilmente con el software WinLab32.

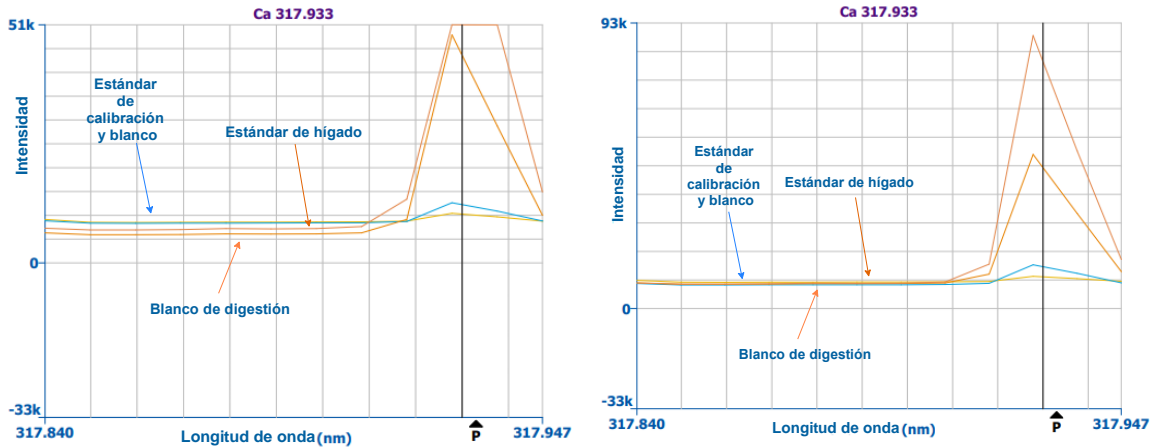


Figura 40. Desviación de fondo simple. A la derecha se encuentra el espectro de emisión para el calcio sin la traslación de la línea base. A la izquierda se encuentra el espectro corregido.

- Corrimiento en el punto máximo del espectro: El punto máximo de intensidad se encuentra desplazado ligeramente, sin embargo, no es un error ocasionado por la muestra, pues también se percibe en el blanco y puntos de calibración, se puede atribuir al equipo y no representa un problema para el análisis, puede corregirse con el software WinLab32 como se observa en la Figura 41.

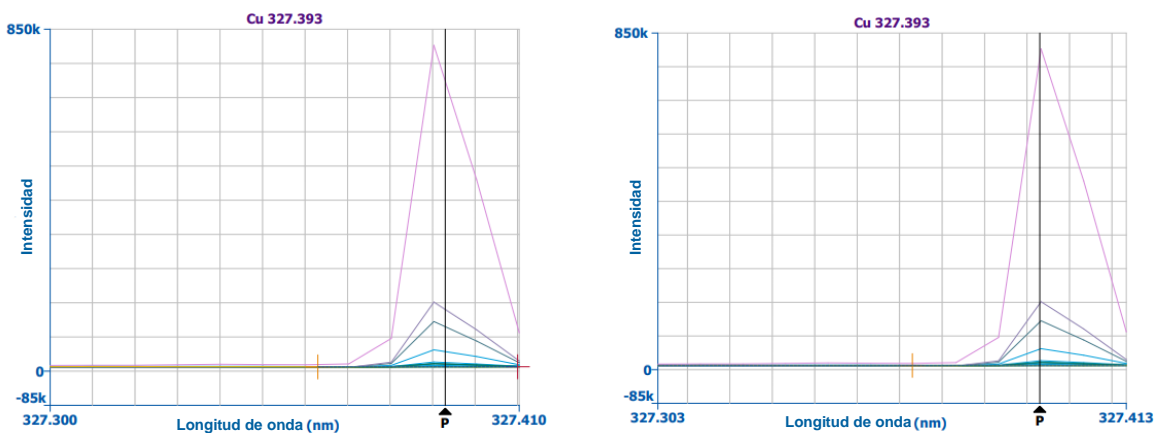


Figura 41. Corrimiento del punto máximo de intensidad. A la derecha se encuentra el espectro de emisión para el Cobre previo a la corrección del método. A la izquierda se encuentra el espectro ajustado a la longitud de onda correcta para el Cobre.

- Interferencias restantes: No se observaron variaciones de pendiente, traslape espectral directo ni desviación compleja de

fondo. A continuación, se presentan los espectros correspondientes a cada elemento (Figura 42 - Figura 48) con la finalidad de demostrar la selectividad del método. Los espectros ya cuentan con la corrección por desviación de fondo simple y corrimiento del punto máximo:

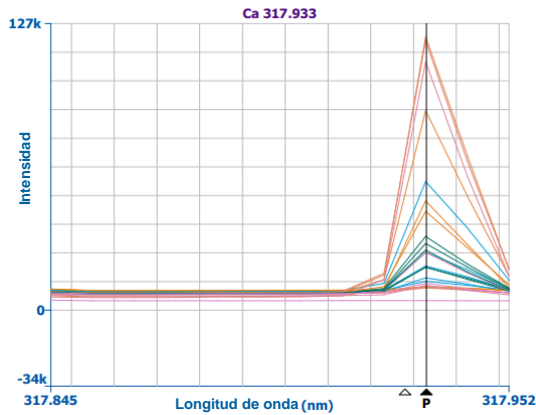


Figura 42. Espectro de emisión para el Ca.

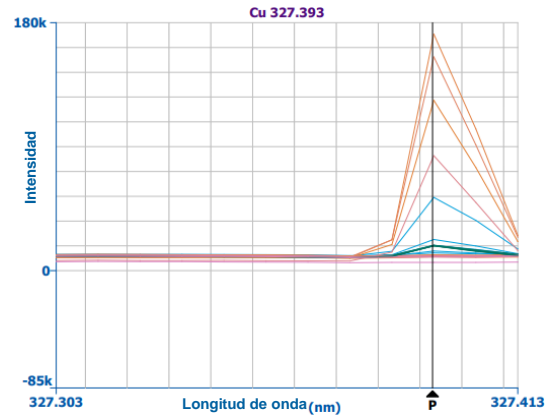


Figura 43. Espectro de emisión para el Cu.

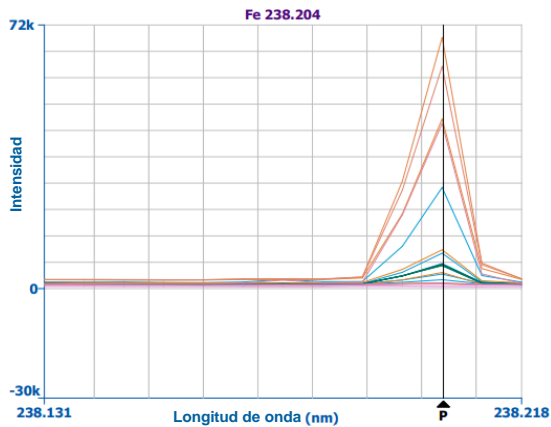


Figura 44. Espectro de emisión para el Fe

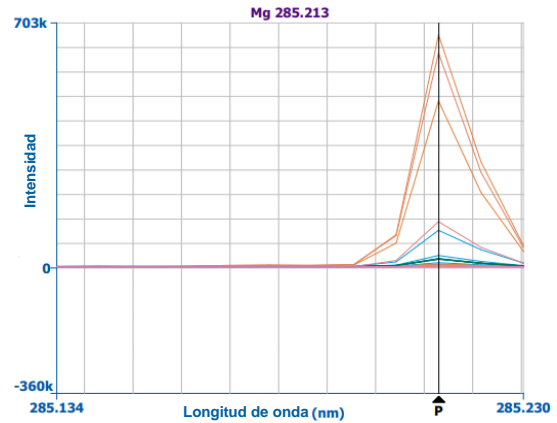


Figura 45. Espectro de emisión para el Mg.

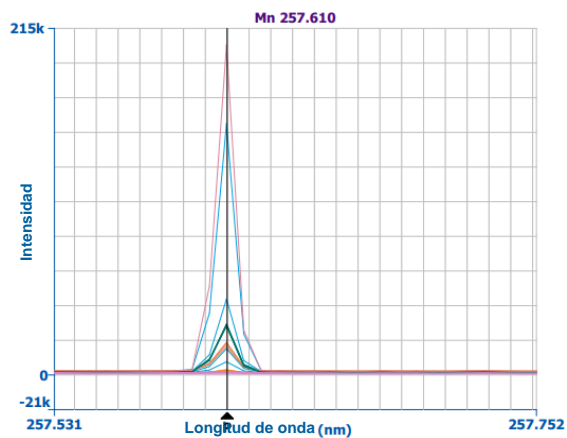


Figura 46. Espectro de emisión para el Mn.

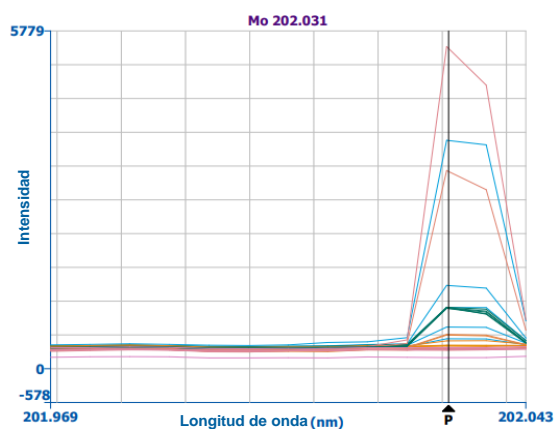


Figura 47. Espectro de emisión para el Mo.

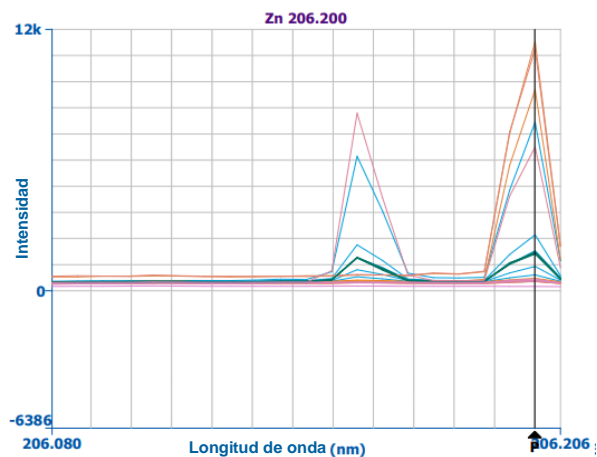


Figura 48. Espectro de emisión para el Zn.

Los altos porcentajes de recobro y la preservación de la forma de los espectros de emisión demuestran la baja interferencia de otras especies para los elementos analizados por lo que se puede suponer que no hay interferencias de fondo complejo significativas y el análisis es posible a las longitudes de onda propuestas.

Tabla conjunta de los parámetros utilizados para la validación del método.

En la Tabla 16 se engloban todos los parámetros numéricos necesarios para la validación del método, como se mencionó con anterioridad, esta validación empleó un estándar de hígado bovino con clave 1577c y una masa de 0.1 g, posterior a la digestión, la muestra fue aforada a un volumen final igual a 13 mL en un matraz volumétrico de clase A. La digestión y análisis se realizaron de la misma forma propuesta en la sección **6.5.2**.

Analito	Concentración (ppm)	s	RSD	Recobro (%)	(LOD) Límite de detección	(LOQ) Límite de cuantificación	Sensibilidad m _{calibración}	Linealidad (r)
Ca	0.7379	0.090	7.68	73.231	0.464	0.538	148.96	0.9994
Cu	1.7154	0.110	6.38	81.030	0.012	0.016	138.96	0.9996
Fe	1.0893	0.084	7.26	71.540	0.067	0.078	54.771	0.9998
Mg	3.0633	0.197	6.40	64.229	0.010	0.012	311.21	0.9997
Mn	0.0503	0.004	6.66	62.541	0.008	0.009	412.05	0.9999
Mo	0.0295	0.001	2.43	116.27	0.007	0.013	12.197	0.9998
Zn	0.7701	0.061	7.90	55.275	0.009	0.012	25.834	0.9999

Tabla 16. Parámetros para la validación de método.

Los porcentajes de recobro para el Mg, Mn y Zn se encuentran por debajo de lo necesario para calificar la determinación de contenido como "cuantitativa". Esto puede ser consecuencia del bajo rendimiento de digestión, que evitó que estos elementos se disolvieran adecuadamente en la mezcla de ácidos o bien al alto contenido de los analitos en el blanco de digestión. La concentración de molibdeno determinada es más del porcentaje de la que se supone tiene el estándar, este error puede ser introducido por el ruido del equipo, por el contenido presente en el blanco de digestión, o bien alguna interferencia física o química, dado que la concentración de molibdeno en la muestra es muy baja. Es necesario aumentar la masa digerida si se requiere cuantificar este metal. El resto

de los elementos pueden ser cuantificados bajo los criterios de este laboratorio y aunque el porcentaje de recuperación de Mg, Mn y Zn no son los esperados los resultados obtenidos bajo esta metodología dan información de la tendencia que sufren estos elementos “cualitativamente” para las etapas de fibrosis inducida.

Repetibilidad (ANOVA).

Los resultados presentados para al análisis de repetibilidad se reportan en mg de analito en cada kg de muestra $\left[C = \frac{\text{mg de analito}}{\text{Kg de muestra}} \right]$. El algoritmo de cálculo se presenta a continuación:

$$\text{Ec. 12} \quad C_{mg/Kg} = (S_D - S_B) \frac{V_a}{m_d}$$

$$\left[C_{mg/Kg} \right] = \left[(\Delta ppm) \frac{V_a \text{ en mL}}{m_d \text{ en g}} \right] = \frac{mg}{L} \cdot \frac{mL}{g} \cdot \frac{1 L}{1000 mL} \cdot \frac{1000 g}{1 Kg}$$

Donde:

S_D : Es la señal detectada para la muestra.

S_B : Es la señal detectada para el blanco.

V_a : Es el volumen de aforo en mililitros.

m_d : Es la masa digerida de muestra en gramos.

La prueba de repetibilidad se realizó utilizando la calculadora en línea disponible en la referencia ⁷¹, se planteó el análisis de varianza de un vía de muestras independientes para comparar la medias obtenidas para cada grupo de datos. Las determinaciones de contenido de elementos se realizaron el mismo día, en el mismo equipo, con la misma curva de calibración, en tres grupos diferentes, cada medición por triplicado. Los datos utilizados para el análisis de varianza se presentan en la Tabla 17:

Prueba/ Concentración	Ca $\left[\frac{mg}{Kg}\right]$	Cu $\left[\frac{mg}{Kg}\right]$	Fe $\left[\frac{mg}{Kg}\right]$	Mg $\left[\frac{mg}{Kg}\right]$	Mn $\left[\frac{mg}{Kg}\right]$	Mo $\left[\frac{mg}{Kg}\right]$	Zn $\left[\frac{mg}{Kg}\right]$
Prueba 1 C₁	119.91	266.985	172.234	478.113	7.971	4.556	122.445
Prueba 1 C₂	116.83	266.705	168.918	474.887	7.784	4.305	119.038
Prueba 1 C₃	95.233	238.217	149.025	425.463	6.890	4.556	105.048
Prueba 2 C₁	111.42	285.734	161.204	492.832	7.842	3.775	118.776
Prueba 2 C₂	116.83	290.454	162.218	501.837	8.059	3.797	119.254
Prueba 2 C₃	118.00	292.711	165.602	505.319	8.088	3.766	118.776
Prueba 3 C₁	91.428	204.232	156.281	491.517	8.259	3.796	123.663
Prueba 3 C₂	87.707	289.006	155.422	490.378	8.376	3.866	126.866
Prueba 3 C₃	89.637	290.432	150.928	479.068	8.229	3.798	123.568

Tabla 17. Resultados utilizados para la prueba de análisis de varianza.

Para determinar si cualquier diferencia entre las medias es estadísticamente significativa, se compara el valor **p**, presentado en la Tabla 18, con el nivel de significancia para evaluar la hipótesis nula. La hipótesis nula indica que las medias de población son todas iguales. El nivel de significancia (α) utilizado es del 0.05, es decir la prueba es 95 % confiable ⁶⁵. Al realizar la prueba de hipótesis los resultados pueden ser:

- Valor de $p \leq 0.05$: Las diferencias las medias son estadísticamente significativas para algún caso.
- Valor de $p > 0.05$: Las diferencias entre las medias no son estadísticamente significativas.

Analito	Valor de p	Conclusión
Ca	0.0172	No es repetible
Cu	0.4128	Es repetible
Fe	0.3129	Es repetible
Mg	0.0783	Es repetible
Mn	0.0987	Es repetible
Mo	0.0001	No repetible
Zn	0.1930	Es Repetible

Tabla 18. Resultados de repetibilidad.

Adicionalmente, se realizó una prueba HSD de Tukey (Tabla 19) para los analitos que no son repetibles, esto con la finalidad de verificar las diferencias en las medias aritméticas de los grupos entre sí.

Analito	Tukey	Observaciones
Ca	$\mu_1 = \mu_2$ $\mu_1, \mu_2 \neq \mu_3, p < 0.05$	Solo la media de la prueba tres es diferente.
Mo	$\mu_2 = \mu_3$ $\mu_2, \mu_3 \neq \mu_1, p < 0.1$	La media de la prueba 1 es diferente a las otras dos.

Tabla 19. Resultados de la prueba de Tukey.

Si se ajusta el intervalo de confianza al 90 % la determinación de Ca sería repetible, esta información junto con la prueba de Tukey permite decidir usar este diseño experimental para la determinación cualitativa del metal. Es necesario realizar una segunda prueba de repetibilidad para el Ca pues el experimento 3 no es repetible comparado con los otros dos

experimentos. Para verificar esta hipótesis es necesario hacer un análisis estadístico con más datos y descartar la posibilidad de que la prueba tres se trate de un error ocasionado por alguna impureza en el sistema de inyección de la muestra o sea un caso aislado por alguna variación en el equipo, método de digestión o contaminantes en el material de vidrio utilizado.

Gracias al análisis de varianza y a la prueba de Tukey, se comprueba que la determinación de molibdeno no es repetitiva y la variación entre los datos extraídos por el equipo es muy alta, a diferencia del calcio en el que se utilizan los datos para realizar un estudio cualitativo, para el molibdeno se decidió que la falta de repetibilidad sumada a la relación de la concentración del blanco (15 %) con la señal detectada ocasiona que las mediciones no sean confiables.

Robustez.

Aunque no se diseñó una prueba estricta de robustez para la metodología, la concentración para las muestras de hígado de rata varía comparadas con el estándar bovino. Mientras se desarrollaba la metodología, la concentración de elementos en la muestra era superior al punto más alto en la curva de calibración, por lo que se agregaron puntos de estándares iguales a 1 ppm y 5 ppm. Las propiedades de linealidad no cambiaron significativamente. Adicionalmente, se sabe por proyectos desarrollados con anterioridad en el laboratorio de trabajo ⁵⁷ y ⁴⁴ que el análisis químico vía ICP-OES presenta intervalos de linealidad amplios y se pueden realizar modificaciones sin afectar el método. Después de las modificaciones pertinentes al método para mejorar la determinación cuantitativa, es

necesario realizar una prueba de robustez e incluirla en el protocolo normalizado de trabajo.

7 RESULTADOS.

7.1 LONGITUD DE ONDA SELECCIONADA.

La longitud de onda seleccionada para el análisis de las muestras es la misma utilizada para la validación del método. Éstas se presentan en la Tabla 20.

Analito	Longitud de onda (λ)
Ca	317.933
Cu	327.393
Fe	238.204
Mg	285.213
Mn	257.610
Zn	206.200

Tabla 20. Longitud de onda de análisis de los analitos.

7.2 DETERMINACIÓN DE ELEMENTOS EN LAS MUESTRAS.

7.2.1 Contenido de analito por muestra.

A continuación, se presentan las gráficas de los resultados experimentales agrupadas por elemento (Figura 49 - Figura 54). La concentración del analito se reporta en mg de analito en cada kg de muestra $\left[C = \frac{mg \text{ de analito}}{Kg \text{ de muestra}} \right]$. Esto con la finalidad de observar el orden de magnitud por elemento en las muestras de hígado de rata sin importar la etapa en la que se encuentran, permitiendo comparar los datos entre sí. Más adelante se hará una clasificación y análisis más profundo de estos datos.

La muestra RBT2MD presenta intervalos de concentración por debajo del límite de cuantificación permitido por el método, aunque el muestreo del hígado de rata se realizó con precaución considerando la zona o región cortada, no se puede descartar la posibilidad de cometer un error en el muestreo o en la homogenización de la muestra. Otro posible motivo del error puede deberse a la variación entre individuo e individuo de la población, o bien a un error cometido durante el proceso de secado, la pesada o la preparación de la disolución. Este resultado fue descartado para el análisis de resultados.

Calcio.

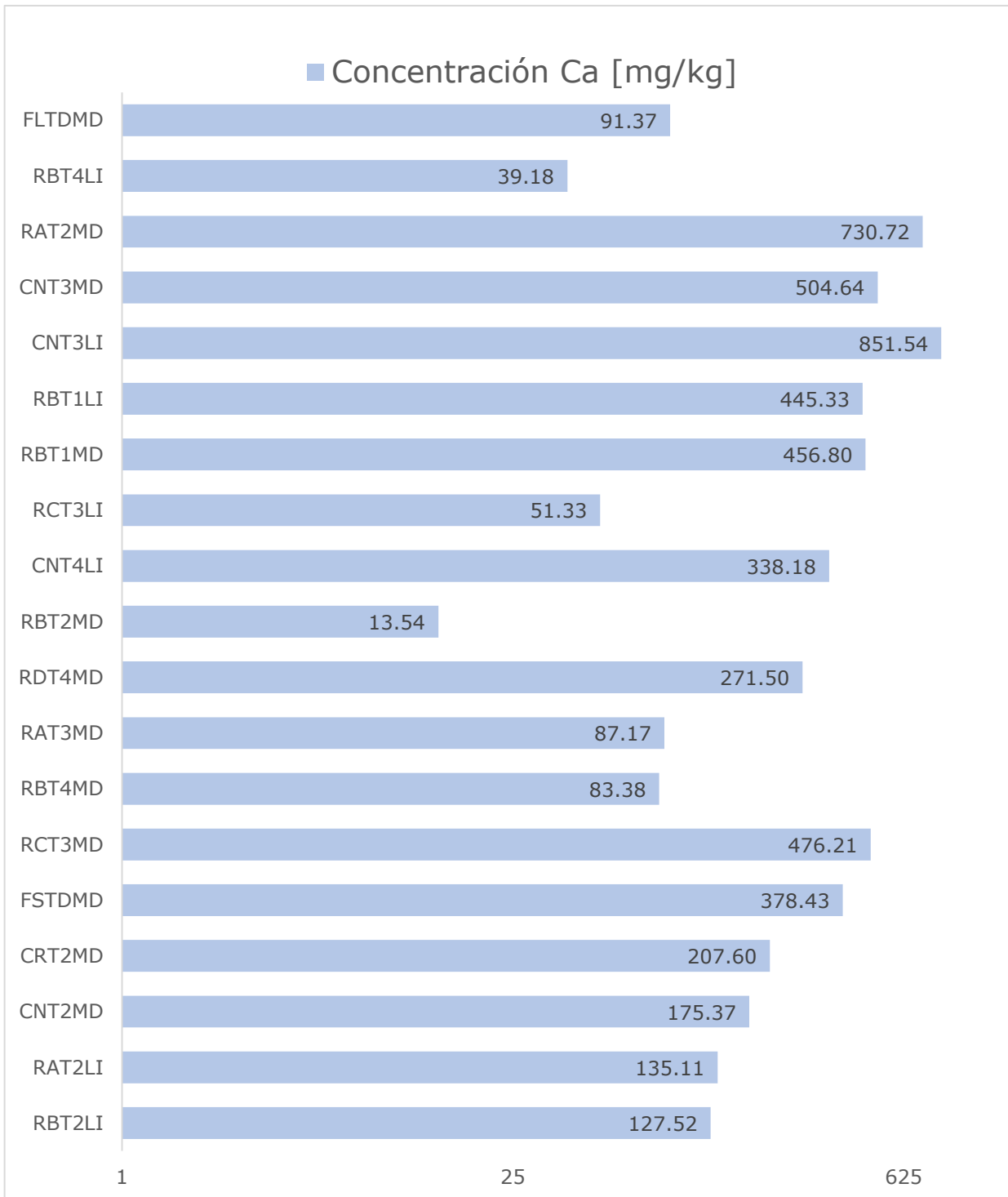


Figura 49. Resultados de la determinación de mg de Ca en cada kg de muestra.

Cobre.

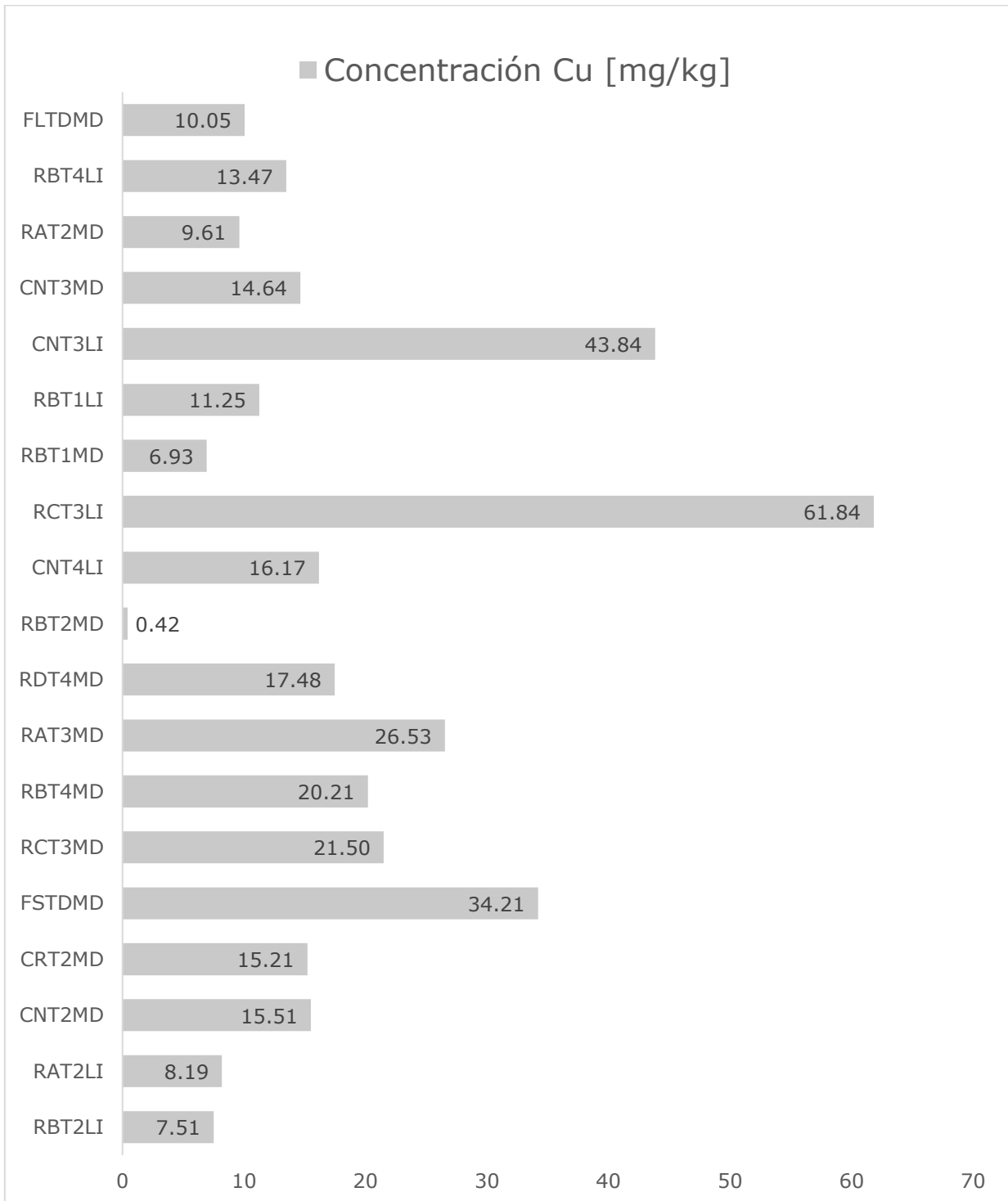


Figura 50. Resultados de la determinación de mg de Cu en cada kg de muestra.

Hierro.

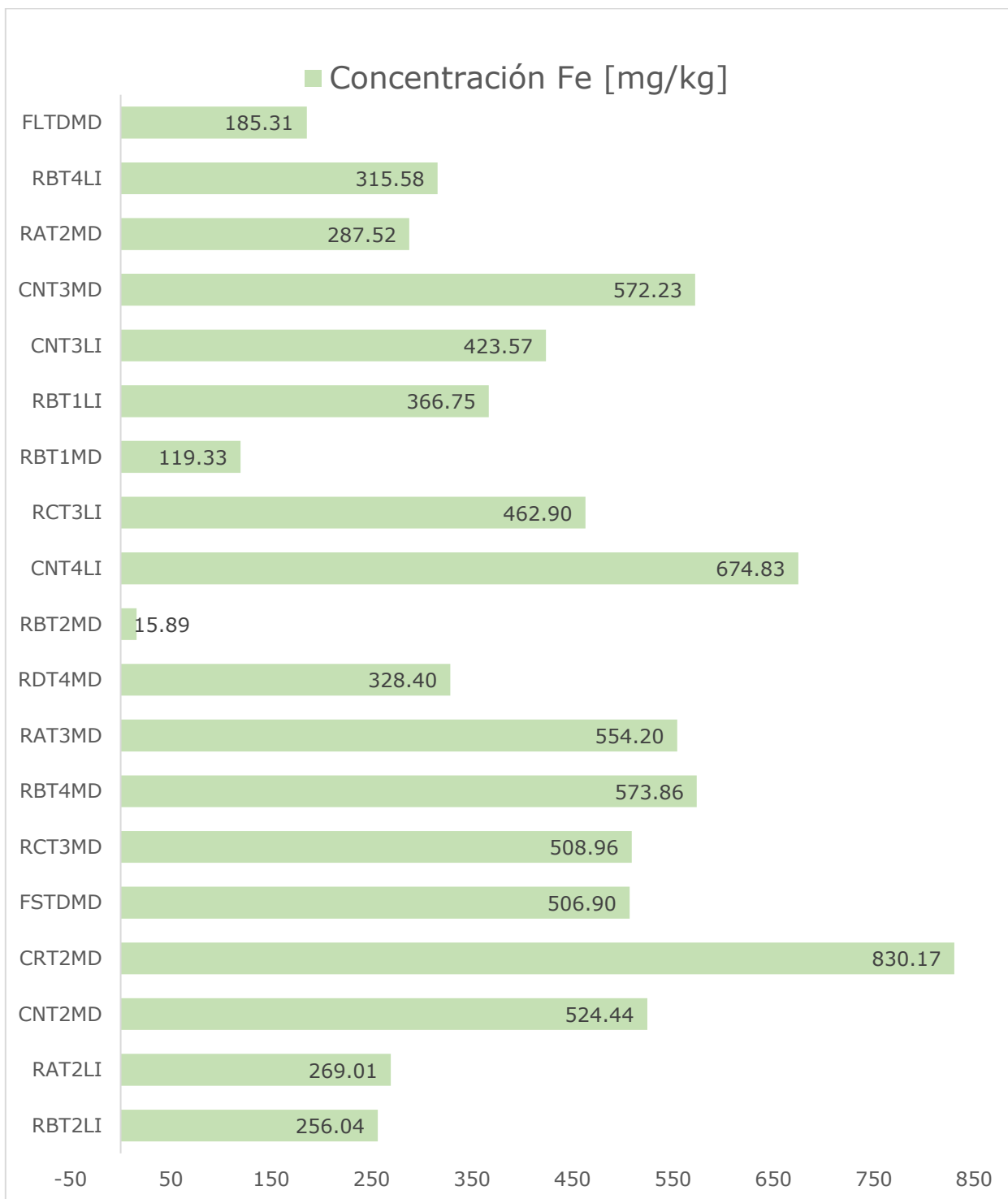


Figura 51. Resultados de la determinación de mg de Fe en cada kg de muestra.

Magnesio.

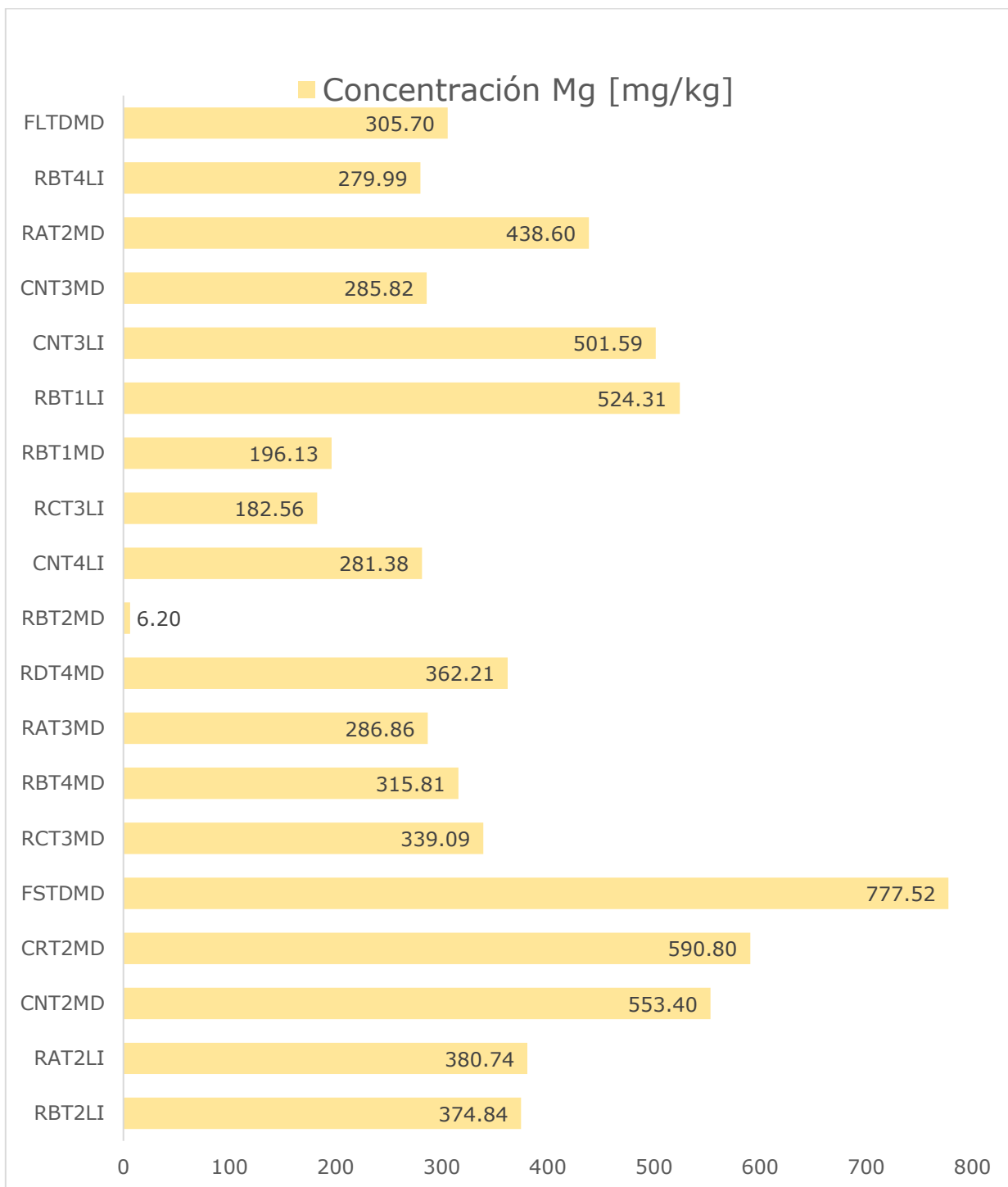


Figura 52. Resultados de la determinación de mg de Mg en cada kg de muestra.

Manganeso.

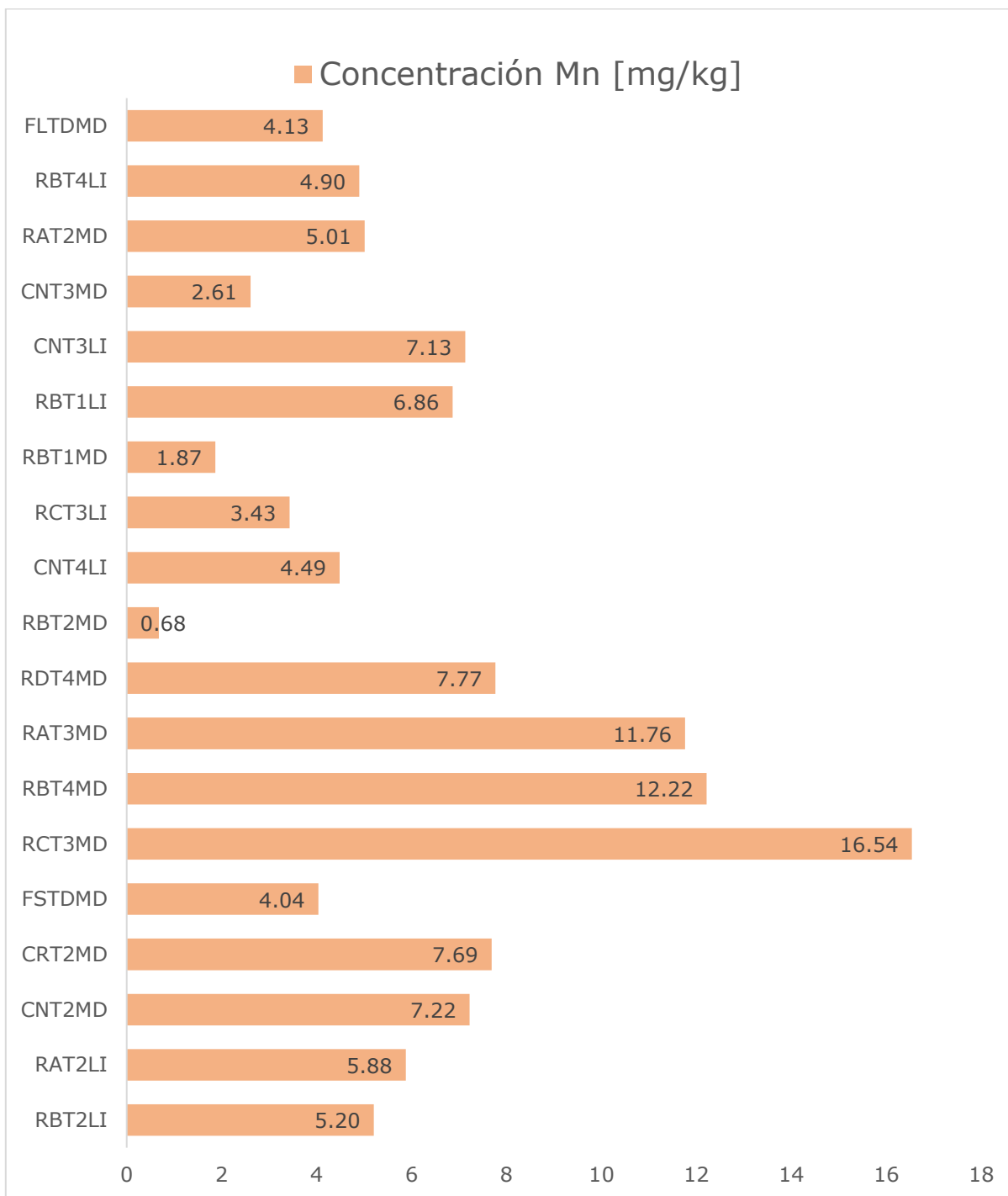


Figura 53. Resultados de la determinación de mg de Mn en cada kg de muestra.

Zinc.

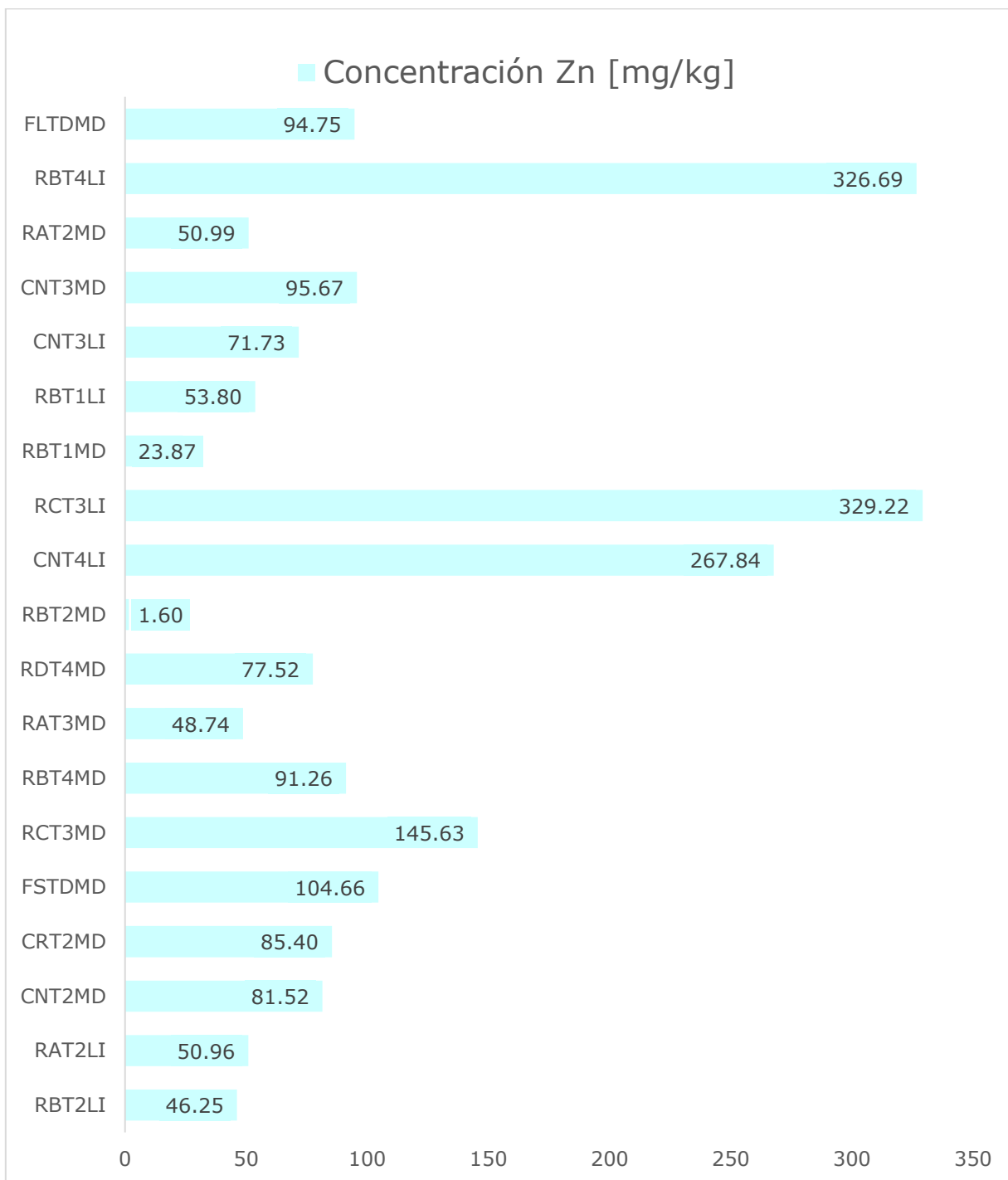


Figura 54. Resultados de la determinación de mg de Zn en cada kg de muestra.

7.2.2 Clasificación del contenido de elementos en función de la concentración promedio.

En esta sección se presentan las gráficas de contenido de elementos en función de la concentración promedio presente en las muestras (Figura 55 y 56). Comúnmente, se clasifica en elementos mayoritarios, cuando el porcentaje en masa es mayor al 1 %, elementos minoritarios, cuando es menor al 1 % y elementos traza cuando es menor al 0.01 %, sin embargo, dado que la concentración de los elementos en las muestras es muy baja solo es posible clasificarlos en elementos minoritarios y elementos traza. Es decir, los elementos minoritarios serán los que se encuentran en mayor proporción y los elementos traza serán los que se encuentran en menos proporción.

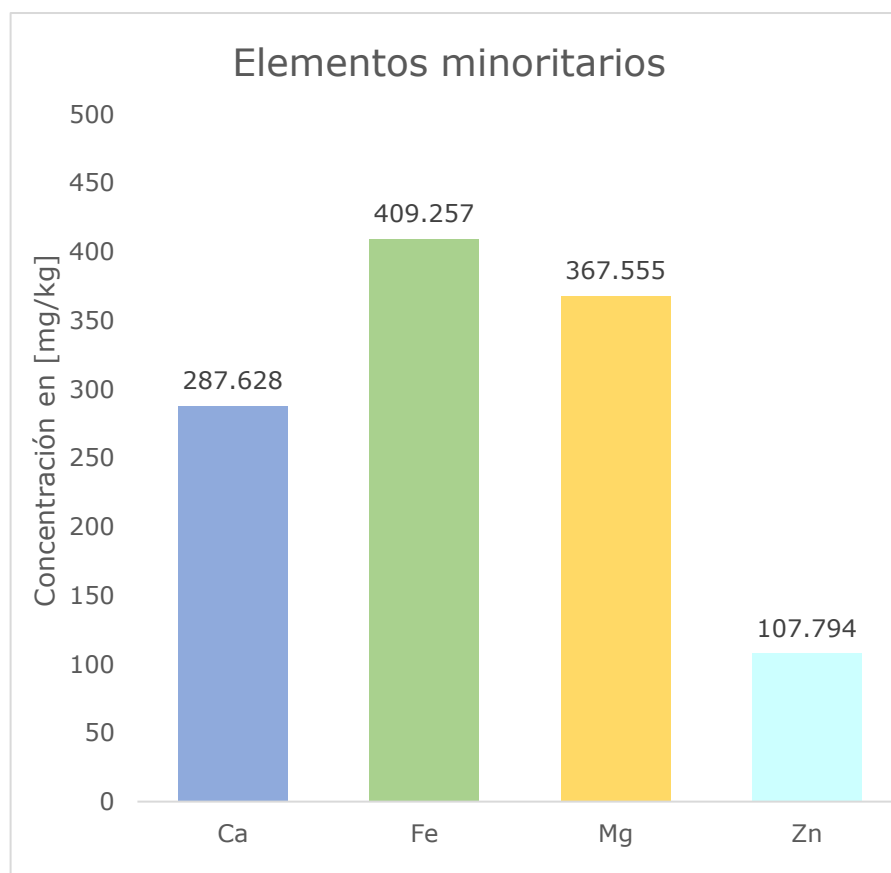


Figura 55. Elementos minoritarios presentes en la muestra con la concentración promedio.

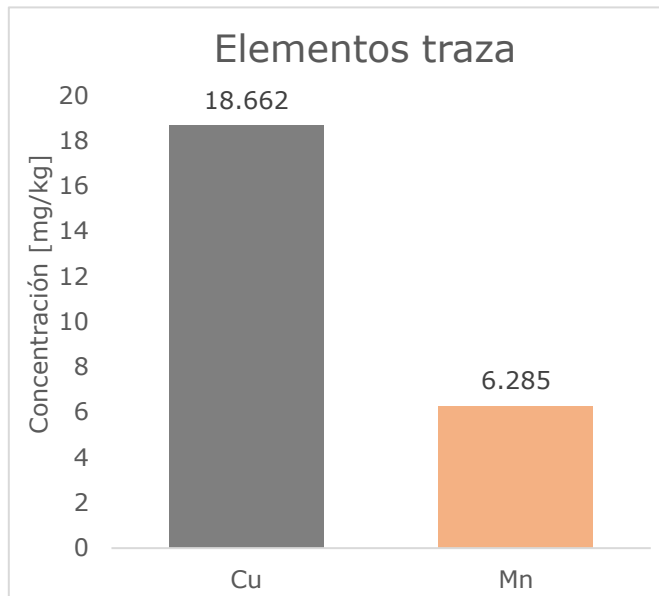


Figura 56. Elementos traza presentes en la muestra con concentración promedio.

A continuación, se presentan las gráficas de todos los resultados obtenidos en función de esta clasificación (Figura 57 y 58) a excepción del Zn (Figura 59) que en algunas muestras se trata de un elemento minoritario y en otras muestras de un elemento traza, por lo que los resultados para este elemento se presentan en una gráfica separada. La Tabla de Resultados (Tabla 22) se encuentra en el Anexo 2.

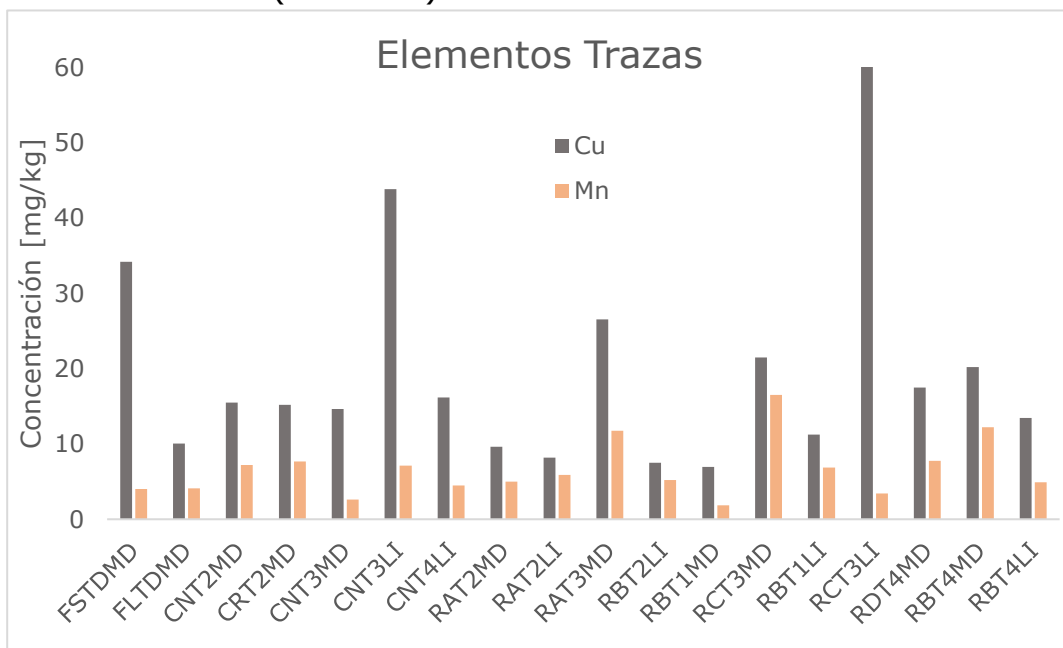


Figura 57. Gráfica de los resultados experimentales para los elementos trazas.

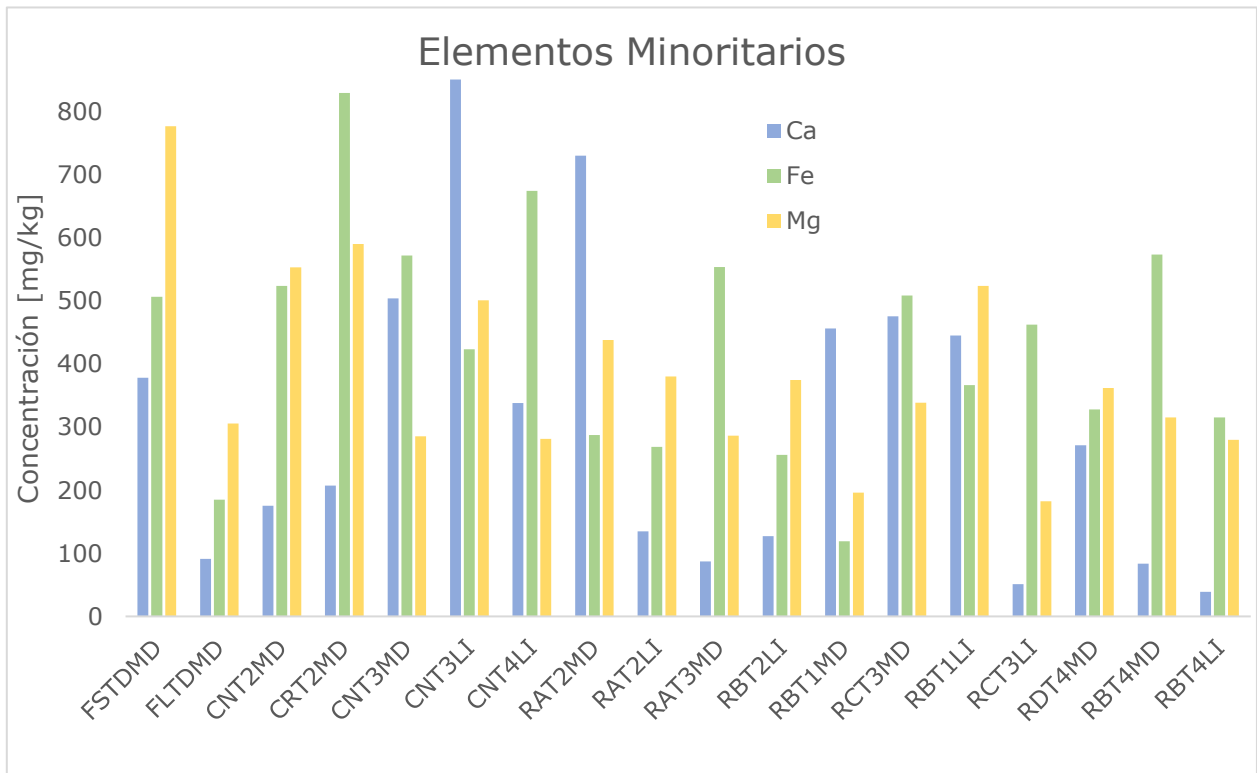


Figura 59. Gráfica de los resultados experimentales para los elementos minoritarios.

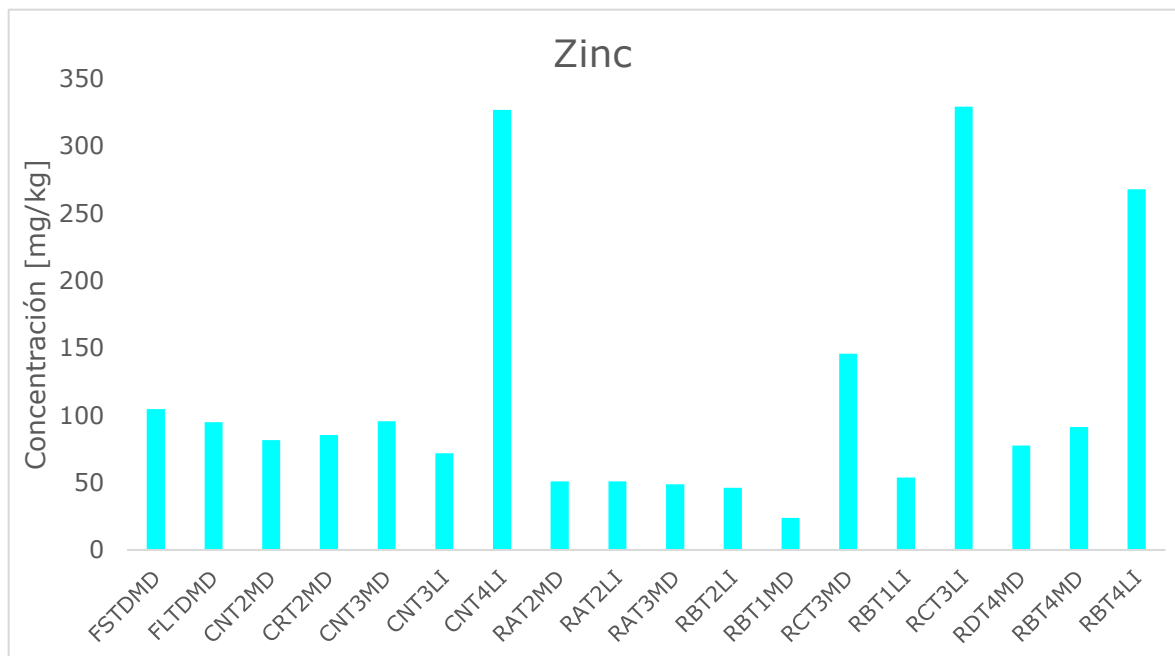


Figura 58. Gráfica de los resultados experimentales para el Zinc.

Para analizar detalladamente los cambios de concentración dependiendo de la fase en la que se encuentra el hígado al inducir la fibrosis se presentan los resultados de puntaje METAVIR en la Tabla 21.

Muestra	Fase de fibrosis	Zona del Hígado
RBT2LI	F2	Lóbulo lateral izquierdo
RAT2LI	F1	Lóbulo lateral izquierdo
CNT2MD	F0	Lóbulo medial derecho
CRT2MD	F0	Lóbulo medial derecho
FSTDMD	FM	Lóbulo medial derecho
RCT3MD	F3	Lóbulo medial derecho
RBT4MD	F4	Lóbulo medial derecho
RAT3MD	F2	Lóbulo medial derecho
RDT4MD	F4	Lóbulo medial derecho
RBT2MD	F2	Lóbulo medial derecho
CNT4LI	F0	Lóbulo lateral izquierdo
RCT3LI	F3	Lóbulo lateral izquierdo
RBT4LI	F4	Lóbulo lateral izquierdo
FLTDMD	FM	Lóbulo medial derecho
RBT1MD	F3	Lóbulo medial derecho
RBT1LI	F3	Lóbulo lateral izquierdo
CNT3LI	F0	Lóbulo lateral izquierdo
CNT3MD	F0	Lóbulo medial derecho
RAT2MD	F1	Lóbulo medial derecho

Tabla 21. Evaluación de fibrosis por muestra. F0, F1, F2, F3 y F4 corresponden al puntaje METAVIR y FM son muestras de hígado sano fuera del modelo.

Las gráficas presentadas de la Figura 60 a la Figura 65 organizan los datos en función de la fase observada en el hígado analizado:

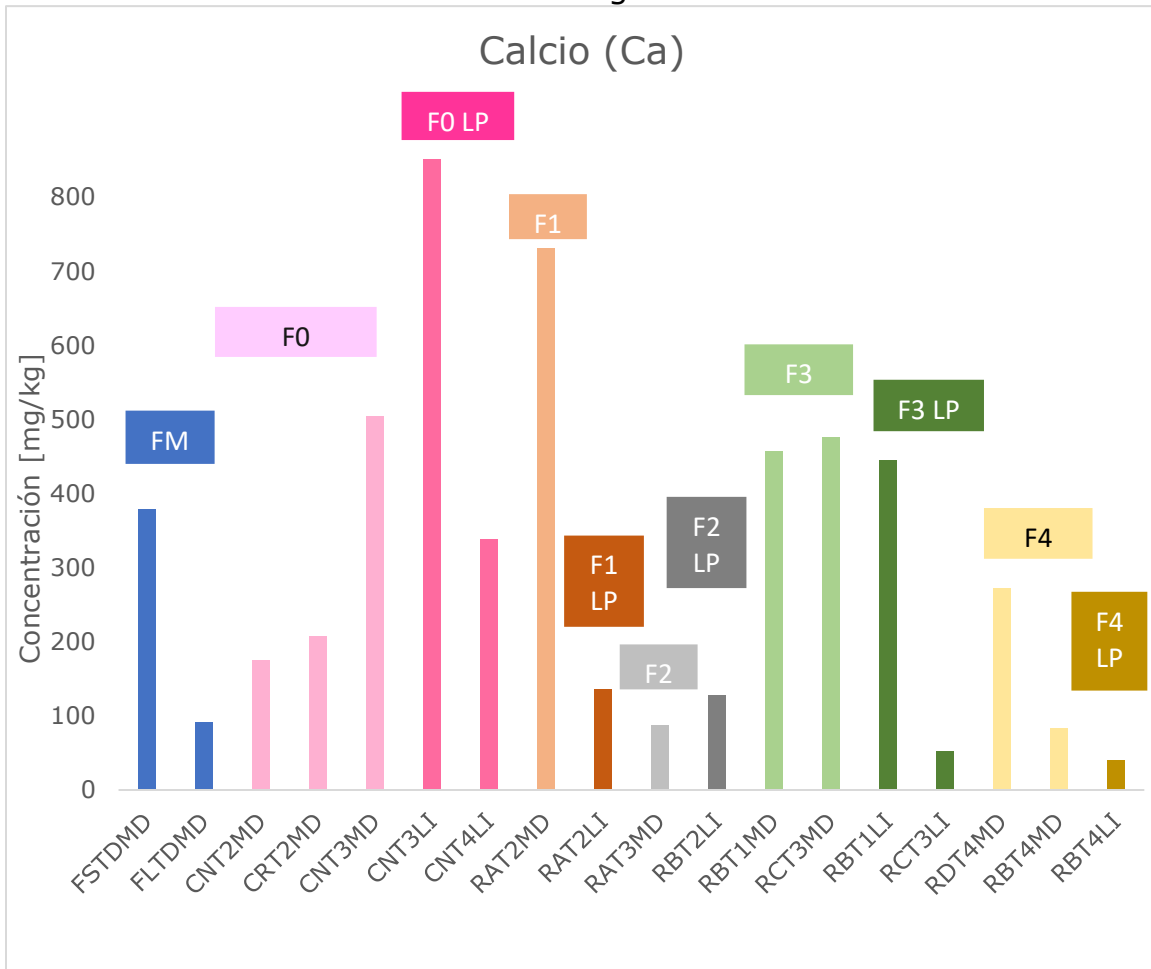


Figura 60. Gráfica del contenido de Ca (mg/kg) en función de la fase de fibrosis inducida.

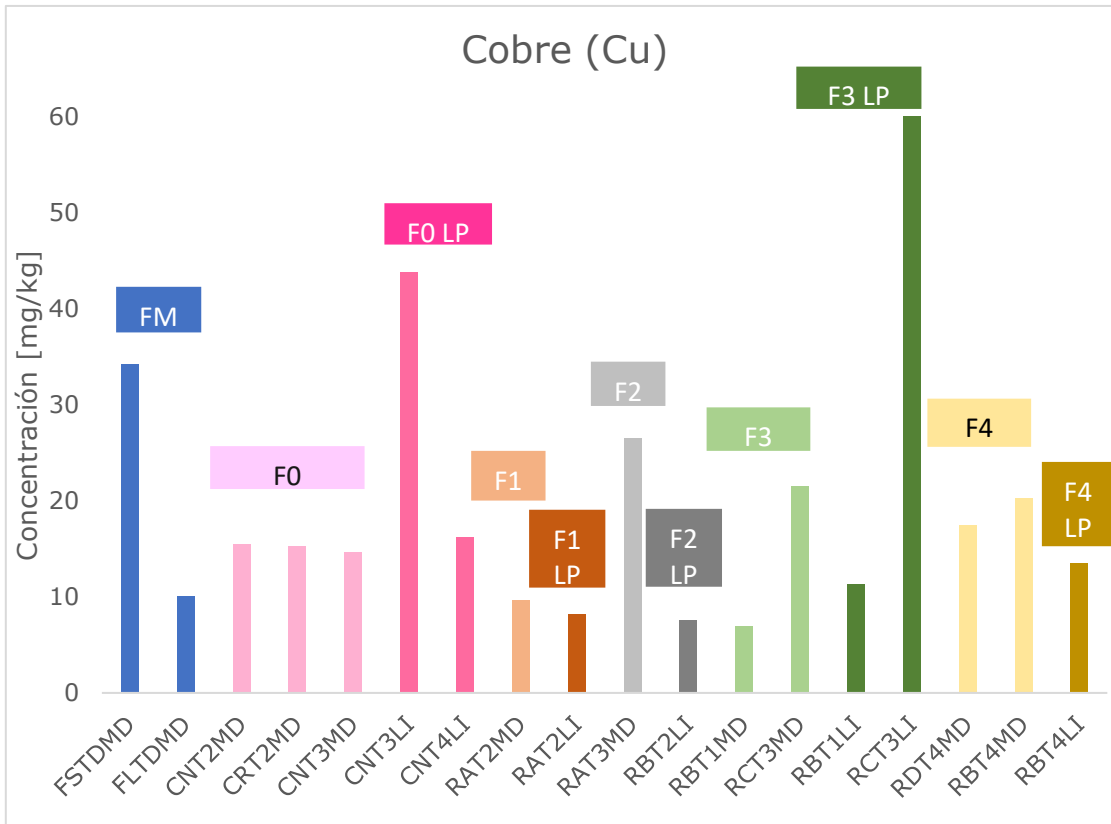


Figura 61. Gráfica del contenido de Cu (mg/kg) en función de la fase de fibrosis inducida.

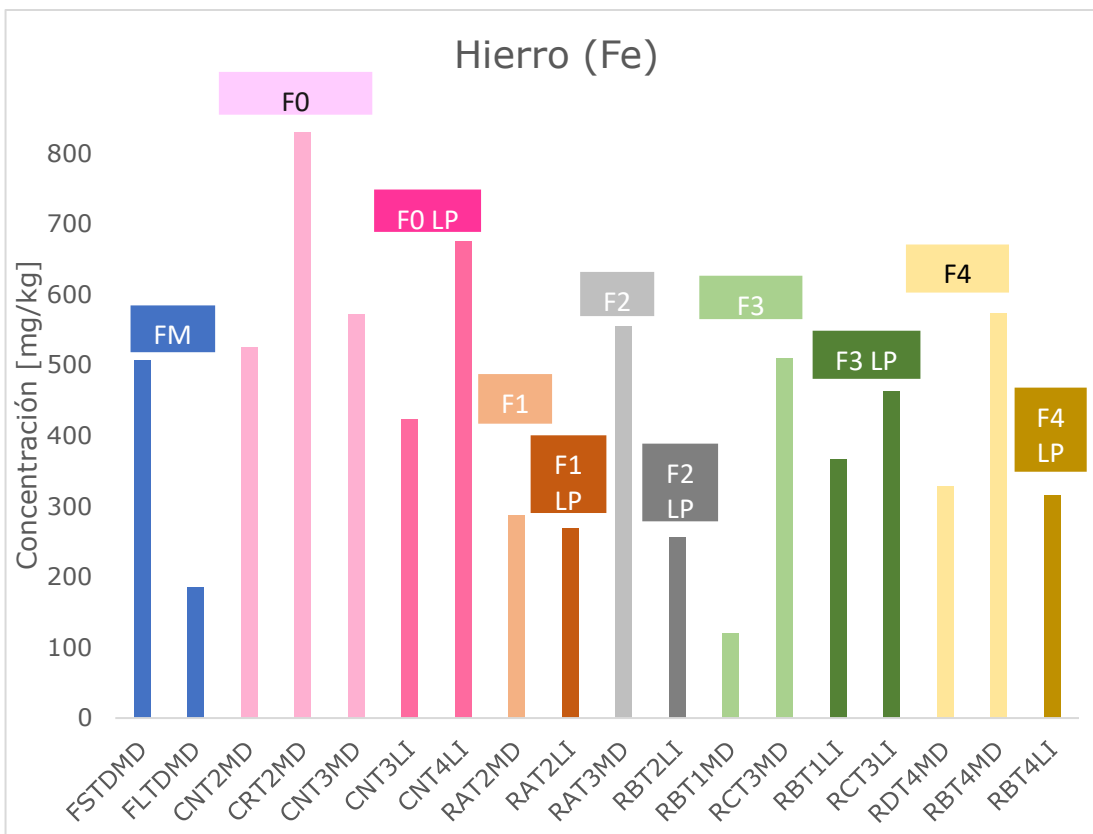


Figura 62. Gráfica del contenido de Fe (mg/kg) en función de la fase de fibrosis inducida.

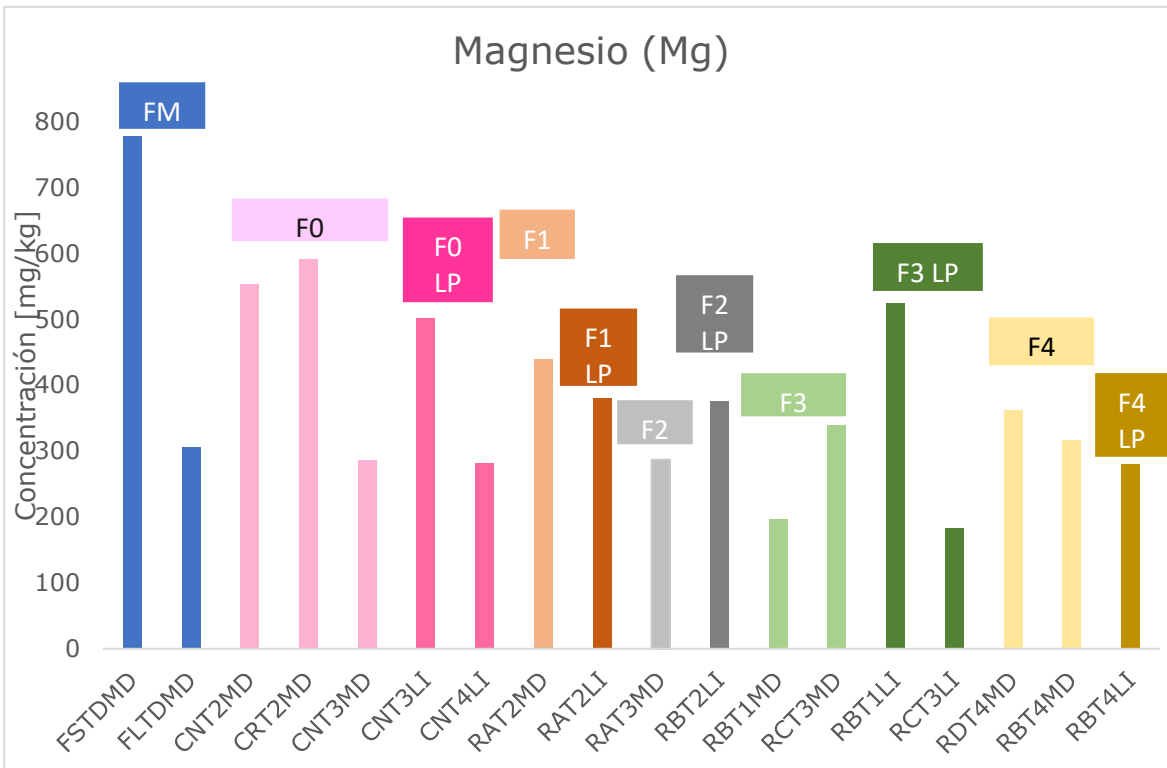


Figura 63. Gráfica del contenido de Mg (mg/kg) en función de la fase de fibrosis inducida.

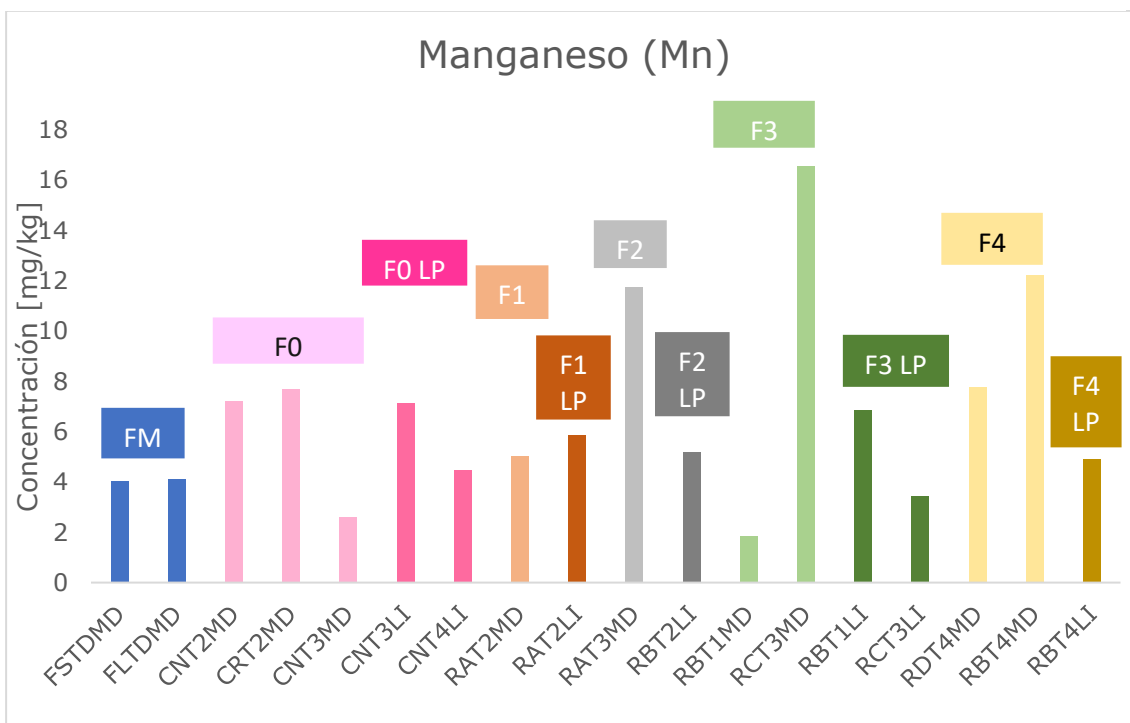


Figura 64. Gráfica del contenido de Mn (mg/kg) en función de la fase de fibrosis inducida.

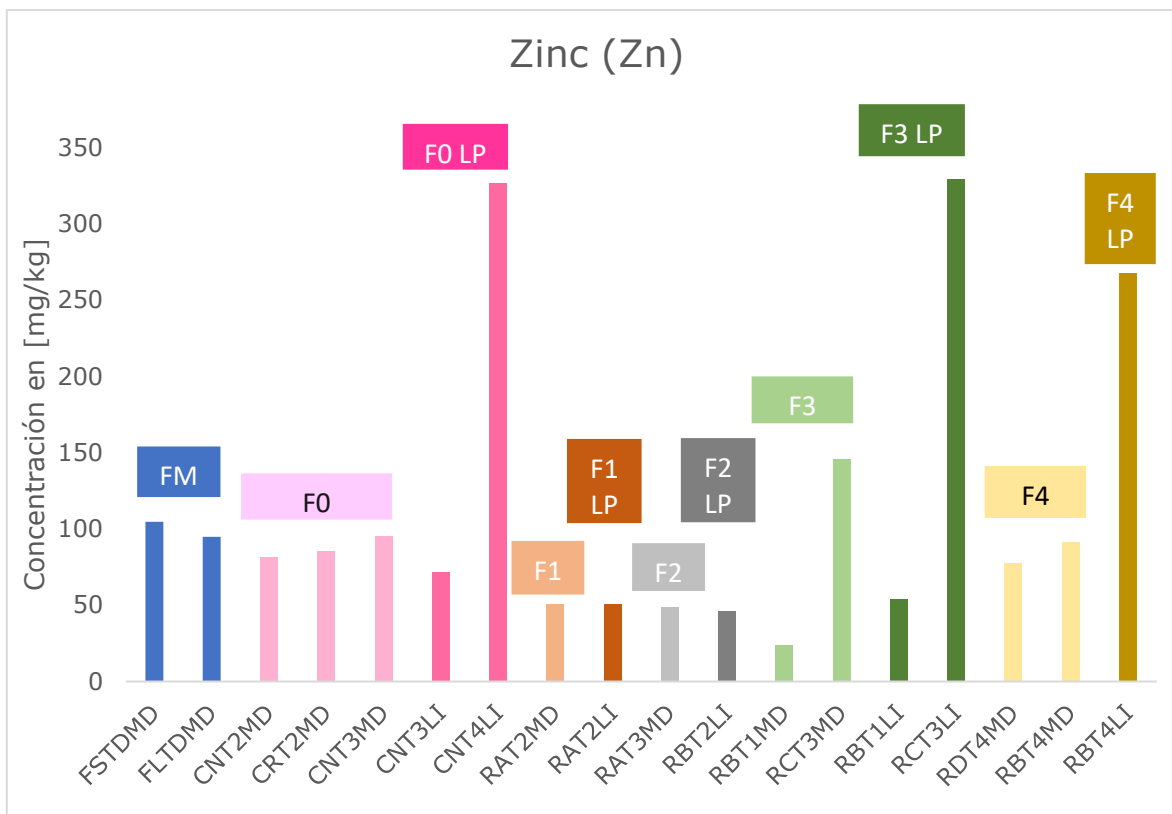


Figura 65. Gráfica del contenido de Zn (mg/kg) en función de la fase de fibrosis inducida.

7.2.3 Análisis de Resultados.

Uno de los principales problemas durante el diseño experimental fue sospecha de la presencia de los elementos de interés en el formaldehído utilizado para conservar la muestra. La muestra conservada en formaldehído del hígado sano se le asignó a la nomenclatura FSTDMD, para descartar el efecto del formaldehído sobre las concentraciones determinadas se liofilizó un hígado sano para extraer el contenido de líquido en la muestra. Los resultados indican una concentración menor en la muestra liofilizada que en la muestra secada en horno, este resultado puede indicar varios efectos en la muestra. El primero que el contenido de elementos en los reactivos de digestión y en el formaldehído afectan las determinaciones. El segundo que el proceso de liofilización afecta a los compuestos volátiles contenidos en la muestra ocasionando mayor pérdida de analito comparado con la preservación en formaldehído y

posterior secado en horno. El tercero y último que la variación de contenido de los elementos analizados entre los individuos se encuentra en el mismo orden de magnitud que la diferencia de concentraciones para ambos procedimientos. Todos los reactivos son grado analítico con 99.9 % de pureza por lo que la contaminación de la muestra por los reactivos es muy poco probable, adicionalmente se realizó un chequeo posterior de la mezcla formaldehído PBS en el ICP-OES y las señales detectadas se encuentran por debajo del límite de cuantificación para los elementos estudiados. Se recomienda que la verificación de la calidad de los reactivos con los que se preservan las muestras sea parte de la metodología para la determinación del contenido elementos en hígado de rata, sin embargo, no se cuenta con información para descartar que los resultados obtenidos sean consecuencia del proceso de liofilización o de la variabilidad entre individuos. Al tratar con sistemas biológicos es muy difícil controlar todas las variables que afectan el estado de salud en los animales. Mantener la concentración de los analitos en intervalos pequeños se convierte en una tarea complicada por lo que la justificación más lógica para la dispersión de los resultados obtenidos sería la variabilidad presente en los estos sistemas y no debido al proceso de liofilización.

Observaciones generales para el Ca.

El contenido de calcio en las muestras presenta mucha variabilidad, va desde 39 ppm a 851 ppm, de este metal no se define una tendencia, sin embargo, el intervalo de concentración corresponde con los reportados por las referencias en la Tabla 2, donde se han presentado concentraciones que van desde 1.9 ppm hasta 118.3 ppm. Las concentraciones más bajas reportadas en este trabajo se encuentran en la fase 2, 3 y 4 de fibrosis inducida.

Observaciones generales para el Cu.

Las observaciones realizadas para el contenido de cobre en las muestras son las siguientes:

- El intervalo de concentraciones reportado va desde 7 ppm a 62 ppm.
- En el lóbulo medial derecho se observa una disminución en la concentración de Cu para la F1, sin embargo, esta tendencia desaparece para la F2, donde es ligeramente mayor que F3 y F4, es decir el intervalo de concentración del metal es muy parecido para éstas tres etapas.
- El lóbulo lateral izquierdo presenta mucha variabilidad entre las diferentes fases al ordenar de forma descendente se obtiene que $F3 > F0 > F4 > F2$. La concentración en el lóbulo lateral izquierdo es mayor (LP) en la F0 y F3, para las fases F1 y F4 no se percibe gran cambio en la concentración y en el caso de la F2 se observa una disminución de concentración de Cu en esta zona.

De igual forma la mayoría de los resultados obtenidos están dentro de los intervalos reportados en las referencias de la Tabla 2. Las muestras M5T3CLP y M3T3SLP presentan contenido más alto que los resultados reportados con anterioridad por otros grupos de investigación.

Observaciones generales para el Fe.

El hierro presenta una tendencia más definida que el calcio, las observaciones realizadas son la siguientes:

- El intervalo de concentraciones va desde 119 ppm a 830 ppm.
- Se observa una concentración similar de Hierro, en el lóbulo medial derecho, para la mayoría de las fases, se reporta entre 287 ppm y 675 ppm para esta región.
- A excepción de la F0 y F2 (que puede ser causa de la variabilidad entre individuos pues se trata de dos muestras diferentes) la

concentración del metal en el lóbulo medial derecho y el lóbulo lateral izquierdo parece no diferir significativamente.

Observaciones generales para el Mg.

Para el magnesio las observaciones realizadas son las siguientes:

- El intervalo de concentraciones va desde 183 ppm a 778 ppm.
- La concentración del metal en el lóbulo medial derecho para F1, F2, F3 y F4 parece ser menor que el promedio de concentración reportado para F0, sin embargo, nuevamente no se distingue una tendencia dado que los valores de concentración determinado se encuentran muy cercanos entre sí, de éstas 4 etapas con concentraciones similares la más baja se presentó en F3 mientras que las más alta en F1.
- Se observa una concentración similar para el lóbulo medial derecho y para el lóbulo lateral izquierdo, a excepción de la F0 y F3, para el F0 la concentración en el lóbulo lateral izquierdo es menor, sin embargo, en F3 no se puede definir una tendencia pues los resultados son contradictorios entre sí, es decir, en un caso aumenta y en el otro disminuye.

Observaciones generales para el Mn.

El manganeso es el metal que se encuentra en menor proporción en la muestra. Las observaciones son las siguientes:

- El intervalo de concentraciones va de 4 ppm a 17 ppm.
- La concentración de Mn en el lóbulo lateral izquierdo es muy parecida en todas las fases. No se observa una tendencia de aumento o disminución definida con respecto al lóbulo medial derecho. F1 presenta concentraciones muy similares mientras que para F0 el lóbulo lateral izquierdo contiene más metal que el lóbulo

medial derecho, para la F2 y F4 contiene menos. En la F3 los resultados son contradictorios nuevamente.

- No se observa una tendencia definida para las concentraciones del metal en el lóbulo medial derecho dado que el valor más alto y el valor más bajo se encuentran en la F3.

Observaciones generales para Zn.

El zinc tampoco presenta variación significativa entre la muestra de hígado sano y la liofilizada. Las observaciones son las siguientes:

- EL intervalo de concentraciones va de 46 ppm a 330 ppm.
- La concentración de Zn en ambas regiones del hígado no presenta cambio significativo para F0 y F1 y F2, para F3 y F4 se observa que el Zn tiene mayor concentración en el lóbulo lateral izquierdo que en el lóbulo medial derecho.
- La concentración del elemento en el lóbulo medial derecho en F1 y F2 es similar y se observa que es menor a F0. La concentración de Zn en F0 y F4 en esta misma región también es similar, para F3 los resultados se encuentran muy separados entre sí.

8 CONCLUSIONES.

Se logró validar el método exitosamente para Cu y Fe. Se debe confirmar la validación de método para el Ca, pues gracias a la prueba ANOVA identificamos que la prueba de repetibilidad no se cumple. Para Mg, Mn y Zn se debe mejorar el proceso de digestión, se puede lograr aumentando el tiempo de digestión, presión, temperatura o cambiando la proporción de ácidos. Por los resultados de repetibilidad y recobro se espera que las nuevas modificaciones al método permitan validarlo sin ningún inconveniente. No es posible realizar la validación para la determinación del Mo bajo esta metodología debido a las interferencias asociadas a la

complejidad de la matriz de la muestra, que ocasionan el aumento de la señal y por lo tanto se tiene un error entre el 30-80 % en la cuantificación.

No se lograron observar tendencias completamente definidas en el contenido de elementos en el hígado de rata por lo que es necesario un estudio más afinado pues la variación entre individuo e individuo es demasiado alta, sin embargo, se lograron inferir algunas características en función de los resultados obtenidos. Existe diferencia en el contenido de algunos elementos dependiendo de la zona muestreada en el hígado de rata, además el diseño experimental a validar demostró tener un intervalo lineal bastante amplio que permitió esbozar la metodología necesaria para un estudio más profundo.

9 ANEXOS.

Anexo 1. Tabla periódica de los elementos químicos indicando la longitud de onda asociada al espectro de emisión para cada elemento.

Periodo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
	IA	IIA	IIIB	IIIB	IVB	VB	VIB	VIB	VIB	VIB	VIB	VIB	VIIA	VIIA	VIIA	VIIA	VIIA	VIIA	VIIA
1	H 11	He 2																	
2	Li 3	Be 4	B 5	C 6	N 7	O 8	F 9	Ne 10											
3	Na 11	Mg 12	Al 13	Si 14	P 15	S 16	Cl 17	Ar 18											
4	K 19	Ca 20	Sc 21	Ti 22	V 23	Cr 24	Mn 25	Fe 26	Co 27	Ni 28	Cu 29	Zn 30	Ga 31	Ge 32	As 33	Se 34	Br 35	Kr 36	
5	Rb 37	Sr 38	Y 39	Zr 40	Nb 41	Mo 42	Tc 43	Ru 44	Rh 45	Pd 46	Ag 47	Cd 48	In 49	Sn 50	Sb 51	Te 52	I 53	Xe 54	
6	Cs 55	Ba 56	La 57	Hf 72	Ta 73	W 74	Re 75	Os 76	Ir 77	Pt 78	Au 79	Hg 80	Tl 81	Pb 82	Bi 83	Po 84	At 85	Rn 86	
7	Fr 87	Ra 88	Ac 89	Rf 104	Db 105	Sg 106	Bh 107	Hs 108	Mt 109	Ds 110	Rg 111	Cn 112	Nh 113	Fl 114	Mc 115	Lv 116	Ts 117	Og 118	
Lantánidos																			
			Ce 58	Pr 59	Nd 60	Pm 61	Sm 62	Eu 63	Gd 64	Tb 65	Dy 66	Ho 67	Er 68	Tm 69	Yb 70	Lu 71			
Actínidos																			
			Th 90	Pa 91	U 92	Np 93	Pu 94	Am 95	Cm 96	Bk 97	Cf 98	Es 99	Fm 100	Md 101	No 102	Lr 103			

Grupo IUPAC	Grupo CAS	Número Atómico	Longitud de onda (nm)	Símbolo Atómico
1	I	51	206.836	Sb

Límites de detección	
Blue	< 0.1 ppb
Red	0.1-1 ppb
Green	1-10 ppb
Purple	> 10 ppb

Estados de Ionización	
I	Neutro
II	+1 Ion

Anexo 2. Tablas de resultados experimentales.

Muestra	Concentración (ppm)					
	Elementos trazas		Elementos minoritarios			Zn
	Cu	Mn	Ca	Fe	Mg	
FSTDMD	34.21	4.04	378.43	506.90	4.04	104.66
FLTDMD	10.05	4.13	91.37	185.31	4.13	94.75
CNT2MD	15.51	7.22	175.37	524.44	7.22	81.52
CRT2MD	15.21	7.69	207.60	830.17	7.69	85.40
CNT3MD	14.64	2.61	504.64	572.23	2.61	95.67
CNT3LI	43.84	7.13	851.54	423.57	7.13	71.73
CNT4LI	16.17	4.49	338.18	674.83	4.49	326.69
RAT2MD	9.61	5.01	730.72	287.52	5.01	50.99
RAT2LI	8.19	5.88	135.11	269.01	5.88	50.96
RAT3MD	26.53	11.76	87.17	554.20	11.76	48.74
RBT2LI	7.51	5.20	127.52	256.04	5.20	46.25
RBT1MD	6.93	1.87	456.80	119.33	1.87	23.87
RCT3MD	21.50	16.54	476.21	508.96	16.54	145.63
RBT1LI	11.25	6.86	445.33	366.75	6.86	53.80
RCT3LI	61.84	3.43	51.33	462.90	3.43	329.22
RDT4MD	17.48	7.77	271.50	328.40	7.77	77.52
RBT4MD	20.21	12.22	83.38	573.86	12.22	91.26
RBT4LI	13.47	4.90	39.18	315.58	4.90	267.84

Tabla 22. Resultados experimentales del contenido de elementos mediante ICP-OES para muestras de hígado de rata en condiciones de fibrosis hepática.

10 REFERENCIAS.

1. Arias, I., Wolkoff, A., Boyer, J., Fausto, N. & Cohen, D. *The Liver : Biology and Pathobiology*. (Wiley, 2011).
2. Karaliotas, C. C., Broelsch, C. E. & Habib, N. A. *Liver and biliary tract surgery: embryological anatomy to 3D-imaging and transplant innovations*. (Springer, 2006).
3. Sibulesky, L. Anatomía normal del hígado. *Clin. Liver Dis.* **2**, S61Š-S63Š (2013).
4. Kogure, K., Ishizaki, M., Nemoto, M., Kuwano, H. & Makuuchi, M. A comparative study of the anatomy of rat and human livers. *J. Hepatobiliary. Pancreat. Surg.* **6**, 171–5 (1999).
5. Shi, H. *et al.* A preliminary study of ALPPS procedure in a rat model. *Sci. Rep.* **5**, 17567 (2015).
6. Carnicé, R. T. Tratamiento de la afectación hepática en la fibrosis quística. *Rev. Española Pediatr.* **65**, 260–266 (2009).
7. Friedman, L. S. (Lawrence S. & Keeffe, E. B. *Handbook of liver disease*. (Elsevier/Saunders, 2012).
8. Schanne, F. A. X., Kane, A. B., Young, E. E., Farber, J. L. & Url, S. Calcium Dependence of Toxic Cell Death : A Final Common Pathway Reviewed work (s): Calcium Dependence of Toxic Cell Death : A Final Common Pathway. **206**, 700–702 (1979).
9. Kim, N. *et al.* Inter-molecular crosslinking activity is engendered by the dimeric form of transglutaminase 2. *Amino Acids* **49**, 461–471 (2017).
10. Tatsukawa, H. *et al.* Role of transglutaminase 2 in liver injury via cross-linking and silencing of transcription factor Sp1.

Gastroenterology **136**, 1783–95.e10 (2009).

11. Rodriguez-Moreno, F. *et al.* Zinc, Copper, Manganese, and iron in chronic alcoholic liver disease. *Alcohol* **14**, 39–44 (1997).
12. Philippe, M. A., Ruddeli, R. G. & Ramm, G. A. Role of iron in hepatic fibrosis: One piece in the puzzle. *World J. Gastroenterol.* **13**, 4746–4754 (2007).
13. Kang, Y. J. & Zhou, Z. Zinc prevention and treatment of alcoholic liver disease. *Mol. Aspects Med.* **26**, 391–404 (2005).
14. Antonucci, L., Porcu, C., Iannucci, G., Balsano, C. & Barbaro, B. Non-alcoholic fatty liver disease and nutritional implications: Special focus on copper. *Nutrients* **9**, 1–12 (2017).
15. MILMAN, N., LAURSEN, J., PØDENPHANT, J. & ASNAES, S. Trace elements in normal and cirrhotic human liver tissue I. Iron, copper, zinc, selenium, manganese, titanium and lead measured by X-ray fluorescence spectrometry. *Liver* **6**, 111–117 (1986).
16. Afanas'ev, I. B., Suslova, T. B., Cheremisina, Z. P., Abramova, N. E. & Korkina, L. G. Study of antioxidant properties of metal aspartates. *Analyst* **120**, 859–862 (1995).
17. Brewer, G. J., Dick, R., Zeng, C. & Hou, G. The use of tetrathiomolybdate in treating fibrotic, inflammatory, and autoimmune diseases, including the non-obese diabetic mouse model. *J. Inorg. Biochem.* **100**, 927–930 (2006).
18. Koto, K. S. *et al.* Antitumor activity of nifurtimox is enhanced with tetrathiomolybdate in medulloblastoma. *Int. J. Oncol.* **38**, 1329–1341 (2011).
19. Teran-Hinojosa, E. *et al.* Differentiation of fibrotic liver tissue using laser-induced breakdown spectroscopy. *Biomed. Opt. Express* **8**,

- 3816 (2017).
20. Dunn, M. A. & Rojkin, M. Hepatic Fibrosis. *Gastroenterology* **76**, 295–315 (1979).
 21. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Tetrathiomolybdate, CID=5245480. *PubChem Database* Disponible en:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/tetrathiomolybdate>.
(Consultado: 23 de Junio del 2019)
 22. Border, W. A. & Noble., N. A. Transforming growth factor β in tissue fibrosis. *New J. Med.* (1994).
 23. Subsecretaría de Integración y Desarrollo del Sector Salud. Informe sobre la salud de los mexicanos 2015. (2015). Disponible en:
https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/64176/INFORME_LA_SALUD_DE_LOS_MEXICANOS_2015_S.pdf.
 24. The Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). Top 10 causes of death in 2017 and percent change. (2017). Disponible en:
<http://www.healthdata.org/mexico>.
 25. Shimamura, T. *et al.* Age-related effects of major and trace element concentrations in rat liver and their mutual relationships. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **27**, 286–294 (2013).
 26. Han, S. *et al.* Effects of weight loss and exercise on the distribution of lead and essential trace elements in rats with prior lead exposure. *Environ. Health Perspect.* **107**, 657–662 (1999).
 27. Gélinas, Y., Youla, M., Béliveau, R., Schmit, J. P. & Ferraris, J. Multi-element analysis of biological tissues by inductively coupled plasma mass spectrometry: healthy sprague dawley rats. *Anal. Chim. Acta* **269**, 115–122 (1992).

28. Uchino, E., Tsuzuki, T. & Inoue, K. The effects of age and sex on seven elements in Sprague-Dawley rat organs. *Lab. Anim.* **24**, 253–264 (1990).
29. Takahashi, S. *et al.* Determination of major and trace elements in the liver of Wistar rats by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry and mass spectrometry. *Lab. Anim.* **34**, 97–105 (2000).
30. Cockell, K. A., Fischer, P. W. F. & Belonje, B. Elemental composition of anatomically distinct regions of rat liver. *Biol. Trace Elem. Res.* **70**, 251–263 (1999).
31. Barnard, T. W. *et al.* Solid-State Detector for ICP-OES. *Anal. Chem.* **65**, 1231–1239 (1993).
32. Soria Juarez, R. APLICACIÓN DE LA TÉCNICA ANALÍTICA DE ESPECTROMETRÍA DE EMISIÓN ÓPTICA DE PLASMA. *Instituto Nacional de Investigadores Nucleares* 5–7 (2019). Disponible en: http://inin.gob.mx/publicaciones/documentospdf/60_Aplicación_de_la_técnica.pdf. (Consultado: 29 de Enero del 2019)
33. Boss, C. B. & Fredeen, K. J. Concepts, Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. (2004). doi:005446B
34. PerkinElmer, I. Atomic Spectroscopy: A Guide to Selecting the Appropriate Technique and System AA,. (2008).
35. Usmawanda, T. N., Ramli, M. & Idris, N. Emission Spectral Profile of Salt in Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) on River Clamshell Sample. *J. Phys. Conf. Ser.* **1116**, 032042 (2018).
36. Montaser, A. & Golightly, D. W. *Inductively Coupled Plasmas in Atomic Analytical Atomic Spectrometry.* (1987).

37. Morishige, Y. & Kimura, A. Ionization Interference in Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy. *Ind. Mater.* 106–111 (2008).
38. Mora, J., Maestre, S. & Hernandis, V. Liquid-sample introduction in plasma spectrometry. **22**, 123–132 (2003).
39. Gauglitz, G. & Moore, D. S. *Handbook of Spectroscopy*. (Wiley-VCH, 2014).
40. PerkinElmer, I. Hardware Guide PerkinElmer. "Optima 4000 series" Version 3.3. (2002).
41. Dunnivant, F. M. & Ginsbach, J. W. Flame Atomic Absorbance and Emission Spectrometry and Inductively Coupled Plasma- Mass Spectroscopy. *Whitman College* (2008). Disponible en: <https://sites.google.com/whitman.edu/faasfaesicpms/home>. (Consultado: 19 de Febrero del 2019)
42. L. Ebdon, E. H. Evans, A. Fisher, S. J. H. *An Introduction to Analytical Atomic Spectrometry*. (John Wiley & Sons Ltd, 1998).
43. Eppers, N. V. de K. O. Ventajas Y Limitaciones En El Análisis De Niobio Y Tantalio Por El Plasma Inductivamente Acoplado (ICP - OES). *Revista Metalúrgica UTO* (2001). Disponible en: http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2078-55932001000200007&lng=es&nrm=iso. (Consultado: 1 de Abril del 2019)
44. Ivette, J. M. D. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y ESPECTROSCÓPICA DE MOLIBDENITA Y ÓXIDO DE MOLIBDENO PROCEDENTE DE CHILE, COMPARATIVO A MINERALES MEXICANOS, USANDO ESPECTROSCOPIA DE EMISIÓN ATÓMICA CON PLASMA ACOPLADO INDUCTIVAMENTE (ICP-OES), ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON

- PLASM. (UNAM, 2018).
45. Schaller, C. P. Reactivity in Chemistry-Oxygen Binding & Reduction. (2018). Disponible en: <https://employees.csbsju.edu/cschaller/Reactivity/oxygen/ORintro.htm>. (Consultado: 1 Febrero del 2019)
 46. Lajunen, L. H. J. *Spectrochemical analysis by atomic absorption and emission*. (The Royal Society of Chemistry, 1992).
 47. Madhusa. Difference Between ICP OES and ICP AES. (2017). Disponible en: <http://pediaa.com/difference-between-icp-oes-and-icp-aes/>. (Consultado: 21 de Enero del 2019)
 48. Skoog, D. A. & Crouch, S. R. *Principios de análisis instrumental Douglas*. (CENGAGE Learning, 2008).
 49. Gauglitz, G. & Vo-Dinh, T. *Handbook of Spectroscopy*. (Wiley, 2003).
 50. Ivaldi, J. C. & Tyson, J. F. Performance evaluation of an axially viewed horizontal inductively coupled plasma for optical emission spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **50**, 1207–1226 (1995).
 51. Tyler, G. & Goldstone, L. Re: Viewing Atomic Spectroscopy. *Technol. Tools* 51–53 (2003).
 52. MCN. Nuevo Método de dopaje para el Óxido de Titanio (IV). (2014). Disponible en: <https://mariecuriesnews.wordpress.com/tag/tio2/>. (Consultado: 31 de Enero del 2019)
 53. Ahmed, A. Silicon Lattice & Doping Silicon With Boron & Phosphorous. (2017). Disponible en: <http://iamtechnical.com/silicon-lattice-doping-silicon-boron-phosphorous>. (Consultado: 10 de Febrero del 2019)

54. Optima Elements. (2016). Disponible en: https://cmc-wpengine.netdna-ssl.com/wp-content/uploads/2017/07/optima_elements.jpg. (Consultado: 21 de Enero del 2019)
55. Periodic Table V1. (2018). Disponible en: <http://exceltemplate.net/>. (Consultado: 21 de Enero del 2019)
56. Thompson, M. & Ellison, S. L. R. A review of interference effects and their correction in chemical analysis with special reference to uncertainty. *Accredit. Qual. Assur.* **10**, 82–97 (2005).
57. Juanchi Jimeno, T. Metodología de análisis químico de escorias del proceso de obtención de oro y plata Merrill - Crowe utilizando espectroscopia de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES). (UNAM, 2017).
58. Vazquez Salgado, A. A. ESTUDIO DE INTERFERENCIAS ESPECTRALES EN ESPECTROMETRÍA DE EMISIÓN ÓPTICA DE PLASMA ACOPLADO INDUCTIVAMENTE (ICP-OES) PARA LOS ELEMENTOS NORMADOS EN NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004. (Universidad Nacional Autónoma de México, 2016).
59. Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J. & Crouch, S. R. *Fundamentos de Química Analítica*. (CENGAGE Learning, 2015).
60. Hoyle, D. *ISO 9000: Quality Systems Handbook. Biomedical Instrumentation & Technology* **42**, (ELSEVIER, 2008).
61. Morillas, P. . et al. *Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados*. (Eurolab España, 2016).
62. Chang, R. *Chemistry*. (McGraw-Hill, 2002).
63. Skoog, D. A., Crouch, S. R. & Holler, F. J. *Instrumental Analysis*

Principles. (2016).

64. Bievre, P. *et al*. *Guía de laboratorio para la Validación de Métodos y temas relacionados*. CENAM/Eurachem (2005).
65. Minitab. Interpretar los resultados clave para la ANOVA de un solo factor. (2018). Disponible en: <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/anova/how-to/one-way-anova/interpret-the-results/key-results/>. (Consultado: 12 de Marzo del 2019)
66. Harvey, D. *Modern analytical chemistry*. (McGraw-Hill Higher Education, 2000).
67. Hergenreder, R. L. *Linear Range Study of the Optima Simultaneous*. PerkinElmer, Inc. Shelton, CT 06484 USA (2009).
68. Queré, A., Dosal, M. A., Villanueva, M. & Chavez, J. Antología de Química Analítica Experimental. 1–64 (2007).
69. Alemán-García, N. *et al*. Fibrosis evaluation of animal liver tissue by thermal conduction. in *IFMBE Proceedings* **60**, 674–677 (Springer, Singapore, 2017).
70. Pérez-García, A. *et al*. Analysis of the scattering in the degree of liver fibrosis in a CCl₄ induced murine model. *Ann. Hepatol. Off. J. Mex. Assoc. Hepatol.* **15**, 642 (2016).
71. Lowry, R. & Yamamoto, M. Analisis de varianza de una vía. *VassarStats Website* (2001). Disponible en: http://vassarstats.net/anova1u_esp.html. (Consultado: 2 de Abril del 2019)