



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**



Metodología para la cuantificación de elementos provenientes de PM 2.5 presentes en el derrame pleural de pacientes de la ciudad de México por medio de Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) y Espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES).

**TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO
PRESENTA**

Reina Elizabeth Haro Torralba

MÉXICO, AÑO 2023



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: Prof: Márquez Herrera Ciro Eliseo.

VOCAL: Prof: Zamora Martínez Olivia.

SECRETARIO: Prof: Paz Díaz Blanca.

1er SUPLENTE: Prof: Tapia Mendoza Everardo.

2do SUPLENTE: Prof: Hernández Mendoza Ilse Irene.

► **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Laboratorio 208-209, Edificio D, Facultad de Química, UNAM.

Laboratorio del departamento de toxicología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) “Ismael Cosío Villegas”.

Departamento de toxicología del centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV).

ASESOR DEL TEMA: **Dr. Ciro Eliseo Márquez Herrera.**

SUPERVISOR TÉCNICO: **M. en C. Ana Larissa Barbosa Sánchez.**

SUSTENTANTE: **Reina Elizabeth Haro Torralba**

Agradecimientos

Al ver el resultado logrado tras todos estos años de estudio y tesis, solo quiero decir ¡Gracias! Gracias a mi familia por su apoyo incondicional, a mis papás Guillermo y Raquel por amarme y motivarme todos estos años, a mi hermano Lundi por ser mi compañero durante toda la carrera, por compartir tantas experiencias juntos y siempre hacerme creer que era capaz de lograr lo que me propusiera, a mi hermanita Estrella por acompañarme en todos mis éxitos, fracasos y hacer mi vida más feliz y a mi tía Malena por brindarme su apoyo y cariño. Gracias a mis amigos por convertir mi vida universitaria en una serie de recuerdos felices, gracias por apoyarme, ayudarme a estudiar para mis finales, motivarme y por cuidar de su amiga foránea, ¡Gracias! Pero en especial gracias a mi QFB favorita y mejor amiga, Leslie por todos los recuerdos bonitos y apoyo en la vida.

Gracias a todos los profesores que contribuyeron a mi formación académica, por compartirme sus conocimientos, experiencias y amor por la química, gracias a Pilar por ser mi tutora y brindarme su apoyo en los primeros semestres; gracias a Hugo, coach de atletismo, por formar parte de mi vida universitaria; gracias a Larissa, mi asesora técnica y amiga de tesis por guiarme, aconsejarme, apoyarme y tenerme tanta paciencia; gracias al Dr. Ciro por ser mi tutor de tesis y amigo, gracias por apoyarme y contagiarme su amor por la química, por el conocimiento e inspirarme a ser una excelente profesionista ¡Gracias!

Gracias a esta hermosa casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por permitir que todo esto sucediera, por hacer de mi vida universitaria una de mis mejores etapas de vida.

Finalmente quiero agradecer a las instituciones por permitirme llevar a cabo este proyecto de investigación en sus instalaciones y a las maravillosas personas que me recibieron y apoyaron para lograrlo, gracias al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), al Dr. Gamalier, Dra. Paty y Dra. Jazmín por guíame y apoyarme en este proyecto; al Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), a la Unidad de Toxicología del Centro de Investigación de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV); al proyecto de Bioaccesibilidad de metales-metaloides de las PM2.5 en líquido pleural de pacientes con cáncer pulmonar de la ciudad de México por permitirme ser parte del equipo y al CONACYT por brindarme apoyo económico para poder llevar a cabo este proyecto.

RESUMEN

El líquido pleural lubrica y mantiene húmedo al tejido pulmonar y la caja torácica durante la respiración. Por lo cual, es un fluido útil para diagnosticar algunas enfermedades. La determinación de metales presentes en el derrame pleural, acumulación de líquido seroso en la pleura, puede emplearse como biomarcador de los procesos biológicos normales o patológicos, así mismo por la exposición a factores ambientales. Por otro lado, la exposición a material particulado ($PM_{2.5}$) al penetrar profundamente en las vías respiratorias se ha relacionado con un incremento en la mortalidad a nivel mundial, y aumentando el riesgo de desarrollar cáncer pulmonar, por su contenido de metales y metaloides.

El objetivo de este trabajo; fue desarrollar una metodología para el análisis cualitativo y cuantitativo de elementos trazas (metal-metaloides), presentes en el líquido pleural de pacientes con derrame pleural.

Se colectaron 133 muestras de líquido pleural, mediante toracocentesis en pacientes del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER), residentes de la Ciudad de México y del Estado de México. Las muestras fueron centrifugadas a 1500 rpm por 5 min y la fase acuosa fue transferida a tubos Eppendorf de 1.5 mL para su manejo.

Para el análisis elemental, estas fueron descongeladas, agitadas en vórtex y digeridas con HNO_3 en horno de microondas con rampa de temperatura hasta 140 °C.

Para la determinación de elementos presentes en las muestras digeridas se utilizaron las técnicas de Espectrometría de Emisión Óptica con plasma acoplado Inductivamente (ICP-OES) para elementos mayoritarios y traza y Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) para elementos ultra traza. Para la cuantificación de los elementos presentes se consideraron como parámetros de validación el porcentaje de recuperación de elementos en la matriz >80%, límites de detección (0.01-1.08) ng/mL para ICP-MS y (0.27-28.95) ng/mL para ICP-OES y desviación estándar relativa (RSD) menor al 10%. Se identificaron once elementos mayoritarios, entre los que encuentran Ca (61738 ng/mL), K (20451 ng/mL), Mg (14344 ng/mL), Fe (3290.4 ng/mL), Cu (589 ng/mL), Zn (404 ng/mL); elementos trazas, destacando la presencia de Ti (249 ng/mL), Cr (227 ng/mL), Mo (81 ng/mL), V (51 ng/mL), Se (45 ng/mL) y Sb (1.3 ng/mL); además de algunos otros elementos en concentraciones menores como son: Sn, Co, Pd y Cd.

Mediante el uso de las técnicas analíticas de ICP-OES e ICP-MS, se identificaron principalmente elementos traza metal-metaloides. La principal fuente de emisión de los metales pesados es de origen antropogénico. La exposición de estos elementos puede ocasionar enfermedades crónicas como cáncer pulmonar. Los niveles de metales en derrame pleural pueden ser el resultado directo o indirecto de la exposición a la contaminación del aire.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. LÍQUIDO PLEURAL, CARACTERÍSTICAS Y FUNCIONES.....	10
2. CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA	12
3. ELEMENTOS POTENCIALMENTE TÓXICOS.....	13
4. DIGESTIÓN DE MUESTRAS EN HORNO DE MICROONDAS.....	14
5. ESPECTROMETRÍA DE EMISIÓN ÓPTICA CON PLASMA ACOPLADO INDUCTIVAMENTE (ICP-OES)	17
a. Teoría de emisión óptica.....	18
b. Sistema de introducción de muestra. Bomba peristáltica, cámara de expansión y nebulizador.....	20
c. Generador de plasma, antorcha e inyector.....	21
d. Detector y software	23
e. Interferencias.....	24
f. Ventajas y desventajas de la técnica	25
6. ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON PLASMA ACOPLADO INDUCTIVAMENTE (ICP-MS)	25
6.1 Sistema de introducción de muestra.....	27
6.2 Fuente de ionización: Antorcha ICP y bobina de radiofrecuencias.....	27
6.3 Sistema de extracción de iones: interfaz	28
6.4 Discriminación de iones: Multi- cuadrupolo	29
6.5 Detector.....	30
6.6 Interferencias.....	31
7. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	33
7.1 Límite de detección y de cuantificación	33
7.2 Intervalo de trabajo	34
7.3 Sensibilidad	34
7.4 Precisión: repetibilidad y reproducibilidad	34
7.5 Recobro.....	35
8. TRABAJOS RELACIONADOS.....	35
9. OBJETIVOS.....	36
9.1 Objetivo general.....	36
9.2 Objetivos particulares.....	36

10. HIPÓTESIS.....	36
11. METODOLOGÍA.....	37
11.1 Recepción de muestras	37
11.2. Control de calidad	37
11.3 Tratamiento de muestras	38
11.4 Preparación de disoluciones para evaluar la recuperación de elementos	38
11.4.1 Adiciones de estándar a muestra.	
11.4.2 Adiciones de estándar a blancos.	
11.4.3 Curva de calibración en solución Gamble.	
11.5 Digestión en microondas.....	39
11.6 Cuantificación de elementos en ICP-OES.....	40
11.6.1 Optimización del equipo ICP-OES.	
11.6.2 Curvas de calibración.	
11.6.3 Análisis en ICP-OES.	
11.7 Cuantificación de elementos en ICP-MS.....	42
11.7.1 Optimización del equipo ICP-MS.	
11.7.2 Curva de calibración.	
11.7.3 Análisis en ICP-MS.	
12. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
12.1 Calibración y linealidad.....	45
12.2 Límites de detección y cuantificación	47
12.3 Recobro o porcentaje de recuperación de estándar	48
12.4 Precisión	49
12.5 Concentraciones elementales en líquido pleural	49
12.5.1 Concentración de elementos cuantificados en ICP-OES.	
12.5.2 Concentración de elementos cuantificados en ICP-MS.	
13. CONCLUSIONES.....	56
14. APORTACIONES.....	58
15. RECOMENDACIONES.....	58
16. REFERENCIAS	58
ANEXO 1. Coeficientes de correlación y pendientes para los elementos cuantificados	60
ANEXO 2. Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) del método para cuantificación de elementos en líquido pleural	60
ANEXO 3. Diagramas de la preparación de las curvas de calibración.....	62

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ICP Plasma acoplado inductivamente.

ICP-MS Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente.

ICP-OES Espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente.

PM Materia particulada.

UNAM Universidad Nacional Autónoma de México.

INER Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas.

CINVESTAV Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

LOD Límite de detección

LOQ Límite de cuantificación

Ca Calcio

Ti Titanio

Fe Hierro

Cd Cadmio

Cr Cromo

Zn Zinc

Pd Paladio

Pt Platino

Si Silicio

Hg Mercurio

Mo Molibdeno

Al Aluminio

Sb Antimonio

V Vanadio

Ni Níquel

Co Cobalto

Se Selenio

Mn Manganeseo

Sn Estaño

As arsénico

Ba Bario

Ag Plata

Pb Plomo

Sr Estroncio

K Potasio

Be Berilio

Li Litio

Mg Magnesio

Tl Talio

B Boro

Cu Cobre

Rh Rodio

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. (a) Esquema de visión anterior de las pleuras. En el hemitórax izquierdo se ha proyectado la silueta del saco pleural. El hemitórax derecho se ha abierto y el pulmón y la pleura han sido seccionados horizontalmente a nivel del hilio. (b) Esquema de pulmón derecho con corte longitudinal (García-Porrero, 2019).

FIGURA 2. Esquema de los componentes del horno de digestión con microondas (PerkinElmer, 2022).

FIGURA 3. Equipo ICP-OES.

FIGURA 4. Esquema simplificado del funcionamiento de ICP-OES. Donde FA: Fuente de alimentación de energía; BIR: Bobina de inducción de radiofrecuencia; FTA: Flujo tangencial de apoyo de plasma de argón; CN: Cámara de nebulización (De la Cruz, 2017).

FIGURA 5. Región del espectro electromagnético que usa la espectrometría atómica (Jacobo, 2018).

FIGURA 6. Esquema del modelo atómico de Bohr. Al absorber energía el átomo, un electrón se excita a un orbital de un nivel de mayor energía o estado excitado que es menos estable. El átomo puede decaer a un estado de menor energía produciendo un fotón, h.

FIGURA 7. Esquema del proceso de excitación y emisión. Las energías a y b representan excitación, c representa ionización, y d representa ionización y excitación. Se muestran cuatro posibles emisiones energéticas y su longitud de onda respectiva; e es una emisión iónica y f, g, y h son emisiones atómicas (Figuerola, 2018).

FIGURA 8. Nebulizador de ICP-OES.

FIGURA 9. Formación del plasma de argón (Jacobo, 2018).

FIGURA 10. Representación de plasma acoplado por inducción. En la posición A se muestra una vista radial de la antorcha, y en la posición B la vista axial. (Skoog, 2008).

FIGURA 11. Esquema de monocromador en detector de ICP-OES.

FIGURA 12. Espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente del departamento de toxicología del CINVESTAV-IPN.

FIGURA 13. Sistema de introducción de muestra en ICP-MS.

FIGURA 14. Interfaz de triple cono en ICP-MS (PerkinElmer, 2013).

FIGURA 15. Esquema de funcionamiento de la parte interna de un ICP-MS (Traducido de PerkinElmer, 2013).

FIGURA 16. Esquema del multiplicador de electrones en ICP-MS.

FIGURA 17. Diagrama de la metodología empleada en el proyecto.

FIGURA 18. Ejemplos de curva de calibración en ICP-OES para elementos minoritarios.

FIGURA 19. Ejemplos de curva de calibración en ICP-MS para elementos en concentraciones traza y ultra trazas.

Figura 20. Gráfico comparativo de coeficientes de determinación (R^2) de las curvas de calibración de los elementos cuantificados por ICP-OES e ICP-MS.

Figura 21. Gráfico comparativo de límites de detección instrumental para cada elemento cuantificado en ICP-OES e ICP-MS.

Figura 22. Gráfico comparativo de la mediana de las concentraciones reportadas respecto a la mediana de las concentraciones obtenidas de elementos minoritarios presentes en líquido pleural.

Figura 23. Gráfico comparativo de la mediana de las concentraciones reportadas respecto a la mediana de las concentraciones obtenidas de elementos traza y ultra trazas presentes en líquido pleural.

Figura 24. Esquema de la preparación de la curva de calibración para elementos cuantificados en ICP-OES.

Figura 25. Esquema de la preparación de la curva de calibración para elementos cuantificados en ICP-MS.

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Características del líquido pleural. (Sirvent Ochando, M. et al, 2010).

TABLA 2. Concentración elemental reportada en líquido pleural.

TABLA 4. Programa de digestión utilizado.

TABLA 5. Condiciones de trabajo del equipo ICP-OES.

TABLA 6. Características de las disoluciones patrón multi-elementales utilizadas.

TABLA 7. Solución estándar para la comprobación diaria de rendimiento de ICP-MS.

TABLA 8. Criterios de optimización ICP-MS.

TABLA 9. Parámetros de operación ICP-MS.

TABLA 10. Características de las disoluciones patrón multi-elementales utilizadas en ICP-MS.

TABLA 11. Porcentaje de recuperación de disolución estándar añadida.

TABLA 12. Elementos cuantificados por ICP-OES.

TABLA 13. Elementos cuantificados por ICP-MS.

TABLA 14. Tabla comparativa de los elementos cuantificados en líquido pleural por ICP-OES con los niveles reportados.

TABLA 15. Tabla comparativa de los elementos cuantificados en líquido pleural por ICP-MS con los niveles reportados.

TABLA 16. Coeficientes de correlación y pendientes para los elementos cuantificados en ICP-MS.

TABLA 17. Coeficientes de correlación y pendientes para los elementos cuantificados en ICP-OES.

TABLA 18. Límite de detección y cuantificación instrumental de los elementos cuantificados en ICP-MS e ICP-OES.

TABLA 19. Límite de detección y cuantificación del método de los elementos cuantificados en ICP-MS e ICP-OES.

MARCO TEÓRICO

1. Líquido pleural, características y funciones.

El líquido pleural es un lubricante para el movimiento de los pulmones durante la inhalación y la exhalación; se encuentra en la cavidad pleural entre la pleura visceral que recubre la superficie del pulmón y la pleura parietal que recubre la superficie interna de la pared torácica (ver figura 1). Se forma a partir de un filtrado plasmático, en condiciones normales, existe una pequeña cantidad de líquido libre en el interior de la cavidad pleural, resultante del equilibrio entre su formación y su reabsorción, este equilibrio dinámico se mantiene gracias al juego de las presiones hidrostática y coloidosmótica entre los capilares viscerales y los parietales, a la integridad de la serosa y al drenaje linfático. De acuerdo con Guillermo y Rend (2009), el volumen normal de este líquido oscila entre (0.1 y 0.2) mL/kg del peso corporal (5 a 15) mL, es de color claro e inodoro. En ocasiones, se acumula demasiado líquido en la pleura, esto se conoce como derrame pleural, lo que dificulta la respiración al limitar la expansión pulmonar durante la ventilación. Por lo que se realiza la toracocentesis que consiste en sacar líquido pleural mediante una jeringa.

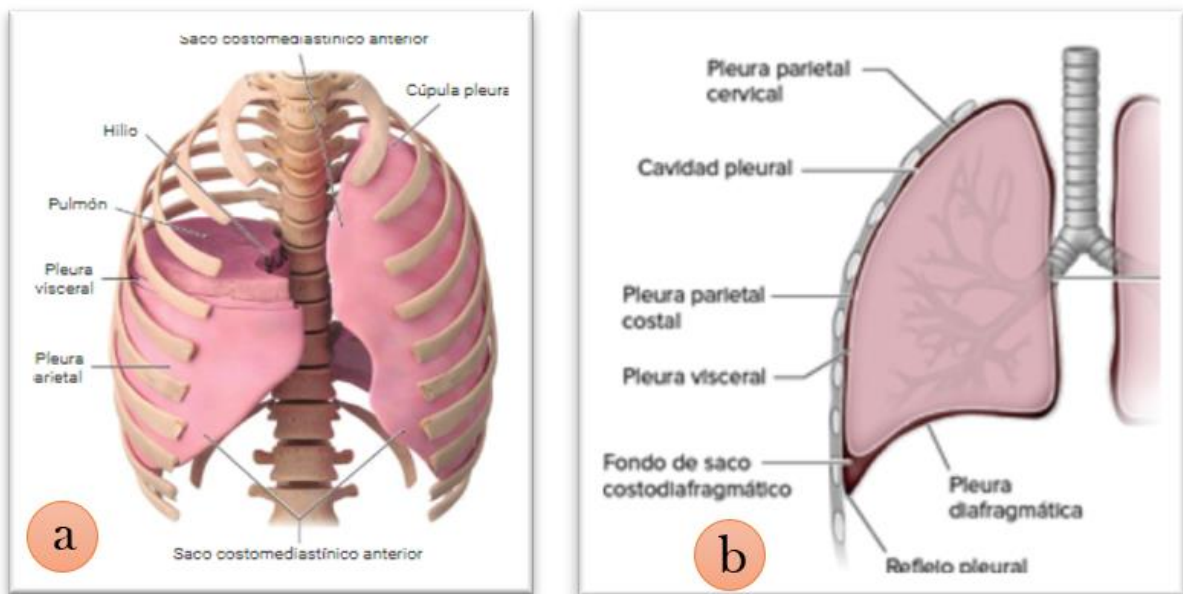


Figura 1. (a) Esquema de visión anterior de las pleuras. En el hemitórax izquierdo se ha proyectado la silueta del saco pleural. El hemitórax derecho se ha abierto y el pulmón y la pleura han sido seccionados horizontalmente a nivel del hilio. (b) Esquema de pulmón derecho con corte longitudinal (García-Porrero, 2019).

El líquido pleural cumple una función fisiológica en la respiración, al tiempo que es una medida útil para diagnosticar y evaluar enfermedades como cáncer de pulmón, insuficiencia cardíaca, entre otros traumatismos y anomalías. Una breve revisión de la anatomía y fisiología del líquido pleural normal proporciona un punto de referencia para evaluar las causas de las colecciones anormales de líquido y los derrames pleurales. Los fluidos pulmonares extracelulares forman una mezcla compleja y dinámica de varios componentes: (1) surfactantes que incluyen más del 90 % de lípidos (fosfolípidos), con el 10 % restante compuesto por una mezcla de proteínas; (2) material mucoso compuesto principalmente de glicomucoproteínas; y (3) un trasudado de suero acuoso (Pelfrêne et al. 2017). Este líquido de aspecto lechoso tiene un volumen normal de (0.1-0.2) mL/kg con un pH alcalino, debido a la acumulación de bicarbonato en la cavidad pleural; entre las sustancias que lo constituyen se encuentran la alfa amilasa, glucosa, colesterol, creatinina, bilirrubina, el ácido hialurónico, enzimas como lisozima, lactato deshidrogenasa; triglicéridos entre 50-110 mg/dL, además de que los derrames pleurales malignos suelen presentar un aumento en ferritina mayores de 805 µg/L con un conteo de células 1.000-5.000 mm³ de las cuales del (3-7) % son células mesoteliales, del (30-75) % son monocitos, del (20-30) % linfocitos y el 10 % granulocitos (Sirvent Ochando, M. et al, 2010).

Tabla 1. Características del líquido pleural (Sirvent Ochando, M. et al, 2010).

Características físicas	Composición bioquímica
Aspecto lechoso	Proteínas totales: 20-60 g/L
pH alcalino 7.4-7.8	Albúmina: 1.2-4.1 g/dL
Estéril	Grasa total: 0.4-6.0 g/dL
	Triglicéridos: > 110 mg/dL
	Colesterol: 65-220 mg/dL
	Relación triglicéridos líquido pleural/suero >1
	Relación colesterol líquido pleural/suero <1

Clínicamente, el derrame pleural es el resultado de diferentes enfermedades como cáncer de pulmón, neumonía e insuficiencia cardíaca congestiva (ICC): debido a la variación en la concentración de las proteínas o metales presentes en los derrames pleurales, éstos pueden medirse y evaluarse objetiva y cuantitativamente como biomarcadores de procesos biológicos normales o patológicos y exposición a factores ambientales (Bai et al. 2019).

Actualmente, no se tiene un estudio de la cuantificación de los elementos presentes en el líquido pleural de una persona sin padecimientos del pulmón, por cuestiones de bioética, por lo que se usa como biomarcador el suero. Considerando al líquido pleural como líquido en contacto con el órgano afectado, se le ha atribuido mayor importancia a la evaluación de su composición, y se suele comparar la composición entre los diferentes causantes de derrame de éste, comparando el derrame por cáncer de pulmón con el de neumonía, tuberculosis, entre otros. Actualmente también se utilizan disoluciones que simulan la composición y condiciones de éste, como la Solución Gamble (Boisa et al. 2014).

2. Contaminación atmosférica.

Con el desarrollo y la acelerada modernización urbana, la contaminación del aire cada vez es mayor, además del impacto que ha provocado en la salud humana, se ha convertido en un tema de investigación principal. Los contaminantes del aire incluyen contaminantes gaseosos y materia particulada (PM) (por sus siglas en inglés, particulate matter). Las partículas con un diámetro aerodinámico inferior a 10 μm (PM_{10}) tienen un mayor impacto en la salud humana. Las partículas PM_{10} se puede subclasificar en grueso ($< 10 \mu\text{m}$), fino o $\text{PM}_{2.5}$ ($< 2.5 \mu\text{m}$) y partículas ultrafinas ($< 0.1 \mu\text{m}$) (Kastury et al. 2018). El grupo de $\text{PM}_{2.5}$, tiene diámetros pequeños; sin embargo, grandes áreas de superficie y, por lo tanto, puede ser capaz de transportar diversas sustancias tóxicas y atravesar la filtración del pelo de la nariz, llegar al final del tracto respiratorio con flujo de aire y acumularse en la pleura por difusión, dañando otras partes del cuerpo a través del intercambio de aire en los pulmones (Xing et al. 2016).

Estudios epidemiológicos y toxicológicos en animales e *in vitro* Stopford et al. 2003, Goullé et al. 2005; Colombo, Monhemius, y Plant 2008; Boisa et al. 2014; Xing et al. 2016; Lee et al. 2017 y Ho et al. 2019; han demostrado que la composición química, la concentración; así como la presencia física de las partículas inhaladas, desempeñan un papel importante en los efectos tóxicos y cancerígenos asociados a la salud humana; se ha demostrado sistemáticamente una asociación entre las PM en el aire, sobre todo $\text{PM}_{2.5}$; y un mayor riesgo de morbilidad y mortalidad entre las poblaciones expuestas. Entre otros componentes, se sospecha que los metales asociados con PM ambiental juegan un papel en la contribución a los resultados cardiorrespiratorios adversos. En particular, las formas elementales solubles asociadas con las partículas suspendidas en el aire se han identificado como una preocupación prioritaria, debido a su mayor biodisponibilidad prevista y, con ello, probablemente un mayor potencial tóxico (Zereini, Wiseman, y Püttmann. 2012).

En octubre de 2013, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, según sus siglas en inglés) clasificó el material particulado (PM) de la contaminación del aire exterior como cancerígeno para los humanos, indica que 223,000 muertes por cáncer de pulmón a nivel mundial están asociadas con la exposición al aire contaminado (Huang et al. 2017). Sin embargo, los efectos de la contaminación del aire sobre el derrame pleural siguen sin estar claros. Estos resultados sugirieron que las partículas más pequeñas de PM_{2.5} pueden trasladarse a la cavidad pleural después de la inhalación. Por lo tanto, las alteraciones en la composición del derrame pleural, puede ser el resultado directo o indirecto de la exposición a la contaminación del aire (Bai et al. 2021).

Comprender cómo las PM_{2.5} conducen a enfermedades respiratorias ayudará a prevenir y diagnosticar los problemas de salud correspondientes y a la evolución de métodos y tecnologías más efectivos para el tratamiento de enfermedades inducidas por PM_{2.5}. Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual las PM_{2.5} causan estas alteraciones, no ha sido del todo dilucidado.

3. Elementos potencialmente tóxicos.

La toxicidad de los elementos depende en gran medida de la dosis y especiación. Los elementos de los materiales terrestres incluyen (1) elementos esenciales/beneficiosos (como Ca, Co, Cu, Cr, F, I, Fe, Mg, Mo, Mn, Se y Zn) para los cuales los problemas de salud pueden resultar de cualquiera de las deficiencias o excesos, y (2) elementos no esenciales (como Al, As, Be, Cd, Pb, Hg, Ni, radionúclidos) que son tóxicos en exceso (Pelfrêne et al. 2017).

Los elementos potencialmente tóxicos (EPT) (Nielsen, 2009) es un término general definido por muchos autores, que incluye aquellos elementos que debido a sus características y cantidades pudieran ser dañinos para la biota, como por ejemplo el arsénico (As), cadmio (Cd), mercurio (Hg) y plomo (Pb) que son EPT para los humanos, son ampliamente usados en la industria, son relativamente abundantes y causan graves perturbaciones a los ciclos biogeoquímicos y biológicos. Además, de acuerdo con la agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades; el As, Be, Cd, Cr, Ni y Pb son elementos clasificados como contaminantes aéreos peligrosos y carcinógenos potenciales para el ser humano.

4. Digestión de muestras en horno de microondas.

La evolución de las técnicas analíticas ha permitido la determinación de numerosos elementos químicos en bajas concentraciones. Sin embargo, estas técnicas generalmente implican la introducción de muestras como soluciones acuosas a la llama, horno o plasma (Kilrkham, 2014). La digestión por medio de microondas es uno de los procedimientos estándar más utilizados en la preparación de muestras para el análisis elemental en química analítica. El principio para la digestión de muestras por horno de microondas se basa en el uso de las ondas electromagnéticas, definidas en un intervalo de frecuencia entre 300 MHz a 300,000 MHz, en el caso de un horno de digestión, la frecuencia utilizada es de 2,450 MHz; el proceso de digestión de muestra es una reacción química de la muestra generalmente con ácidos fuertes o peróxido de hidrogeno, para digerir o descomponer la muestra y dejar los iones suspendidos en la disolución. (Canales, 2018).

La técnica se basa en la energía que proporcionan los magnetrones del horno, que son los dispositivos responsables de generar las microondas en forma de radiación ionizante, transformando la energía eléctrica en energía electromagnética, causando que las moléculas de agua y de ácidos de comportamiento polar, roten sus dipolos provocando choques iterativos, los cuales culminan en el calentamiento localizado de la disolución. Esta energía es absorbida por los ácidos utilizados para la digestión con el fin de producir calor en la solución y ser absorbida por la muestra (Baeza, 2005).

Se han desarrollado recipientes especiales para la digestión en condiciones de alta temperatura y presión (sistema Titan MPS), que pueden ser monitoreados y controlados continuamente. Esta característica permite establecer altas temperaturas de digestión mientras se asegura que el recipiente y la muestra permanezcan por debajo de los límites del método (PerkinElmer, 2013). Para algunos sistemas, se permite la elección de un programa de calentamiento (tiempo, potencia, presión o temperatura) adecuados para la digestión completa de una muestra específica. Los reactivos más utilizados para la digestión de las muestras en el horno de microondas son: ácido nítrico, ácido clorhídrico, peróxido de hidrógeno y en algunos casos se utiliza ácido fluorhídrico, para lograr la digestión de ciertas matrices difíciles de digerir.

En el caso de muestras orgánicas, si el contenido de carbono residual es alto después de una destrucción incompleta de las muestras, las interferencias pueden afectar la precisión de las mediciones analíticas. Las interferencias se pueden predecir y evitar adecuadamente, dependen de la composición química de la muestra, del método de descomposición seleccionado y del método analítico elegido para las determinaciones.

Las matrices orgánicas generalmente se oxidan con ácido nítrico a alta presión (> 25 bar), pero las sustancias que contienen proteínas y grasas son propensas a producir residuos orgánicos, que no reaccionan con el ácido nítrico, cuando el máximo de temperatura de reacción está limitada a 180 °C. Por otro lado, los carbohidratos puros (por ejemplo, azúcar y celulosa) son casi completamente mineralizados por ácido nítrico a 180 °C, y la mayoría de los iones metálicos permanecen disueltos en la disolución final (digesto). También se obtienen disoluciones libres de carbono cuando las grasas que hay, no contienen grasas insaturadas. Sin embargo, en el caso del ácido linoleico o éster de ácidos linolénicos la reacción con el ácido nítrico produce ácido 1,2-ciclopropanocarboxílico, que es estable y permanece como carbono residual en el digerido (Barnes, 2014).

La descomposición de sustancias que contienen proteínas u otras que contienen aminoácidos producen ácidos nitrobenzoicos formados a partir de fenilalanina por digestión con ácido nítrico, que son electroquímicamente activos. Además de los ácidos nitrobenzoicos, otros productos de la descomposición de los aminoácidos permanecen en los digeridos y se pueden predecir interferencias dependiendo del principio de medición.

Es importante recalcar que aun aumentando el tiempo de reacción y el volumen de ácido nítrico estos residuos orgánicos no se mineralizarán si la descomposición se realiza a 180–200 °C (Barnes, 2014).

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 óxidos de superficie. El ácido nítrico caliente por sí solo o en combinación con otros ácidos o peróxido de hidrogeno para aumentar el poder oxidante de la disolución, favoreciendo la descomposición de las macromoléculas, es ampliamente utilizado para descomponer muestras orgánicas y determinar el contenido de metales traza. El proceso de descomposición, llamado calcinación húmeda, convierte a la muestra orgánica en CO₂ y H₂O. 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 (Skoog, 2005).

Una vez finalizado el programa de digestión, se lleva a cabo el enfriamiento de los recipientes evitando así la volatilización de reactivos y de muestra digerida, en caso contrario podría invalidar dicho proceso por la imprecisión ocasionada. El resultado tras la digestión es una disolución acuosa ácida de la muestra propicia para su posterior análisis mediante técnicas espectroscópicas.

El sistema del horno de microondas está conformado por el horno de digestión con microondas como se muestra en la Figura 2, junto con sus componentes y los recipientes para la digestión con microondas que se fabrican de teflón que es térmicamente estable, transparente a microondas, tiene un punto de fusión de aproximadamente 300 °C y no es atacado por ninguno de los ácidos comunes (Skoog, 2005).

Los componentes principales de un horno de microondas son (Canales, 2018):

- **Magnetron.** Es el encargado de producir la energía del microondas. Es un diodo cilíndrico constituido con un ánodo y un cátodo.
- **Cavidad de microondas.** Se localiza en los extremos del horno. Las microondas son propagadas alrededor de ésta.
- **Extractor.** Sirve para mantener la temperatura óptima dentro del equipo de microondas.
- **Rotor.** Es un dispositivo que sirve para colocar el carrusel donde se encuentran los vasos de digestión. Los vasos no absorben microondas ya que son de teflón.
- **Atenuador.** Es una protección para evitar que las microondas que no sean absorbidas dañen el magnetron.
- **Control del ciclo de trabajo.** Permite controlar las condiciones de trabajo.



Figura 2. Esquema de los componentes del horno de digestión con microondas (PerkinElmer, 2022).

Ahora bien, algunas de las ventajas de digestión en horno de microondas son:

- El calentamiento localizado permite mayores tasas de calentamiento y menor tiempo de procesamiento.
- Monitoreo de presión, temperatura y presión durante el tiempo de digestión.
- Eliminación de contaminantes y bajas cantidades de reactivos.
- Aumento de la productividad.

5. Espectrometría de emisión óptica con plasma por acoplamiento inductivo (ICP-OES).



Figura 3. Equipo ICP-OES.

El análisis de elementos, en diferentes tipos de muestras (ambientales, alimentos, geológicas y farmacéuticas) precisa de métodos analíticos con alta sensibilidad. En los últimos años, las técnicas más utilizadas para la determinación analítica de elementos en este tipo de muestras se fundamentan en los procedimientos analíticos de espectrometría atómica. Las técnicas de espectrometría atómica se basan en la descomposición de una muestra en átomos mediante una llama o plasma; la cantidad de elemento que hay en la muestra se determina por la absorción o emisión de la radiación visible o ultravioleta de sus átomos en estado gaseoso (Ortega, 2011).

La espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (figura 3) es una técnica de análisis multi-elemental identificada por sus siglas en inglés como ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry) capaz de determinar y cuantificar la mayoría de los elementos de la tabla periódica, a excepción de C, N, O, H, F, gases nobles, algunas tierras raras y otros elementos poco frecuentes, en concentraciones que van desde porcentajes (%) hasta ppb (g/L).

En la figura 4 se muestra un esquema simplificado de un equipo ICP-OES, donde el proceso de análisis inicia con la toma de muestra; en forma líquida, que es transportada por medio de una bomba peristáltica, hasta el sistema nebulizador donde es transformada en aerosol. Dicho aerosol es conducido por el gas acarreador a la zona de ionización que consiste en un plasma cuya temperatura varía con la localización dentro del plasma de (6 000 a 10 000) K generado

al someter un flujo de gas argón ionizado a la acción de un campo magnético oscilante inducido por una corriente de alta frecuencia donde se desolvatan, vaporizan, atomizan, excitan y/o ionizan los átomos de la muestra. Al volver a su estado fundamental, estos iones o átomos excitados emiten radiaciones a una longitud de onda característica para cada elemento. Esta radiación pasa a través de un sistema óptico que separa la radiación según su longitud de onda. A continuación, un detector mide la intensidad de cada una de las radiaciones relacionando ésta con la concentración de cada analito de interés en la muestra. (Heinert, 2020).

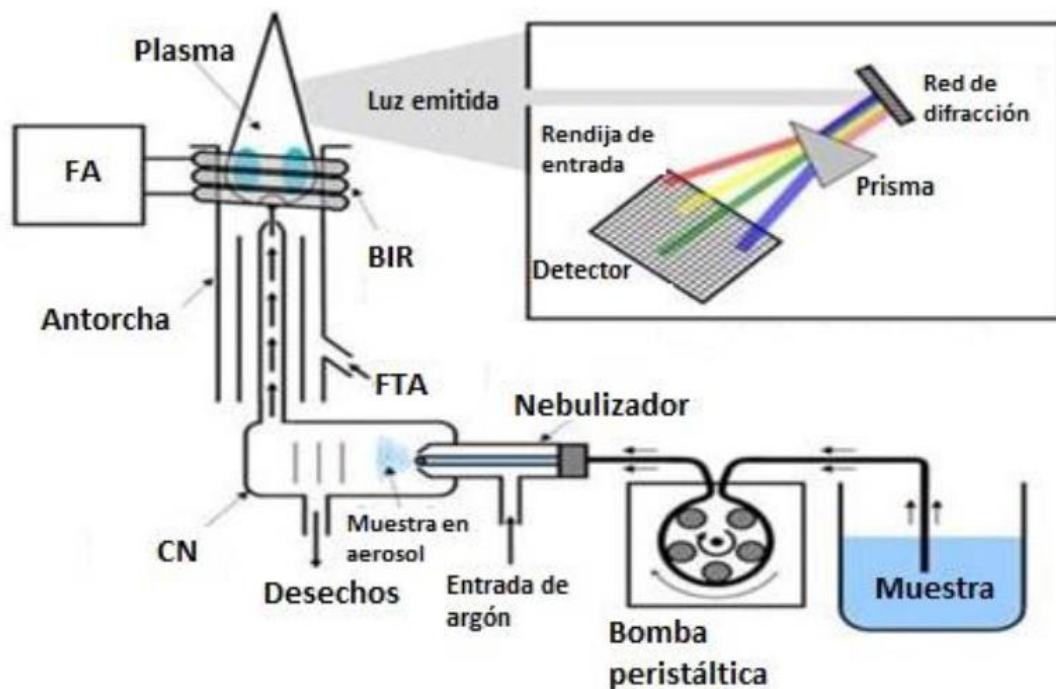


Figura 4. Esquema simplificado del funcionamiento de ICP-OES. Donde FA: Fuente de alimentación de energía; BIR: Bobina de inducción de radiofrecuencia; FTA: Flujo tangencial de apoyo de plasma de argón; CN: Cámara de nebulización (De la Cruz,2017).

5.1. Teoría de emisión óptica.

La espectrometría atómica involucra la radiación electromagnética mayormente en la región espectral ultravioleta-visible (UV-Vis), siendo desde 160 nm hasta 850 nm la región de longitudes de onda más utilizada (ver Figura 5). La radiación puede ser absorbida o emitida por los átomos de una muestra, de la cual puede obtenerse información cuantitativa (concentración de átomos) que está relacionada con la cantidad de radiación electromagnética que se emite o absorbe, mientras que la información cualitativa (qué elementos están presentes) se relaciona con las longitudes de onda en las que se absorbe la radiación.

Debido a que los átomos poseen niveles de energía cuantizados, la energía es discontinua y los espectros aparecen sólo a determinadas longitudes de onda; las longitudes de onda de las líneas del espectro se utilizan para caracterizar al elemento emisor y la intensidad de la emisión para cuantificar la concentración del elemento.

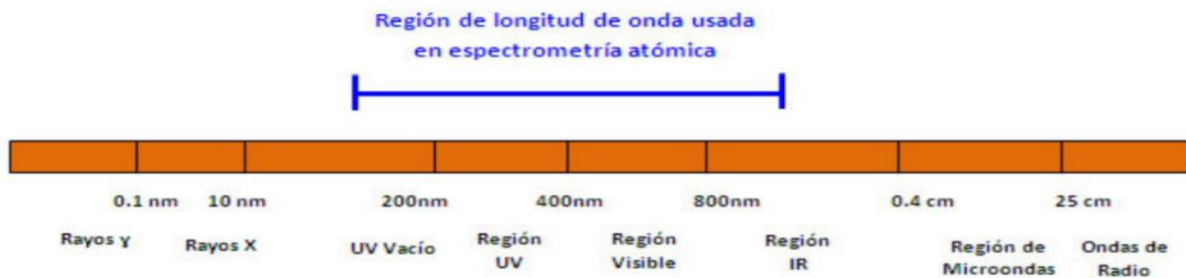


Figura 5. Región del espectro electromagnético que usa la espectrometría atómica (Jacobo, 2018).

Cuando se suministra energía al átomo en estado fundamental por absorción de radiación electromagnética; la energía suministrada puede incrementar la energía cinética del átomo o el átomo puede absorber la energía y pasar a un estado excitado (menos estable), la energía requerida para este proceso es diferente para cada elemento, cómo se muestra en el modelo atómico de Bohr de la figura 6.



Figura 6. Esquema del modelo atómico de Bohr. Al absorber energía el átomo, un electrón se excita a un orbital de un nivel de mayor energía o estado excitado que es menos estable. El átomo puede decaer a un estado de menor energía produciendo un fotón, $h\nu$.

En este proceso de excitación, un electrón del átomo en estado basal es promovido hacia un orbital de mayor energía. El electrón permanece en estado excitado por muy breve tiempo; después retorna a un orbital de menor energía (estado menos excitado). En la figura 7, se muestra un esquema donde las flechas verticales representan transiciones energéticas o cambios en la cantidad de energía de un electrón. Las diferencias de energía entre los niveles

superiores e inferiores de una transición radiactiva definen la longitud de onda de la energía que está involucrada en esa transición (Figueroa, 2018); se muestra la excitación de los electrones a mayores niveles de energía y el regreso a un orbital de menor energía.

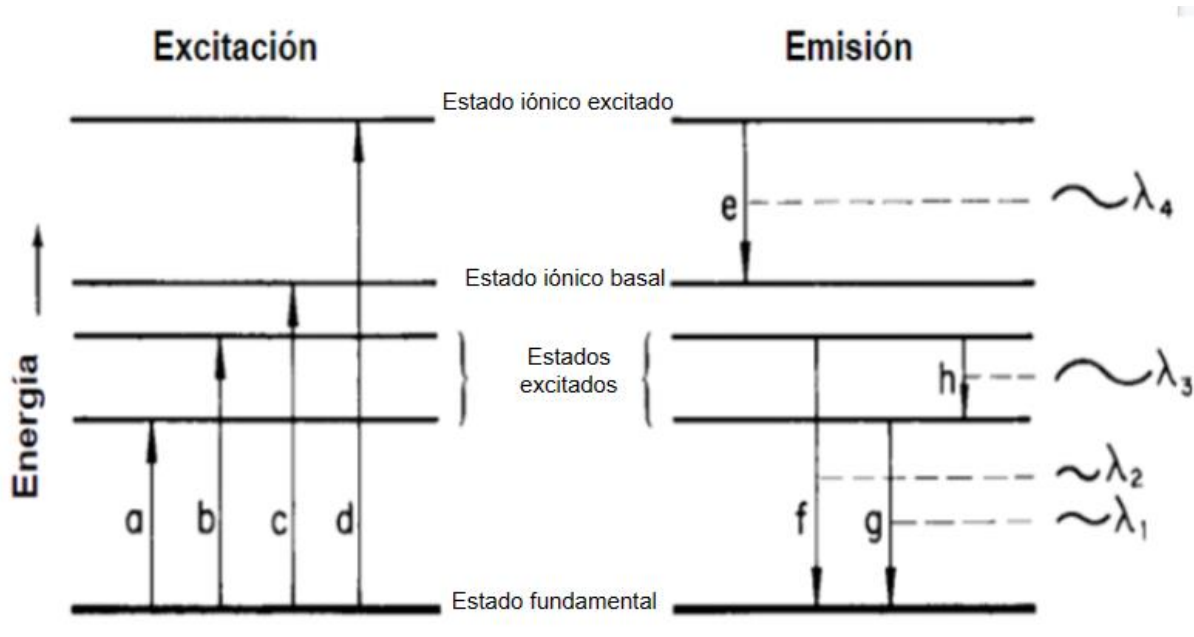


Figura 7. Esquema del proceso de excitación y emisión atómica. Las energías **a** y **b** representan excitación, **c** representa ionización, y **d** representa ionización y excitación. Se muestran cuatro posibles emisiones energéticas y su longitud de onda respectiva; **e** es una emisión iónica y **f**, **g**, y **h** son emisiones atómicas (Figueroa, 2018).

Un espectrómetro de emisión óptico de plasma para análisis elemental está constituido por los siguientes sistemas:

5.2 Sistema de introducción de muestra. Bomba peristáltica, cámara de expansión y nebulizador.

La muestra acuosa, se introduce a través de un capilar al sistema de nebulización utilizando como motor de empuje una bomba peristáltica, que consiste en una serie de rodillos que empujan la disolución. Los capilares se presionan hacia la bomba peristáltica y el giro de los rodillos provoca el desplazamiento de lo contenido en el capilar, ésto genera un vacío que provoca la succión continua de la disolución, independientemente de las diferencias de viscosidad entre muestras, estándares, y

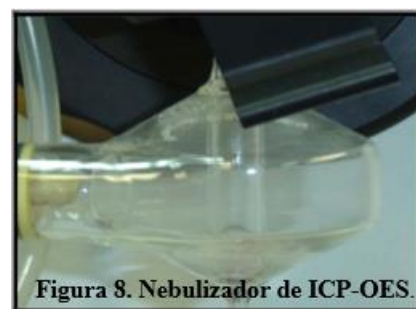


Figura 8. Nebulizador de ICP-OES.

blancos. La muestra sale del capilar en el nebulizador (ver figura 8) y gotea sobre la salida de otro capilar paralelo donde sale un flujo de argón (Ar) a alta velocidad (0.3-1.5) L/min, cuando éstos se encuentran, el Ar rompe la muestra en gotas de menor tamaño produciendo un aerosol. Las gotas en un aerosol ideal para ICP-OES son finas, mono dispersas, viajan con una velocidad uniforme y no presentan intermitencias en los tiempos de llegada. Solamente del 1 % al 5% de las gotas resultan en completa solvatación, vaporización, atomización, ionización y excitación que producen una considerable población de átomos excitados, por tal motivo, la calidad de la nebulización es crucial. (Jacobo, 2018). La cámara ciclónica de rocío mejora la calidad del aerosol eliminando las gotas de mayor tamaño y permite el paso de la neblina de muestra fina al inyector. El inyector es el encargado de transportar la muestra nebulizada desde la cámara ciclónica al interior del plasma (Figuroa, 2018).

5.3 Generador de plasma, antorcha e inyector.

El plasma, conocido como el cuarto estado de la materia, es un gas altamente ionizado, eléctricamente neutro, químicamente inerte, de alta temperatura (6,000- 10,000) K, confinado en un campo magnético y compuesto por iones, electrones y partículas neutras. El campo magnético producido por el generador de radiofrecuencia (RF) acelera los electrones hasta que alcanzan una energía suficiente para ionizar los átomos gaseosos de Ar presentes en el plasma. El plasma se inicia con la generación de una chispa que proviene de una bobina Tesla, los iones resultantes y sus electrones asociados interaccionan entonces con un campo magnético oscilante producido por la bobina de inducción. Esta interacción fuerza a los iones y los electrones dentro de la bobina a moverse en trayectorias circulares opuestas. Las posteriores colisiones con otros átomos gaseosos hacen que se propague la ionización y por lo tanto, el plasma se sustenta por sí mismo. Los iones y electrones generados interaccionan en el campo magnético oscilante que hará que se mueven siguiendo trayectorias circulares, produciéndose el calentamiento óhmico del argón por la resistencia de éstos al movimiento (Jacobo, 2018), observado en la figura 9.

El inyector, es el encargado de transportar la muestra nebulizada desde la cámara hasta el interior del plasma, el más usado en ICP-OES, es de alúmina ya que es el más resistente al ataque químico y a las altas temperaturas (Figuroa, 2018).

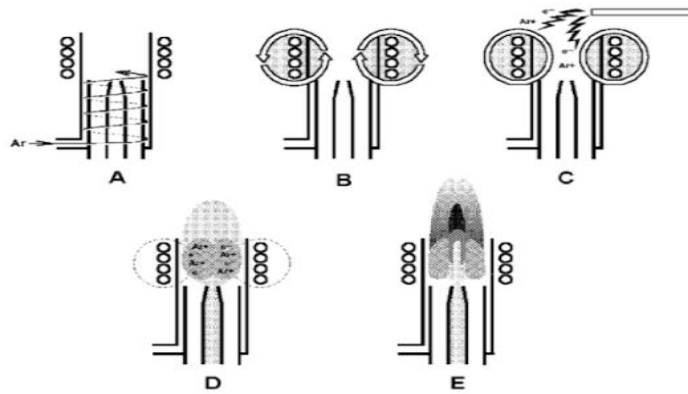


Figura 9. Formación del plasma de argón (Jacobo,2018). A-El gas argón gira a través de la antorcha; B-la potencia de RF se aplica a la bobina de carga; C-una chispa produce algunos electrones libres en el argón; D-los electrones libres son acelerados por los campos de RF causando una mayor ionización y formando un plasma y finalmente E-el flujo del nebulizador portador de aerosoles de muestra perfora todo el plasma.

La antorcha consta de tres tubos concéntricos de cuarzo a través de los cuales fluye el argón y la inyección del aerosol. El tubo interno, es el que contiene el plasma, mientras que otro flujo de gas argón pasa a altas velocidades entre los dos tubos exteriores de la antorcha, se le conoce como flujo refrigerante y se utilizan entre 7-15 litros por minuto para evitar que la alta temperatura alcanzada por el plasma afecte el equipo (Juanchi, 2017; Figueroa, 2018).

La temperatura del plasma así formado es lo suficientemente elevada como para que el cilindro exterior de cuarzo requiera aislamiento térmico. Para lograrlo, se hace fluir el argón de forma tangencial alrededor de las paredes del tubo. Este flujo tangencial enfría las paredes interiores del tubo central y concentra radialmente el plasma.

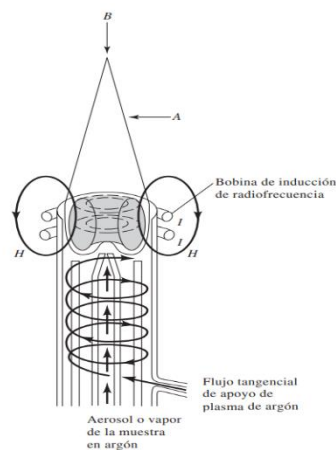


Figura 10. Representación de plasma acoplado por inducción. En la posición A se muestra una vista radial de la antorcha, y en la posición B la vista axial. (Skoog, 2008).

En los espectrómetros de plasma acoplado por inducción, la antorcha se puede ver radialmente (perpendicular a su eje), axialmente (paralelo al eje) o pueden contener un sistema de conmutación controlado mediante computadora para ver ambos esquemas (Ver figura 10). La decisión sobre qué configuración usar depende del comportamiento químico del analito en el plasma, la línea espectral elegida para el análisis, la calidad de los datos requeridos y la naturaleza detallada del experimento (De la cruz, 2017).

5.4 Detector y software.

La luz emitida por los átomos y iones excitados en el plasma se mide para obtener información sobre la muestra. Las especies excitadas en el plasma en esta radiación policromática deben ser separadas en longitudes de onda individuales, para que la emisión de cada especie excitada se pueda identificar y su intensidad se pueda medir. La separación de la luz, en el conjunto de las longitudes de onda que lo conforman, se puede realizar mediante el empleo de un monocromador. Una vez que ha sido separada de otras longitudes de onda es captada por un detector fotosensible, como un fotomultiplicador o rejilla o un dispositivo de carga acoplada (Figuroa, 2018).

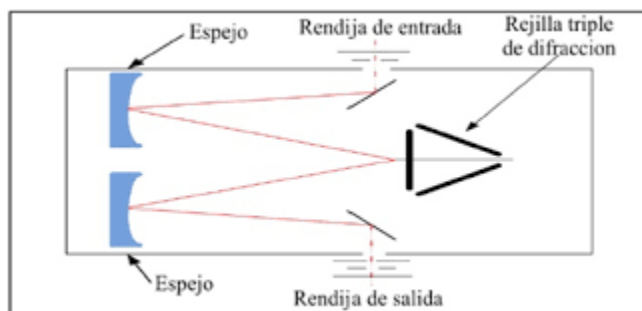


Figura 11. Esquema de un monocromador en un detector de ICP-OES.

La radiación producida por los elementos y moléculas es colectada por un sistema óptico, dicho sistema consta de prismas parabólicos que redireccionan la luz emitida. Esta luz pasa por una rejilla de difracción (Echelle), la cual tiene como función separar la luz policromática en radiación monocromática. Este proceso se genera por las líneas que tiene en su superficie la rejilla, normalmente este espejo tiene una densidad de 600 a 4200 líneas por milímetro. Cuanto más larga sea la longitud de onda y mayor sea la intensidad de la línea, mayor será el ángulo de difracción, para separar la luz policromática de forma predecible, la rejilla se incorpora un instrumento óptico denominado espectrómetro. La función del espectrómetro es formar la luz en un haz bien definido, dispersarse de acuerdo con la longitud de onda y enfocar la luz dispersada sobre un plano o círculo de salida (Figuroa, 2018).

5.5 Interferencias.

Una interferencia es aquella que causa que la señal del analito (sustancia química presente en un material, que es objeto de detección, identificación y cuantificación en el análisis químico de una muestra) sea diferente a la señal del analito en la misma concentración en una disolución de calibración; los equipos ICP-OES de análisis elemental de trazas han sido diseñados para minimizar las interferencias (Boss et al., 1997). Las interferencias en ICP-OES que se puede presentar en las muestras de líquido pleural digeridas son:

Interferencias espectrales: Pueden ser una coincidencia directa de la longitud de onda con otra línea espectral o una superposición parcial con una línea próxima; en estos casos se realiza un barrido donde se inspecciona la existencia de líneas de emisión cercanas; estableciendo así cuáles deben de ignorarse o evitarse en la cuantificación utilizándose otra longitud de onda característica del elemento o factores de corrección (Boss et al., 1997).

Interferencias por efectos de matriz: Se generan debido al mal transporte de la muestra; incluyen interferencia por nebulización, por transferencia, química o de ionización y por atomización y volatilización. De acuerdo con la teoría de la nebulización, un incremento en la viscosidad o en la tensión superficial producirá un incremento en el diámetro de la gota, lo cual resulta en un decremento consecuente en la eficiencia del transporte de la muestra. Esta menor eficiencia tiene dos efectos sobre la señal de emisión observada: se incrementa la emisión del fondo debido a que hay menos solvente ya que el diámetro de gota ha aumentado, y la emisión del analito es reducida simplemente porque el plasma tiene menos analito con el cual interactuar (Hill, 2007). También se pueden presentar efectos de memoria generalmente asociados a los capilares largos que se utilizan, así como la superficie de los materiales utilizados en el sistema de introducción de muestra (Jacobo, 2018). Para contrarrestar estas interferencias se ajustan las presiones del argón, los flujos de la bomba peristáltica y el nebulizador además de lecturas de blanco cada cierto número de muestras para evitar efectos de memoria.

Interferencia de fondo: Esta radiación es una interferencia o “ruido” propia del equipo, la cual siempre existirá. Para su corrección se delimita la zona de emisión del analito y se establece una corrección que se define como la diferencia entre las lecturas del fondo con la lectura del pico del analito.

5.6 Ventajas y desventajas de la técnica.

La espectrometría de emisión atómica, presenta entre sus ventajas límites de detección bajos (ppm, ppb), amplio intervalo lineal, resolución alta (0.01 nm), adquisición y recuperación rápida de la señal, baja luz parásita, amplio intervalo dinámico de concentraciones ($> 10^6$), exactitud y precisión en la identificación y selección de la longitud de onda, lecturas de intensidad precisas, cuenta con una elevada estabilidad respecto a los cambios ambientales, fácil corrección del fondo además de operación controlada por computadora: lectura, almacenamiento, manipulación de los datos, etcétera. (Skoog, 2008).

A pesar de que esta técnica ha tenido un gran desarrollo científico y es notablemente reconocida por su alta eficiencia y buen desarrollo en diferentes industrias, la ICP-OES no es una técnica infalible. Debido a que los límites de detección corresponden a concentraciones bajas (partes por billón), el desarrollo de los procedimientos involucrados como la preparación de estándares, blancos y muestras, la configuración de los parámetros como longitudes de onda y puntos de corrección de fondo se deben realizar con sumo cuidado. Dichos parámetros determinarán si los resultados son aceptables o inaceptables (Juanchi, 2017). Para complementar el análisis de muestras de líquido pleural, se utilizó una técnica más sensible, que presenta límites de detección y cuantificación más bajos para niveles de concentración en cantidades de ultra traza presentes en las muestras.

6. Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS).

La técnica de Espectrometría de Masas con Plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS), del nombre en inglés Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, fue introducida por Houk; mediante el acoplamiento de una fuente de plasma, a presión normal con un espectrómetro de masas basado en un multi-cuadrupolo (Ríos, M. y Hernandez, H., 2020). Es una técnica de análisis multi elemental e isotópico. La técnica posee la capacidad para identificar y cuantificar casi todos los elementos de la tabla periódica, posee la habilidad de detectar y medir concentraciones de analitos a niveles de trazas y ultra trazas, detectando concentraciones de partes por trillón de analito en disolución (ppt, ng/L). Estos límites de detección exceden la capacidad de la mayoría de las técnicas modernas para análisis, además de que posee un amplio intervalo de trabajo lineal, alta exactitud y precisión de medida (Taylor, 2001) ver figura 12.



Figura 12. Espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente del departamento de toxicología del CINVESTAV-IPN.

Es una técnica que presenta similitudes con la técnica antes presentada (ICP-OES) en la introducción de muestra, nebulizador, sistema de drenaje, inyector, antorcha, plasma, generador de radiofrecuencias y el flujo de Argón; la diferencia se encuentra en el enfoque de los iones, dispositivo de separación de masas y cámara de vacío.

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

1. Introducción de muestra.
2. Ionización de la muestra: Antorcha ICP y bobina de radiofrecuencias.
3. Aceleración de los iones por un campo magnético.
4. Dispersión de los iones según su relación m/z .
5. Detección de los iones.

6.1. Sistema de introducción de muestra.

De igual forma que en el ICP-OES, la muestra en forma líquida, se bombea con una bomba peristáltica al sistema de introducción de muestras que está compuesto por una cámara de rocío y un nebulizador. Emerge como un aerosol y las gotas de menor tamaño avanzan a través del inyector hacia la base del plasma (Thomas, 2001) ver figura 13.

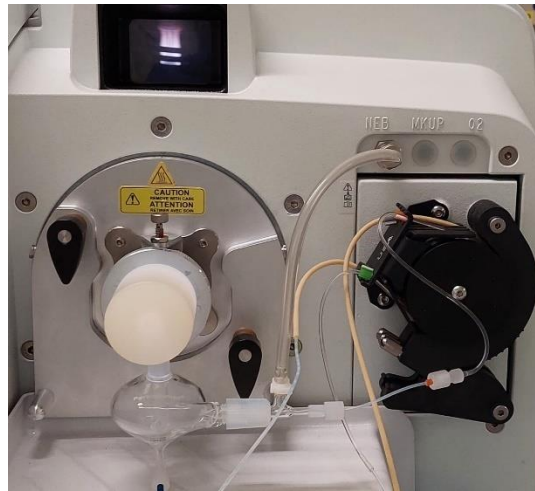


Figura 13. Sistema de introducción de muestra en ICP-MS.

6.2. Fuente de ionización: Antorcha ICP y bobina de radiofrecuencias.

En las diferentes zonas de calentamiento de la antorcha del plasma; la muestra se seca, vaporiza, atomiza y ioniza. Cuando llega a la zona analítica del plasma, de 6000 K a 10000 K, la muestra existe como átomos excitados e iones, que representan la composición elemental de la muestra.

El plasma inductivamente acoplado, se obtiene al igual que en el ICP-OES, cuando se aplica una corriente de radiofrecuencia (RF) a través de una bobina generando una corriente que oscila dentro de la bobina. Esta oscilación de RF de la corriente en la bobina provoca la creación de un intenso campo electromagnético en la parte superior de la antorcha. Con gas argón fluyendo a través de la antorcha, se aplica una chispa de alto voltaje al gas, lo que hace que algunos electrones sean despojados de sus átomos de argón; estos electrones, que son atrapados y acelerados en el campo magnético, chocan con otros átomos de argón, arrancando aún más electrones, esta colisión continúa la ionización inducida del argón en una reacción en cadena, rompiendo el gas en átomos de argón, iones de argón y electrones, formando lo que se conoce como descarga de plasma acoplada inductivamente (Thomas, 2001).

6.3 Sistema de extracción de iones: interfaz.

Después de que se produjeron los iones en el plasma, llegarán al espectrómetro de masas a través de una zona de interfaz debido a que el plasma inductivamente acoplado opera a

presión atmosférica, mientras que el discriminador de masas y el detector están en un espacio a alto vacío.

El sistema de vacío se encarga de remover las moléculas de gas presentes dentro del espacio que existe entre la interfaz y el detector del equipo, este sistema se encuentra compuesto por una combinación de bombas turbo moleculares y de bombas mecánicas alcanzando presiones de 1×10^{-5} torr o menores (Pineda, 2016).

El papel de la interfaz es transportar los iones de manera eficiente, consistente y con integridad eléctrica del plasma a la región del analizador del espectrómetro de masas. Primero se logra esto dirigiendo los iones en la región de interfaz. La idea general consiste en que el flujo de iones pase a través de una serie de cámaras con presiones cada vez menores, esto se logra interponiendo entre el plasma y la primera cámara, llamada cámara de expansión, un cono con un orificio de 1 mm de diámetro, estableciendo cierto nivel de vacío. Este cono sampler (muestreador), que generalmente es de níquel, está conectado a sistemas disipadores de calor y a tierra física, a través de este cono la muestra es succionada dentro de la cámara por efecto de la gran diferencia de presiones. Una vez superado el cono de muestreo, el flujo del gas forma una estructura aproximadamente cónica que colisiona con el gas que ocupaba el espacio, causando que la velocidad del chorro baje a niveles subsónicos y que la temperatura se eleve, por lo que un segundo cono metálico (skimmer) de orificio más pequeño ($\sim 0,4$ mm) se interpone antes de llegar a la siguiente zona, ya que sólo el material cercano al eje del chorro cónico es representativo de la muestra introducida. Este segundo obstáculo permite sólo el paso de la fracción más central de este chorro y un tercer cono (Hyper-skimmer) para producir un haz de iones bien enfocado que ayude al Quadrupole Ion Deflector (QID) para filtrar átomos neutros, fotones y asegurar que el equipo no requiere mantenimiento más allá de los conos (PerkinElmer, 2013) ver figura 14.



Figura 14. Interfaz de triple cono en ICP-MS (PerkinElmer, 2013).

Para reducir los efectos de las altas temperaturas del plasma en los conos, la carcasa de la interfaz de triple cono está enfriada con agua y está hecha de un material que disipa el calor fácilmente, como cobre o aluminio. Entonces los iones emergen del cono skimmer, donde son dirigidos a través de la óptica de iones, y finalmente son guiados al dispositivo de separación de masas (Litter et al., 2009; Thomas, 2001).

6.4 Discriminación de iones: Multi-cuadrupolo.

El NexION 350 es un sistema multi-cuadrupolo que proporciona un excelente control del haz de iones, capaz de suprimir y eliminar las interferencias espectrales que se encuentran en muestras complejas con alta eficiencia de transmisión de iones. Esta excelente resolución de masa es capaz de garantizar límites de detección excepcionales, excelentes relaciones señal-ruido de analito y proporcionar confianza en los resultados. Los cuadrupolos del NexION 350 consisten en el deflector de iones cuadrupolo que gira el haz de iones del analito 90 grados para separarlos de los átomos neutros, hacia un cuadrupolo que actúa como un filtro de masa o como una guía de iones para dirigir los iones al detector con el mayor rendimiento (PerkinElmer, 2013).

Los cuadrupolos electromagnéticos, que separarán por relación masa-carga a los iones, consisten en 4 barras metálicas montadas de forma equidistante entre ellas, alrededor de una circunferencia, y sometidas a una combinación de corrientes continuas (DC) y alternas (RF), estas últimas en el intervalo de las radiofrecuencias. Se aplica una combinación de potenciales RF / DC a los pares de las barras del cuadrupolo, de forma que las barras diagonales tienen el mismo potencial, pero las barras adyacentes están desfasadas 180° en cuanto a la componente alterna. Con el voltaje DC se consigue enfocar los iones en el eje, y con la radiofrecuencia se consigue atraer y repeler a los iones de tal manera que su trayectoria dentro del cuadrupolo es alterada, generando así fluctuaciones en el plano perpendicular al eje principal de movimiento. Debido a esto, los iones se mueven circularmente a través del eje del cuadrupolo, es decir, la composición de movimientos da una hélice (Litter, et al., 2009).

En función de sus velocidades, el ion más ligero llega primero, seguido del ion de masa media, y finalmente el más pesado. Utilizando tubos de vuelo de 1 m de longitud, incluso los iones más pesados suelen tardar menos de 50 s en llegar al detector donde emergerá y serán

convertidos en un pulso eléctrico por el detector (Thomas, 2001). Los otros iones de diferentes relaciones masa-carga pasarán a través de los espacios entre las varillas y serán expulsados del cuadrupolo. Luego, el proceso se repite para otro analito con una relación masa-carga completamente diferente hasta que se hayan medido todos los analitos en un análisis de elementos múltiples.

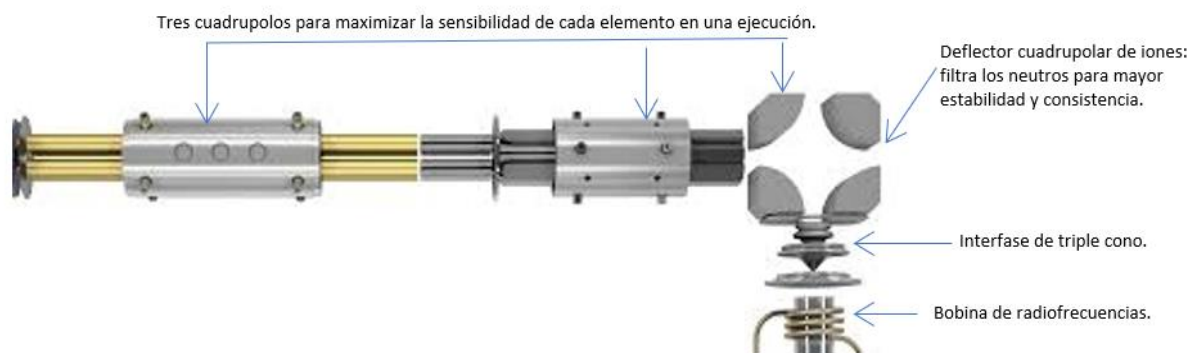


Figura 15. Esquema de funcionamiento de la parte interna de un ICP-MS (traducido de PerkinElmer, 2013).

6.5 Detector

Los dos tipos de detectores más empleados en los equipos de ICP-MS son los sistemas multiplicadores de electrones, para un bajo número de cuentas, y los colectores de Faraday, para un alto número de cuentas. Los multiplicadores de electrones de dínodo discreto reciben y amplifican una señal de iones que es proporcional a la concentración al asociarlo a una calibración externa; funcionan por el mismo principio que un tubo fotomultiplicador, pero con iones. El detector está constituido por una serie de dínodos conectados a potenciales cada vez mayores conforme se va recorriendo su interior. Una vez que los iones positivos pasan el cuadrupolo, son atraídos por el alto voltaje aplicado al interior del detector; cuando un ion colisiona con la superficie (interior) del primer dínodo, se emiten electrones secundarios que son atraídos por la diferencia de potencial del segundo dínodo, y así sucesivamente. Por cada etapa, se generan cada vez más electrones secundarios, ya que se produce un efecto en cascada, las señales de alta intensidad se miden desde el dínodo final, como voltajes (modo analógico), que posteriormente se normalizan a equivalentes cps de factores de conversión de pulso a analógico (optimizados previamente durante la sintonización del instrumento). Para algunas aplicaciones donde los límites de detección de ultra trazas no son requeridos, el haz de iones del analizador de masas es dirigido hacia un electrodo metálico simple, o copa de Faraday. La funcionalidad de doble etapa de este detector logra un rango de detección lineal

que se extiende desde ppt, hasta decenas de ppm dentro de un único análisis de elementos múltiples, lo que comúnmente evita la necesidad de una dilución adicional (Ríos, M. y Hernández, H., 2020; Thomas, 2001; Litter, et al., 2009).

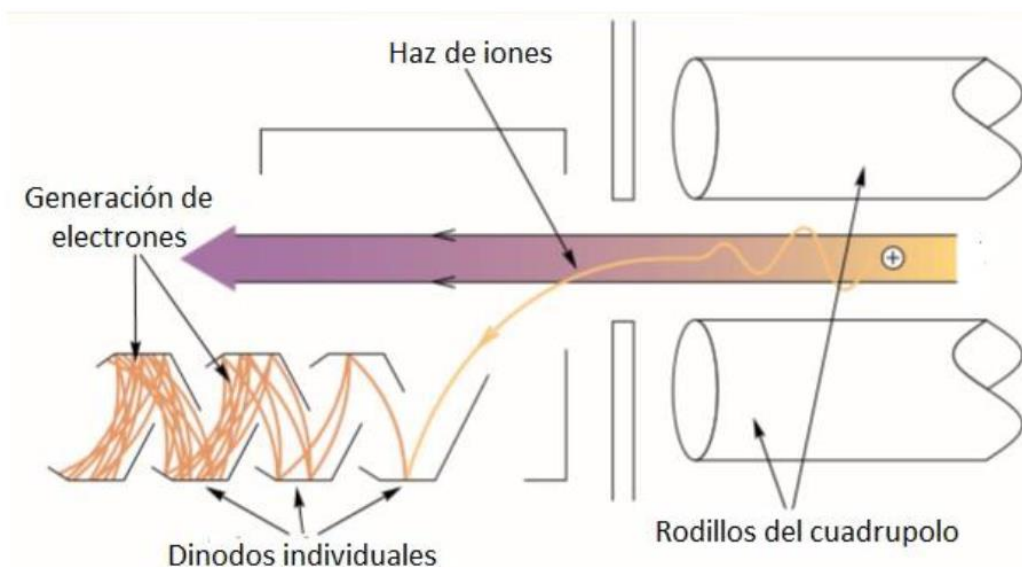


Figura 16. Esquema del multiplicador de electrones en ICP-MS (Thomas, 2001).

6.6 Interferencias.

Para obtener el análisis cuantitativo más preciso, las interferencias potenciales que pueden afectar a la medición de las corrientes iónicas deben eliminarse o minimizarse. Para los efectos de interferencia menores por lo general se puede aplicar varios tipos de correcciones para minimizar su importancia o compensar el error (Taylor, 2001).

Tener un previo conocimiento de las interferencias asociadas con un particular grupo de muestras, frecuentemente indicará los pasos para su preparación y la metodología instrumental para analizarlas (Thomas, 2002). Las interferencias en ICP-MS se clasifican en tres categorías: espectrales, de matriz y físicas, las cuales, con la instrumentación moderna y el software adecuado, combinados con metodologías de análisis confiables, han minimizado su impacto negativo en la determinación de elementos a nivel de trazas (Taylor, 2001). Las posibles interferencias que se pueden identificar por ICP-MS para líquido pleural son las siguientes:

-Las interferencias de espectroscópicas en general dan lugar a un error positivo en la medición de la corriente del ion analito y afectan la medición de corriente de iones de isótopos específicos en el espectro de masas (Taylor, 2001). Pueden ser isobáricas, poliatómicas, de óxidos y de iones con doble carga. Las interferencias isobáricas son

causadas por isótopos de otros elementos (^{204}Hg , ^{204}Pb), o especies poliatómicas que tienen la misma masa - carga nominal que el analito ($^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$ frente a ^{56}Fe , 2 moléculas de ^{40}Ar frente a ^{80}Se) (Litter, et al., 2009). No obstante, estas interferencias ahora pueden eliminarse o reducirse sustancialmente, mediante una combinación de características de plasma optimizados, selección de isótopos alternativos no interferidos, uso de ecuaciones de interferencia y/o uso de la tecnología de celdas de reacción de colisión. (Ríos, M. y Hernández, H., 2020).

-Las interferencias de matriz pueden afectar la calidad de los análisis de dos formas básicas, la primera de ellas es resultado del transporte de la muestra y es una supresión física de la señal del analito, esto es consecuencia de un alto nivel de sólidos disueltos o de una alta concentración de ácidos en la muestra. Se origina por una mal formación de las gotas en el nebulizador o por una mala selección del tamaño de gotas en la cámara de spray. Para evitar estas interferencias se debe asegurar que la muestra no presenta sólidos en suspensión (Taylor, 2001; Thomas, 2002b).

-Las interferencias físicas están asociadas a procesos físicos que intervienen en el transporte de la muestra al plasma, procesos de conversión y la transmisión de iones de la interfase del plasma al espectrómetro de masas. Las interferencias físicas pueden ocurrir en la transferencia de la muestra al nebulizador (viscosidad), en la formación del aerosol y transporte al plasma (tensión superficial), durante el proceso de atomización e ionización en el plasma o durante la transferencia de iones de la interfase al espectrómetro de masas (efecto carga). Para minimizar estos efectos, la composición y concentración de ácido debe ser la misma para estándares, blancos y muestras. Es importante la adición de un estándar interno para compensar las interferencias físicas; También se pueden presentar las interferencias de efecto memoria que son debidas a las contribuciones de señales de analitos medidos previamente a la muestra, debido a la deposición de la muestra en componentes del sistema de introducción; estas interferencias pueden ser minimizadas con el uso de blancos entre muestras (Litter, et al., 2009).

7. Validación de métodos analíticos.

De acuerdo con la guía de adecuación al uso de los métodos analíticos “A focus for analytical chemistry in Europe” EURACHEM (del inglés). La validación de métodos es un requisito importante en la práctica de los análisis químicos, para que un resultado analítico sea apto

para su uso implica que éste debe ser lo suficientemente fiable para que cualquier decisión basada en él, pueda ser tomada con confianza. Debe validarse el desempeño de un método cuando es necesario demostrar que sus características de desempeño son adecuadas para el uso previsto y estimar la incertidumbre del resultado, para un determinado nivel de confianza. La validación debe ser tan amplia como sea necesaria para cumplir con los requisitos en relación con el uso dado o la aplicación, para lo cual se evalúan los siguientes parámetros del método.

7.1 Límite de detección y de cuantificación: Cuando las mediciones se realizan a concentraciones bajas, es necesario establecer un valor de resultado que es considerado un nivel de analito significativamente diferente de cero; conocer la concentración más baja del analito que puede ser detectada por el método a un nivel de confianza especificado “límite de detección” (LOD) o valor mínimo detectable y establecer el nivel más bajo en el cual el desempeño es aceptable para una aplicación típica “límite de cuantificación” (LOQ).

También es necesario distinguir entre el límite de detección del instrumento y el límite de detección del método. El límite de detección del instrumento puede basarse en el análisis de una muestra, usualmente un blanco de reactivo, sometido directamente al instrumento, mientras que, para obtener el límite de detección de un método, el LOD debe basarse en el análisis de muestras que hayan sido sometidas a todo el proceso de medición obteniendo resultados calculados con la misma ecuación que para las muestras de ensayo.

El LOD como el LOQ normalmente se calculan multiplicando una desviación estándar por un factor adecuado.

De acuerdo con la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) el límite de detección se establece como:

$$LOD = 3 \times So \quad \dots \dots \dots \dots \dots \dots \dots \text{Ecuación 1}$$

donde:

So: Es la desviación estándar obtenida.

3: Un valor constante.

Mientras que el límite de cuantificación se establece como:

$$LOQ = 10 \times So \quad \dots \dots \dots \dots \dots \dots \dots \text{Ecuación 2}$$

donde:

So: Es la desviación estándar obtenida.

10: Un valor constante.

7.2 Intervalo de trabajo: Es el intervalo en el cual el método proporciona resultados con una incertidumbre aceptable. El extremo inferior del intervalo de trabajo está determinado por el límite de cuantificación, LOQ. El extremo superior del intervalo de trabajo está definido por las concentraciones a las cuales se observan anomalías significativas en la sensibilidad analítica. Durante la validación, se debe evaluar tanto el intervalo de trabajo del instrumento como el del método. Los datos sobre el intervalo de trabajo a menudo se generan durante el desarrollo del método.

7.3 Sensibilidad: Es la variación de la respuesta del instrumento que corresponde a una variación de la magnitud medida y en curvas de calibración se evalúa con la pendiente de la curva respuesta -concentración, o el cambio de respuesta analítica por unidad de concentración. Entre mayor sea la pendiente, el método es más sensible.

7.4 Precisión: repetibilidad y reproducibilidad.

Precisión es una medida de cuán cerca están los resultados entre sí. Por lo general, se expresa mediante la desviación estándar relativa (% RSD), calculada a partir de los resultados obtenidos mediante la realización de mediciones repetidas en un material adecuado en condiciones específicas.

Repetibilidad, supone dar la más pequeña variación en los resultados, es una medida de la variabilidad en los resultados cuando una medición se lleva a cabo por un solo analista utilizando el mismo equipo en un corto plazo de tiempo mientras que la reproducibilidad, supone dar la mayor variación en los resultados, ya que es una medida de la variabilidad cuando uno o más de los factores involucrados en una medición sufren un cambio, por ejemplo un cambio del analista, del equipo o un amplio plazo de tiempo.

7.5 Recobro: Cuando se desarrolla un método de cuantificación no se sabe si la cantidad de analito obtenida es la existente en la matriz, este parámetro indica el grado de recuperación del analito añadido después de la extracción/ digestión que se realizó a la matriz de estudio.

Ecuación 3. Cálculo del porcentaje de recuperación de estándar.

$$\% \text{ Recobro} = \frac{(Muestra\ con\ estándar\ añadido(\frac{ng}{mL}) - Muestra\ sin\ estándar(\frac{ng}{mL}))}{Estándar\ añadido(\frac{ng}{mL})} \times 100$$

8. Trabajos relacionados con la cuantificación de elementos en líquido pleural.

Tabla 2. Concentración elemental reportada en líquido pleural.

RANGO	ELEMENTO	Rangos reportados en otros artículos.^{1,2,3,4}(ng/mL)
<i>MINORITARIOS</i> (1000-100) ng/mL	Fe	2116-747.7
<i>TRAZA</i> (100-10) ng/mL	Cu	910.5-608
	Zn	545.7-283
	Al	341.0-46
<i>ULTRA TRAZA</i> (<10 ng/mL)	As	5.3-2.66
	Pb	3.1-0.63
	Mo	2.9-1.05
	Cr	2.7 - 0.98
	Sn	2.0 - 0.33
	Mn	0.87-0.83
	V	0.36-0.22
	Co	0.24-0.17
	Ag	0.2-0.18

¹ Lee et al, 2017; ² Bai et al, 2019; ³ Ho et al, 2019; ⁴ Bai et al, 2021.

9. Objetivos:

9.1 Objetivo general:

Implementar una metodología para el análisis y cuantificación de elementos presentes en muestras de líquido pleural de pacientes del INER, residentes de la Ciudad de México, empleando los métodos analíticos ICP-OES e ICP-MS con previa digestión de muestras en horno de microondas.

9.2 Objetivos particulares:

- Implementar un método de digestión ácida vía horno de microondas para analizar muestras de líquido pleural.
- Identificar los elementos presentes en líquido pleural de paciente con diagnóstico de cáncer de la Ciudad de México, mediante una técnica espectroscópica.

- ❑ Implementar un método de análisis mediante ICP-MS para analizar líquido pleural.
- ❑ Verificar la eficiencia del método de digestión y cuantificación de los elementos en líquido pleural por ICP-OES obteniendo los parámetros de validación.
- ❑ Operar y optimizar el desempeño de un equipo de ICP-OES e ICP-MS.

10. Hipótesis.

Empleando un método de extracción ácida y los métodos de análisis espectroscópicos de trabajo se podrán realizar los análisis cuantitativo y cualitativo de los elementos químicos presentes en líquido pleural de pacientes del INER, residentes de la Ciudad de México.

11. Metodología

La metodología empleada en el proyecto se presenta en el diagrama de la figura 17.

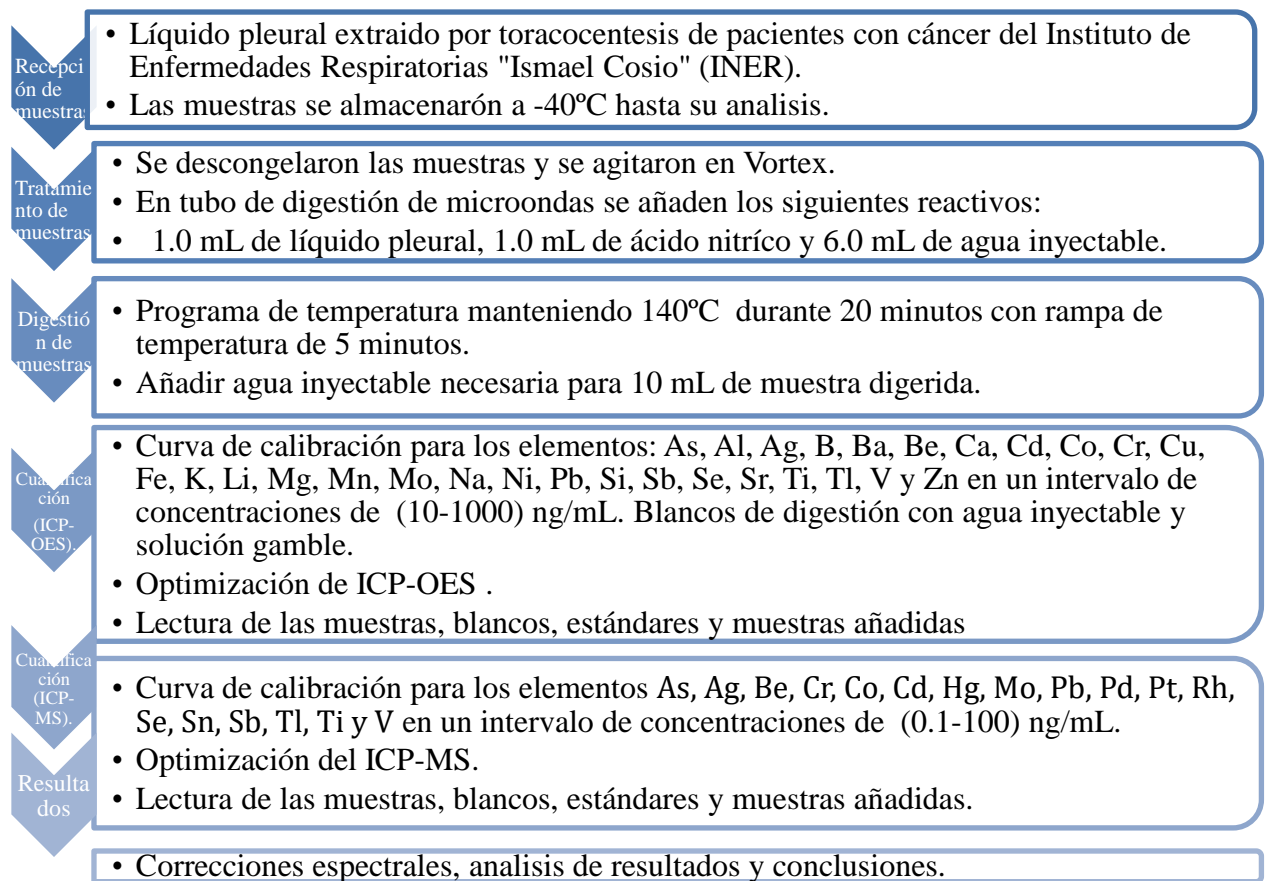


Figura 17. Diagrama de la metodología empleada en el proyecto.

11.1 Recepción de muestras.

Para este estudio se analizaron 133 muestras de líquido pleural de pacientes del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), extraídas por toracocentesis a paciente que residen en la ciudad de México, posterior a la toma de muestra estas fueron distribuidas en alícuotas de 1.0 mL y se almacenaron a -40 °C hasta su análisis.

11.2 Control de calidad.

Para identificar posibles contaminaciones o interferencias durante el estudio, se implementaron diferentes controles de calidad en las diferentes etapas del proyecto:

- I. Blancos de reactivos: disolución del ácido nítrico y agua utilizados en las muestras en las mismas proporciones y condiciones de digestión.
- II. Blancos de disolvente: blancos del agua inyectable y agua desionizada empleadas en el proyecto.
- III. Blanco con disolución gamble: disolución artificial de líquido pleural con ácido nítrico y agua utilizados en las muestras en las mismas proporciones y condiciones de digestión.
- IV. Controles de contaminación: a lo largo de cada una de las etapas se preparó un blanco con disolvente (agua inyectable). Se empleó un blanco para cada una de las etapas de pesado, digestión y análisis, colocando envases libres de metales con agua desionizada expuestos al aire ambiental. Estos controles de calidad fueron analizados junto con las muestras para tener un control de las contaminaciones y así poder descartar lecturas falsas-positivas.
- V. Blancos de limpieza: al terminar el proceso de digestión de muestras se realizó una digestión de 10 mL de ácido nítrico al 70 % (J. T. Baker); estos controles fueron analizados para detectar posibles contaminaciones en los tubos de digestión.
- VI. Disoluciones muestra: Preparación en duplicado de muestra 20, lectura analítica en duplicado de muestras y muestras añadidas con disolución estándar.

11.3 Tratamiento de muestras.

Las muestras de líquido pleural fueron descongeladas en baño de agua (T. Ambiente) y homogeneizadas con un vórtex. Posteriormente, se añadió una alícuota de 1.0 mL de la muestra a los tubos de digestión con micropipeta (Boeco Germany), estos fueron pesados con una balanza analítica (Sartorius, modelo SP2215), posteriormente, se agregaron 1.0 mL de ácido nítrico (J.T. Baker, ultrapuro) y 6.0 mL de agua inyectable (PISA).

11.4 Preparación de disoluciones para evaluar de recuperación de elementos.

11.4.1. Adiciones de estándar.

Entre las muestras con mayor volumen, se eligió la muestra 20 para la adición de 0.05 mL de disolución estándar de 1 ppm, del estándar s21 y s7 (tabla 6); previo a la digestión para evaluar el impacto de los efectos de matriz en la recuperación de la concentración de elementos añadidos.

11.4.2. Adiciones de estándar a blancos.

A 2 blancos de digestión, se les agregó 0.05 mL y 0.01 mL de las disoluciones estándar s7 y s2, correspondiente para evaluar el impacto de las condiciones de digestión (potencia, temperatura, tiempo y presión) en la recuperación de elementos añadidos.

Además, a los blancos de digestión con solución Gamble de la digestión 5, se les adiciono 1 mL y 2 mL de disolución estándar s7 y s21 correspondiente, para evaluar el impacto de las condiciones de digestión (potencia, temperatura, tiempo y presión) en condiciones similares a la matriz del líquido pleural y la recuperación de elementos añadidos.

11.4.3. Curva de calibración en solución Gamble.

Se preparó una curva de calibración con alícuotas de solución Gamble, descongeladas en baño de agua (T. Ambiente) y homogeneizadas con un vórtex. Posteriormente, se añadió directamente a los tubos de digestión sobre la balanza analítica (Sartorius, modelo SP2215) una alícuota de 1.0 mL con micropipeta (Boeco Germany) de la solución gamble, y se añadieron alícuotas de (5.0, 1.0, 0.7, 0.5, 0.3, 0.1) mL respectivamente de disolución estándar de 1 ppm de s21 y s7, posteriormente se agregaron 1.0 mL de ácido nítrico (J.T. Baker, ultrapuro) y 6.0 mL de agua inyectable (PISA) obteniéndose una curva de calibración de (10-500) ng/mL de los elementos contenidos en los estándares s7 y s21 (Tabla 6).

11.5 Digestión en microondas.

Para la digestión de muestras se utilizó un horno de microondas marca PerkinElmer®, modelo TITAN MPS con un intervalo de temperatura de 50 °C a 260 °C y presión de 0 bar a 100 bar (ver Figura 19) con el programa de digestión indicado en la tabla 4.

Tabla 4. Programa de digestión utilizado.

<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Presión (bar)</i>	<i>Rampa (min)</i>	<i>Sostén (min)</i>
140	60	5	5
140	60	1	20
50	60	1	0
50	0	0	0

El horno de microondas consta de 8 posiciones para la colocación de tubos de digestión, 7 posiciones se utilizaron para colocar tubos con muestras; en cada ronda de digestión, en la octava posición se colocó un blanco de digestión que contenía la misma preparación que las muestras, pero en lugar de la muestra se agregó 1.0 mL de agua inyectable (PISA). En algunos casos el número de muestras ingresadas fue menor y se digirieron las muestras añadidas con disoluciones estándar, blancos añadidos o de solución gamble.

Finalizado el programa de digestión, se enfriaron los tubos en baño de agua a temperatura ambiente por 10 minutos; posteriormente se transfirió cuantitativamente a tubos Falcón el producto de cada digestión y se registraron los datos de masa de los tubos vacíos y con el producto de digestión de aproximadamente 10 g.

11.6 CUANTIFICACIÓN DE ELEMENTOS EN ICP-OES.

11.6.1 Optimización del equipo ICP-OES.

Las muestras se analizaron con un equipo de ICP-OES marca PerkinElmer® modelo AVIO 500 en el laboratorio de análisis químico del Edificio D de la Facultad de Química, UNAM ubicado en la Ciudad de México; el equipo opera con el software Syngistix el cual permite la optimización de las condiciones de lectura con el fin de lograr la máxima sensibilidad y precisión del equipo.

El equipo requiere de un enfriamiento de los detectores a -40 °C por lo que se enciende 1 hora antes de su uso para el análisis. Se procedió a colocar un nebulizador e inyector previamente lavados en disolución de HNO₃ al 5% por 24 horas y secado; se hizo una prueba para verificar el goteo continuo, esto con el fin de asegurar una buena lectura y ninguna fuga, a continuación, se encendió el recirculador, el extractor y se abrió el tanque de argón verificando que la presión se encontrara a 80 psi. Se continuó ajustando los parámetros de operación del sistema, optimizando los flujos de gas, se obtuvieron las condiciones de operación como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Condiciones de trabajo del equipo ICP-OES.

Parámetro	Valor
<i>Flujo del nebulizador.</i>	0.7 L/min
<i>Flujo del gas auxiliar.</i>	0.2 L/min
<i>Flujo de gas para el plasma.</i>	10 L/ min
<i>Tipo de lectura</i>	Axial
<i>Potencia</i>	1500 W
<i>Flujo de bomba</i>	2 mL/ min

En la optimización del equipo se utilizó una disolución estándar de manganeso (Mn) PerkinElmer® de 1 mg/L, debido a que es un elemento intermedio en la tabla periódica lo que lo vuelve una buena referencia para alinear el equipo permitiéndonos leer casi todos los elementos de la tabla periódica. En el software se colocaron los parámetros a utilizar para hacer el método de los nombres y número de muestras a leer, número de lecturas de cada muestra, ecuación de calibración, flujos de bomba, argón y nebulizador y se alineó la óptica con la posición de la antorcha con el fin de obtener la mayor intensidad en cada señal analítica con la menor cantidad de interferencias posibles.

11.6.2 Curvas de calibración.

En la etapa de análisis, se preparó una curva de calibración externa; fueron preparadas disoluciones estándar, empleando como disolución matriz dos estándares multi-elementales de calibración de PerkinElmer® para ICP-OES (Tabla 6).

Tabla 6. Características de las disoluciones patrón multi-elementales utilizadas.

Reactivo	Elementos y concentración	Especificaciones
<i>Estándar de control de calidad s7</i>	K-1000 µg/mL Si-500 µg/mL Al, B, Ba, Na 100 µg/mL Ag 50 µg/mL	Marca PerkinElmer Tru Q Lote 56-197CRY1 Matriz: 5% HNO ₃ / Tr.HF. Fecha de expiración: 30 julio 2023
<i>Estándar de control de calidad s21</i>	As, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Sr, Ti, Tl, V, Zn 100 µg/mL	Marca PerkinElmer Tru Q Lote 55-060CRY1 Matriz: 5% HNO ₃ / Trazas HF. Fecha de expiración: 30 julio 2023

La curva de calibración consiste en 5 disoluciones estándar de concentraciones 0.01 µg/mL, 0.05 µg/mL, 0.1 µg/mL, 0.5 µg/mL y 1 µg/mL. La solución de 1 µg/mL se preparó a partir de una alícuota de 0.1 mL de las disoluciones estándar s7 y s21 (ver tabla 6), a partir de esta disolución se prepararon los demás estándares (Anexo 3).

11.6.3 Análisis en ICP-OES.

Tras la calibración del equipo se procedió a llevar a cabo el análisis de las muestras, así como los blancos de solución Gamble, reactivos y los controles de calidad. Cada 20 muestras se llevó a cabo la medición de un estándar de calibración intermedio para verificar la validez de la curva de calibración, si la diferencia de los valores obtenidos del estándar era mayor al 10 % se llevaron a cabo las correcciones necesarias sobre los resultados obtenidos.

11.7 CUANTIFICACIÓN DE ELEMENTOS EN ICP-MS.

11.7.1 Optimización del equipo ICP-MS.

Posterior al análisis por ICP-OES, se realizó la cuantificación por ICP-MS, se utilizó un espectrómetro de masas acoplado inductivamente a plasma de la marca PerkinElmer®, modelo NexION TM 300D ubicado en el departamento de toxicología del CINVESTAV-IPN (ver Figura 12).

El proceso de optimización del equipo se realizó ajustando las condiciones del equipo mediante su software, realizando el Daily Performance Check, alineando la antorcha y ajustando los lentes con la disolución estándar de la tabla 7.

Tabla 7. Disolución estándar para la comprobación diaria de rendimiento de ICP-MS.

Reactivo	Elementos y concentración	Especificaciones
<i>Disolución de configuración NexION</i>	Be, Ce, Fe, In, Li, Mg, Pb, U (1 µg/mL)	Marca PerkinElmer TruQms Lote 37-106GSX1 Matriz 1% HNO ₃ . Fecha de expiración: 28 febrero 2023.

En el proceso de optimización se verificó la sensibilidad del equipo en el intervalo de trabajo, para ello se verificaron las masas de tres elementos, es decir, masa baja (Be 9), masa media (In 115) y masa alta (U 238). También se midió el ruido de fondo y la relación entre la generación de óxidos y iones doblemente cargados contra un elemento de referencia que es el Ce, así como la repetibilidad en las mediciones usando el % RSD de las masas baja, media y alta. Los criterios fijados para el análisis se establecen en el equipo, cuando se plantea un análisis de ultra-trazas. Estos criterios fijados y los criterios obtenidos se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Criterios de optimización de ICP-MS.

No.	Analito/ (Longitud de onda)	Criterio	Objetivo
1	Be (9.0122)	>	2000
2	Mg (23.985)	>	15000
3	In (114.904)	>	40000
4	U (238.05)	>	30000
5	Ruido de Fondo (220)	≤	1
6	CeO (155.9) /Ce (139.905)	≤	0.025
7	Ce ⁺⁺ 69.9527 /Ce 139.905	≤	0.03

Tabla 9. Parámetros de operación de ICP-MS.

Parámetro	Valor
Flujo de Ar para nebulizar	0.72 L/min
Potencia de RF ICP	1600 W
Diferencia de potencial de modo análogo del detector	-2324 V
Diferencia de potencial de modo pulso del detector	1652 V
Presión de vacío	3.6×10^{-7} psi
Diferencia de potencial del deflector	-11.17 V

11.7.2 Curva de calibración.

Primero se preparó una curva de calibración externa para el equipo, para ello fueron preparadas disoluciones estándar de modo que se pudiera construir la curva de calibración, empleando como disolución matriz cuatro estándares multielementales de calibración de PerkinElmer® para ICP-MS (Tabla 10).

Tabla 10. Características de las disoluciones patrón multi-elementales utilizadas en ICP-MS.

Reactivo	Elementos y concentración	Especificaciones
<i>Estándar de calibración multi elemental 3</i>	Ag, Al, As, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Ga, In, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Rb, Se, Sr, Tl, U, V, Zn (10 µg/mL)	Marca PerkinElmer Pure Plus Lote CL51-046CRY1 Matriz 5 % HNO ₃ Fecha de expiración: 30 Abril 2022.
<i>Estándar de calibración multi elemental 5</i>	B, Ge, Mo, Nb, P, Re, S, Si, Ta, Ti, W, Zr (10 µg/mL)	Marca PerkinElmer Pure Plus Lote CL51-066CRY1 Matriz H ₂ O/0.2 % HF/Tr. HNO ₃ Fecha de expiración: 30 mayo 2022.
<i>Estándar de calibración de mercurio</i>	Hg (10 µg/mL)	Marca PerkinElmer Pure Plus Lote CL12-55HGY1 Matriz 5 % HNO ₃ densidad 1.024 g/mL. Fecha de expiración: 30 abril 2022.
<i>Estándar de calibración multi elemental 4</i>	Au, Hf, Ir, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Sn, Te (10 µg/mL)	Marca PerkinElmer Pure Plus Lote CL51-037CRY1 Matriz 10 % HCl 1 % HNO ₃ . Fecha de expiración: 30 mayo 2022.

La curva de calibración se diseñó en un intervalo amplio para seleccionar posteriormente el intervalo de concentración a utilizar, para cada elemento de acuerdo con la sensibilidad reportada por el fabricante. La curva de calibración consiste en 16 estándares de concentraciones (0.1-100) ng/mL, fue seccionada en valores; bajos, medios y altos, se utilizaron 5 estándares por elemento, considerando el intervalo de concentración en el que probablemente se encuentra el elemento en la muestra.

La curva de calibración consiste en 16 disoluciones estándar de concentraciones 0.1 ng/mL, 0.2 ng/mL, 0.4 ng/mL, 0.6 ng/mL, 0.8 ng/mL, 1 ng/mL, 2 ng/mL, 4 ng/mL, 6 ng/mL, 8 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL, 40 ng/mL, 60 ng/mL, 80 ng/mL, 100 ng/mL preparados a partir de las disoluciones de la tabla 10.

Para preparar los estándares de la curva, primero se preparó una disolución con concentración de 1000 ng/mL a partir de las disoluciones patrón multi elementales (Anexo 3).

Análisis en ICP-MS.

Tras la calibración del equipo se procedió a llevar a cabo el análisis de las muestras, así como los blancos de solución Gamble, reactivos y los controles de calidad. Cada lote con 20 muestras se analizó un blanco de agua inyectable, para descartar interferencias de efectos de memoria, además de un estándar de calibración intermedio, para verificar la validez de la curva, si la diferencia de los valores obtenidos del estándar era mayor al 10 % se llevaban a cabo las correcciones necesarias sobre los resultados obtenidos.

12. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En esta sección se muestran los resultados de la cuantificación de elementos presentes en muestras de líquido pleural de pacientes con cáncer del INER, la primera parte corresponde a los resultados de las pruebas de validación del método.

12.1 Calibración y linealidad.

La linealidad se evaluó para cada elemento empleando el coeficiente de determinación (R^2) de las curvas de calibración. La figura 18 muestra dos ejemplos de curvas de calibración para los elementos minoritarios hierro (Fe) y magnesio (Mg) cuantificados por ICP-OES mientras

que la figura 19 muestra dos ejemplos de curvas de calibración de los elementos traza rodio (Rh) y cromo (Cr), cuantificados por ICP-MS.

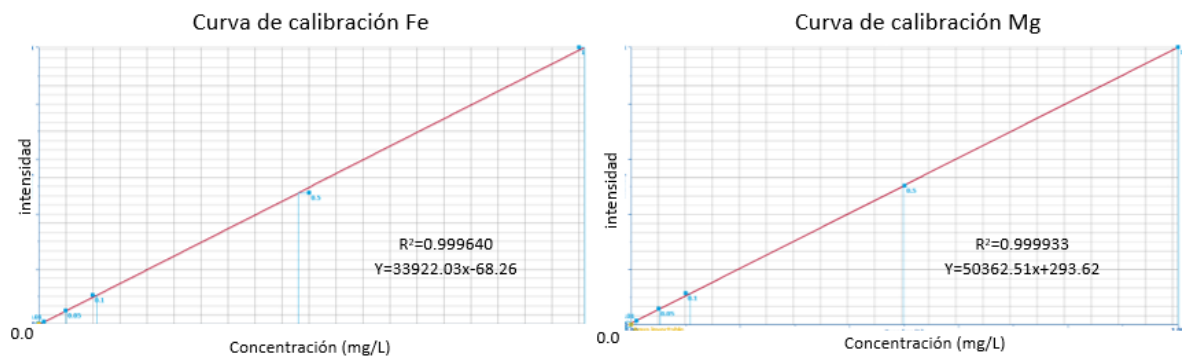


Figura 18. Ejemplos de curva de calibración en ICP-OES de hierro (Fe) y magnesio (Mg).

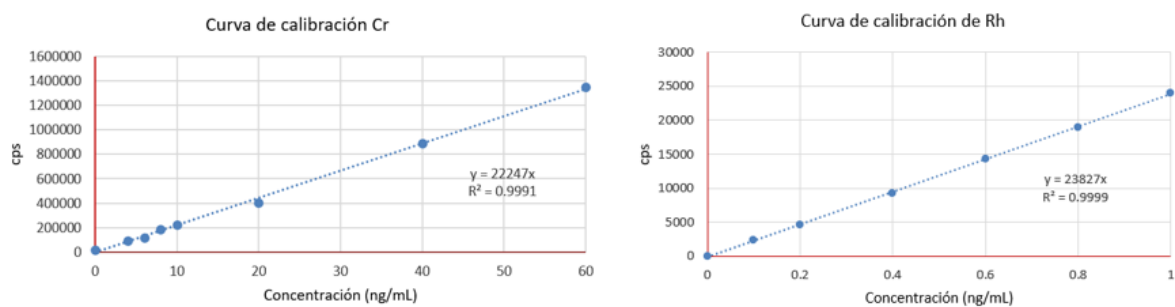


Figura 19. Ejemplo de curvas de calibración en ICP-MS de cromo (Cr) y rodio (Rh).

A partir de las curvas de calibración; en el anexo 1 se presentan las tablas 16 y 17 con los resultados de R^2 y las pendientes obtenidas de las curvas de calibración de los elementos cuantificados en ICP-OES e ICP-MS; se observa que los valores de pendiente son altos, en orden de 10^2 a 10^6 dependiendo del elemento, la metodología presenta más sensibilidad para elementos como estroncio (Sr) y potasio (K) y menor para elementos como titanio (Ti) y selenio (Se), aun con diferentes niveles de sensibilidad, de acuerdo con los valores de las pendientes, que a mayor pendiente (m), más sensible es la técnica y presenta una relación señal/ concentración más exacta, la metodología presenta alta sensibilidad para la cuantificación de estos elementos por estas técnicas espectroscópicas.

De forma complementaria en la siguiente figura se presenta la comparación de los coeficientes de determinación para la curva de calibración de cada elemento.

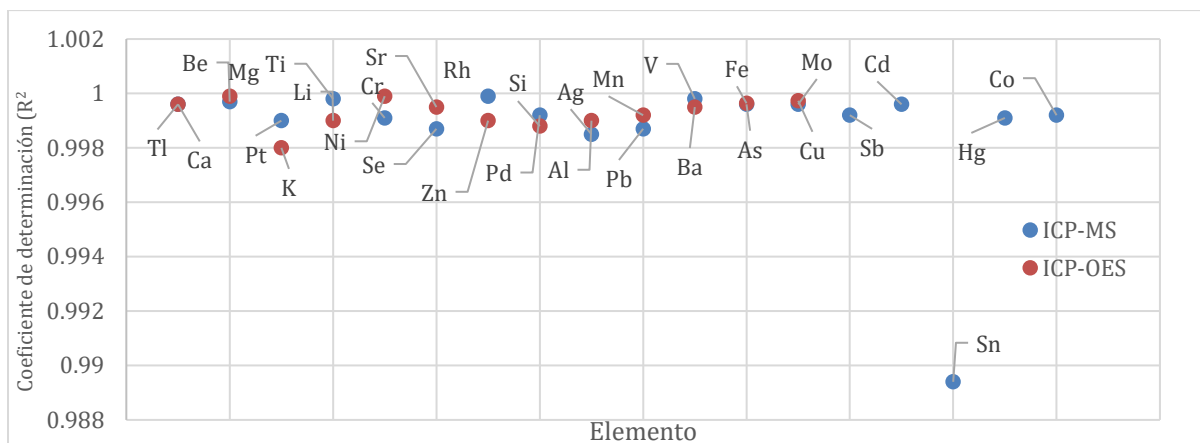


Figura 20. Gráfico comparativo de coeficientes de determinación (R^2) de las curvas de calibración de los elementos cuantificados por ICP-OES e ICP-MS.

En la figura 20 se observa que la mayoría los elementos presentan R^2 mayor o igual a 0.998 a excepción de estaño (Sn); de acuerdo con la EURACHEM y para los fines de este proyecto, se considera una $r^2 > 0.99$ aceptable para trabajar con esta metodología de calibración externa en el intervalo de trabajo seleccionado para cada elemento.

Respecto a Sn, su valor de R^2 indica una pobre linealidad en el intervalo de calibración; haciendo así el método de análisis inadecuado para la determinación de este elemento en este intervalo, por este motivo los resultados de estaño en líquido pleural serán considerados únicamente de forma cualitativa.

12.2 Límites de detección y cuantificación.

Los límites de detección y cuantificación se calcularon a partir de los valores de desviación estándar de 10 mediciones de disoluciones blanco con el cálculo presentado en el anexo 2; en la figura 21 se observa la comparación de los límites de detección (tabla 18, anexo 2) de los espectrómetros para la cuantificación de cada elemento con la metodología aplicada.

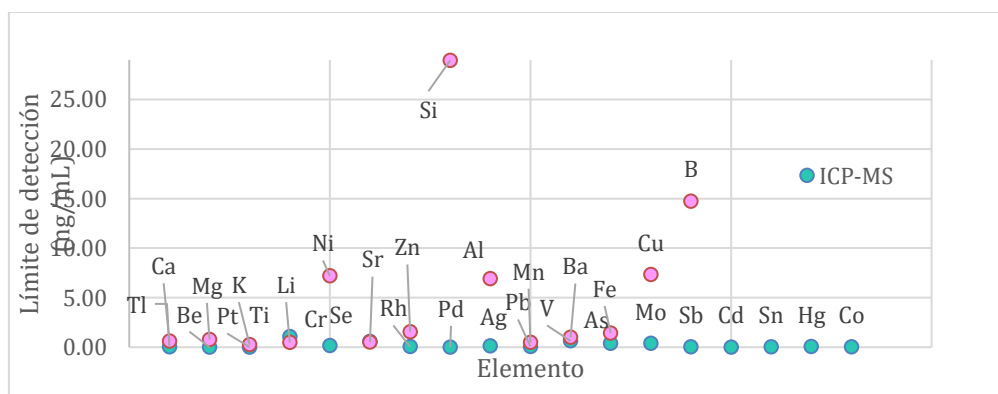


Figura 21. Gráfico comparativo de límites de detección instrumental para cada elemento cuantificado en ICP-OES e ICP-MS.

Entre los límites de detección (LOD) obtenidos, se observa en la figura 21 una tendencia de los LOD de los elementos cuantificados por ICP-MS en un intervalo de 0.01 ng/mL a 1.08 ng/mL, mientras que, los elementos cuantificados por ICP-OES presentan LOD en un intervalo de 0.27 ng/mL a 28.95 ng/mL permitiendo cuantificar elementos en concentraciones traza y ultra trazas presentes en las muestras de líquido pleural.

12.3 Recobro o porcentaje de recuperación de estándar.

Para evaluar este parámetro se utilizaron los estándares s21 y s7 de la tabla 6, usando la ecuación 3 para obtener los porcentajes de recuperación de la tabla

Tabla 11. Porcentaje de recuperación de disolución estándar añadida a muestra 20 añadida.

ICP-MS		ICP-OES	
Elemento	% de recuperación	Elemento	% de recuperación
Ag	69	Al	80
As	91	B	93
Be	121	Ba	< LOD
Cd	93	Ca	87
Co	103	Cu	88
Cr	97	Fe	94
Hg	< LOD	K	112
Mo	154	Li	86
Pb	118	Mg	90
Pd	< LOD	Mn	89
Pt	< LOD	Ni	92
Rh	< LOD	Si	160
Sb	92	Sr	84
Se	99	Zn	80
Sn	59		
Ti	98		
Tl	117		
V	107		

Tomando como referencia la recuperación para contaminantes de la Comisión de control analítico y ampliación de cobertura, se considera un porcentaje de recuperación aceptable entre 80 % y 120 % para ambas técnicas analíticas. De los elementos cuantificados el Cd, Tl,

Sb, Co, Pd, Cr, As, Mo, Se, K, Li, Mn, Sr, Ca, Mg, Fe, Zn, Al, Ni, Cu y B cumplen con este parámetro indicando que los resultados obtenidos son confiables y así se asegura que se obtuvo una buena recuperación de los analitos durante todo el proceso de análisis.

Mientras que, para Be, Pd, Pt, Sn, Rh, Hg, Ag, Ba y Si; la concentración esperada para el estándar añadido a la muestra, la recuperación no fue aceptable, se atribuye esto a interferencias en la matriz para estos elementos, por lo que los datos se analizarán de forma cualitativa.

12.4 Precisión.

La precisión es un parámetro que ayuda a evaluar el error entre mediciones de una muestra durante el análisis. Para evaluar este parámetro se utilizó la desviación estándar relativa (Relative Standard Deviation por sus siglas en inglés % RSD), que es la medida de la variación entre las lecturas de una misma muestra respecto al promedio de sus mediciones. Los resultados que cumplan con un %RSD < 10% indican que la dispersión entre sus valores es baja, garantizando que los resultados de las mediciones en una muestra no varían más allá del 10 % para que el error asociado entre cada medición sea aceptable. Los valores de % RSD para todas las muestras cuantificadas se encuentran por debajo del 10 %.

12.5 Concentraciones en el líquido pleural.

Partiendo de los resultados del análisis elemental de las disoluciones de líquido pleural, se calcularon las concentraciones de los elementos presentes en el líquido pleural; con el fin de no saturar el presente trabajo con información, se presenta únicamente la mediana, el número de muestras en las que se cuantificó y los intervalos de los datos obtenidos para la concentración de cada elemento.

12.5.1 Concentración de elementos cuantificados en ICP-OES.

A partir de la concentración determinada por el equipo se obtuvieron las concentraciones en líquido pleural empleando el factor de dilución de 10, considerando masa de la alícuota y masa de la disolución final, posteriormente se obtuvo la mediana de las concentraciones. La Tabla 12 presenta los 13 elementos cuantificados por ICP-OES en las muestras analizadas de líquido pleural.

Tabla 12. Elementos cuantificados por ICP-OES.

Elemento	Mediana de concentración de elementos en Líquido pleural (ng/mL)	Intervalo de concentraciones de los elementos en el líquido pleural (ng/mL)	Número de muestras en las que se detectó el elemento
Ca	61738	(104803-28587)	132
K	20451	(8492-43779)	133
Mg	14344	(7310-29868)	133
Fe	3290	(42-5103)	106
Cu	589	(80-1473)	109
Zn	404	(42-1043)	80
Si	293	(109-4283)	5
Al	274	(21-505)	68
Ni	141	(74-2781)	8
Ba	21	(10-73)	27
Sr	21	(5-67)	78
Li	10	(10-3077)	13
Mn	2.1	(1.0-9.0)	36
B	<LOD	<LOD	0

La presencia de los elementos Ca, K, Mg, Cu, Fe y Zn se esperaba, ya que son elementos esenciales en el cuerpo humano, los resultados obtenidos para elementos como calcio (Ca), potasio (K) y magnesio (Mg) con medianas de 61738 ng/mL, 20451 ng/mL y 14344 ng/mL respectivamente, indican que son los metales más abundantes junto con el sodio (Na), elemento que no se cuantificó por saturación del equipo. Tomando como punto de referencia a la solución Gamble (solución artificial de líquido pleural) para evaluar un aumento o disminución de estos elementos en comparación con lo que se parece a una disolución de líquido pleural de una persona “sana”; al restar a las muestras el valor correspondiente al blanco de solución Gamble, el calcio pasa de una mediana de 61738 ng/mL a 39482 ng/mL; es decir, las condiciones patológicas de las muestras de líquido pleural tienen un aumento de 3948 ng/mL de calcio respecto a las condiciones estándar. Mientras que el potasio y magnesio presentan una disminución en la concentración respecto al blanco de solución Gamble, magnesio (Mg) con una mediana con 4079 ng/mL por abajo a la concentración en

solución Gamble y la concentración de potasio (K) disminuye aproximadamente 7609 ng/mL respecto a la solución Gamble.

Con respecto a la recuperación del silicio (Si) al presentar un porcentaje de 190, éste se asocia a una interferencia de matriz en las lecturas, este elemento se encontró con una mediana de 293 ng/mL en 5 muestras de 133, lo que representa menos del 5%, es decir, no es un elemento que se encuentre constantemente suspendido en el aire, la concentración de silicio en el líquido pleural de estos pacientes se asocia a condiciones específicas de trabajo o lugar de vivienda de cada uno.

El níquel (Ni) con una mediana de 141 ng/mL fue cuantificado en 8 de 133 muestras, lo que equivale al 6 % de las muestras; al igual que el silicio y el litio (Li) con una mediana de 10.9 ng/mL que fue detectado en 13 muestras, por lo que se plantea que estos pacientes presentan condiciones de exposición específicas por la zona de trabajo o vivienda de los pacientes.

El bario (Ba) fue detectado en 27 muestras con una mediana de 21 ng/mL, pero presentó una pobre linealidad, se podría optimizar su lectura cambiando las condiciones del equipo para identificar su presencia en líquido pleural de forma cuantitativa, aunque hasta ahora no se ha reportado que presente un riesgo para la salud las concentraciones ambientales en las que se encuentra, la baritosis sólo se presenta en condiciones de alta exposición industrial.

El estroncio (Sr) con una mediana de 21 ng/mL fue detectado en 78 muestras, aunque las concentraciones son bajas y no existe un límite reportado de este elemento ambiental, se sabe que el estroncio puede entrar a la corriente sanguínea relativamente rápido y permanecer en el pulmón durante mucho tiempo, la toxicidad depende de su especiación.

12.5.2 Concentración de elementos cuantificados en ICP-MS.

En la Tabla 13, se presentan los elementos en menor concentración, cuantificados en ICP-MS en muestras de líquido pleural.

Tabla 13. Elementos cuantificados por ICP-MS.

Elemento	Mediana de concentración de elementos en líquido pleural (ng/mL)	Intervalo de concentraciones de elementos en líquido pleural (ng/mL)	Número de muestras en las que se detectó el elemento
Ti	24.87	7.05-81.05	128
Cr	22.79	4.40-50.58	128
Pt	17.34	0.15-23.45	3
Mo	0.43	0.05-5.10	128
V	5.10	3.44-13.03	128
Se	4.51	0.65-12.46	99
As	2.82	1.85-6.62	128
Pb	2.30	0.08-17.06	99
Ag	0.36	0.13-1.14	63
Sn	0.23	0.03-6.56	85
Co	0.18	0.02-1.65	80
Sb	0.14	0.02-4.12	103
Hg	0.13	0.06-0.38	32
Pd	0.07	0.01-0.33	65
Cd	0.04	0.01-0.24	19
Tl	<LOD	< LOD	0
Be	<LOD	< LOD	0
Rh	<LOD	< LOD	0

El selenio (Se) con una mediana de 4.51 ng/mL, es un elemento traza esencial, el selenio urinario regularmente es menor de 100 ng/mL, la toxicidad por selenio ocurre cuando la ingestión excede la capacidad excretora (Klaassen, 2001), tomando estos datos como referencia, el Se no se encuentra en concentraciones tóxicas. El titanio (Ti) con una mediana de 24.87 ng/mL, el antimonio (Sb) con una mediana de 0.14 ng/mL, el mercurio (Hg) con una mediana de 0.13 ng/mL y el cadmio (Cd) con una mediana de 0.04 ng/mL son elementos de origen principalmente antropogénico; del tráfico, el cigarro y la industrial, indicando una acumulación en el líquido pleural de pacientes con patologías de pulmón.

Elementos como el platino (Pt), el paladio (Pd), el estaño (Sn) y la plata (Ag) presentaron un coeficiente de determinación bajo para lo establecido en el método, por lo que de forma cualitativa se observa que todos estos elementos fueron detectados en las muestras en partes por billón, siendo el platino y el paladio elementos comúnmente utilizados como catalizadores.

En cuanto a elementos como talio (Tl), berilio (Be), rodio (Rh) y boro (B) son elementos que no han sido detectados por encima del límite de detección de los espectrómetros con la metodología ocupada, con valores de LOD de 0.02 ng/mL, 0.01 ng/mL, 0.05 ng/mL y 14.73 ng/mL respectivamente.

Respecto a los elementos que han reportados en líquido pleural, la tabla 14 presenta la mediana de los datos obtenidos por ICP-OES respecto a la mediana de los reportados internacionalmente.

Tabla 14. Tabla comparativa de los elementos cuantificados en líquido pleural por ICP-OES con los niveles reportados de pacientes con patologías variadas.

Elemento	Mediana de concentración de elementos en líquido pleural (ng/mL)	Intervalo de concentraciones reportadas de elementos en líquido pleural (ng/mL)^{1,2,3,4}
Fe	3290.4 (42.0-5103.0)	2360.0 (41.0-5040.0)
Cu	589.71 (80.0-1473.9)	629.5 (241.3-1479.0)
Zn	404.7 (42.0-1043.8)	326.0 (100.2-994.0)
Al	274.9 (21.0-505.6)	139.0 (11.0-582.0)
Mn	2.1 (1.0-9.0)	1.70 (0.06-9.05)

¹ Lee et al, 2017; ² Bai et al, 2019; ³ Ho et al., 2019; ⁴ Bai et al, 2021.

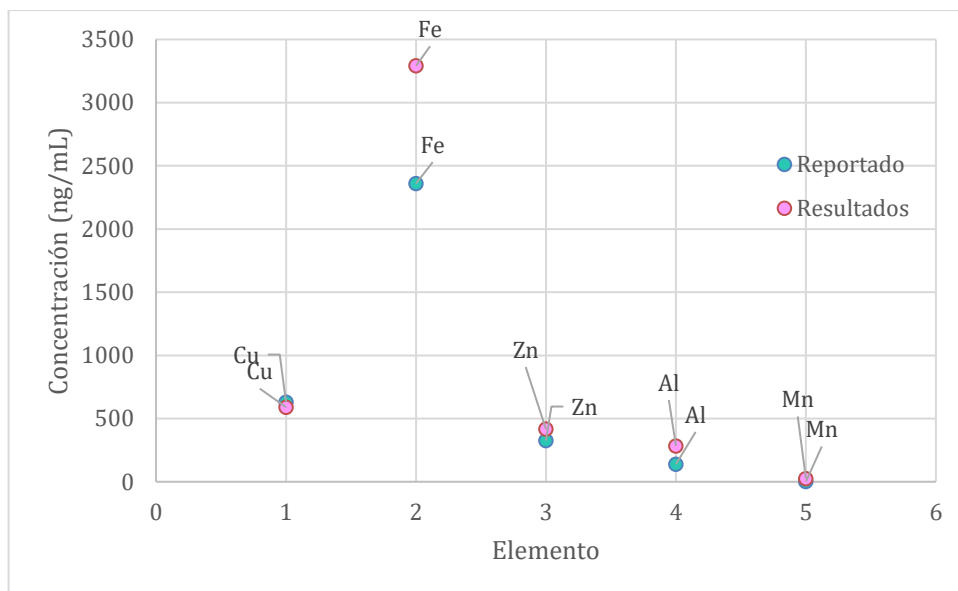


Figura 22. Gráfico comparativo de la mediana de las concentraciones reportadas respecto a la mediana de las concentraciones obtenidas de elementos minoritarios presentes en líquido pleural.

Tal como se muestra en el gráfico de la figura 22, las medianas de las concentraciones obtenidas en comparación con las reportadas son similares en los intervalos, ya que se encuentran en los mismos niveles de concentración con excepción del manganeso que se encuentra más alto.

El cobre, el hierro y el zinc presentes en el líquido pleural con una mediana de 589.71 ng/mL, 3290.4 ng/mL y 404.70 ng/mL respectivamente, se conocen como oligoelementos debido a que forman parte de algunas enzimas y proteínas en cierta concentración, cumplen funciones esenciales en los seres vivos; las deficiencias, así como los excesos, pueden ser perjudiciales para la salud. Se conoce que, en derrame pleural maligno, existe una tendencia a tener niveles de ferritina mayores que 805 ng/mL, siendo la ferritina una metaloproteína con núcleo de hierro (Fe), se observa una relación con los resultados; encontrándose la mediana de la concentración de hierro (Fe) en 3290.4 ng/mL que coincide con el dato de que la mayoría de los pacientes de las muestras analizadas, son pacientes del INER con cáncer. Por otro lado, se sabe que al hierro se le asocia con el tráfico vehicular, la corteza terrestre y la re suspensión de suelos (Heal et al, 2005), el cobre es un elemento abundante en PM_{2.5} (Xin et al. 2012) y está presente en fuentes contaminantes como el tráfico vehicular, la metalurgia del cobre, la combustión, el uso de frenos, entre otros factores ambientales; mientras que, al zinc (Zn) se le asocia el tráfico vehicular, los procesos de acero (Feng et al, 2009), el desgaste de neumáticos (Heal et al, 2005), entre otros. Además, de acuerdo con Bai et al, 2021, existe una relación en donde niveles más altos de Zn relacionado con PM_{2.5} en el derrame pleural, aumenta el riesgo

de cáncer de pulmón, relación que podría usarse para predecir la aparición de cáncer de pulmón ambiental y derrame pleural maligno.

De igual forma al aluminio con una mediana de 274.9 ng/mL, detectado en 68 muestras y el manganeso con una mediana de 2.1 ng/mL, detectado en 36 muestras, se les asocia con el tráfico vehicular, la corteza terrestre y la re-suspensión de suelo. La mayor parte del aluminio en el aire se encuentra suspendido en forma de pequeñas partículas de polvo por lo que la Administración de Salud y Seguridad Ocupacional (OSHA) ha establecido un límite legal de exposición de 15 mg/m³ (polvo total) y de 5 mg/m³ (fracción respirable) para polvos de aluminio como promedios durante una jornada diaria de 8 horas ya que es un metal acumulable, en distintas partes del cuerpo. Mientras que la toxicidad por manganeso puede causar múltiples problemas neurológicos y es un reconocido peligro sanitario para las personas que inhalan polvo de manganeso, como soldadores y fundidores (Higdon, 2012).

De los elementos que han reportados en líquido pleural, la tabla 15 presenta la mediana de los datos obtenidos por ICP-MS respecto a la mediana de los reportados internacionalmente.

Tabla 15. Tabla comparativa de los elementos cuantificados en líquido pleural por ICP-MS con los niveles reportados de pacientes con patologías variadas.

Elemento	Mediana de concentración de elementos en Líquido pleural (ng/mL)	Mediana e intervalo de concentraciones reportadas de elementos en Líquido pleural (ng/mL)^{1,2,3,4}
Cr	22.79 (4.40-50.58)	2.15 (0.04-13.38)
Mo	0.43 (0.05-5.10)	1.79 (0.13-4.70)
V	5.10 (3.44-13.03)	0.48 (0.02-1.06)
As	2.82 (1.85-6.62)	3.4 (0.31-18.02)
Pb	2.30 (0.08-17.06)	2.4 (0.07-7.55)
Ag	0.36 (0.13-1.14)	0.95 (0.02-2.11)
Sn	0.23 (0.03-6.56)	2.00 (0.02-5.34)
Co	0.18 (0.02-1.65)	0.56 (0.01-1.74)

¹ Lee et al, 2017; ² Bai et al, 2019; ³ Ho et al., 2019; ⁴ Bai et al, 2021.

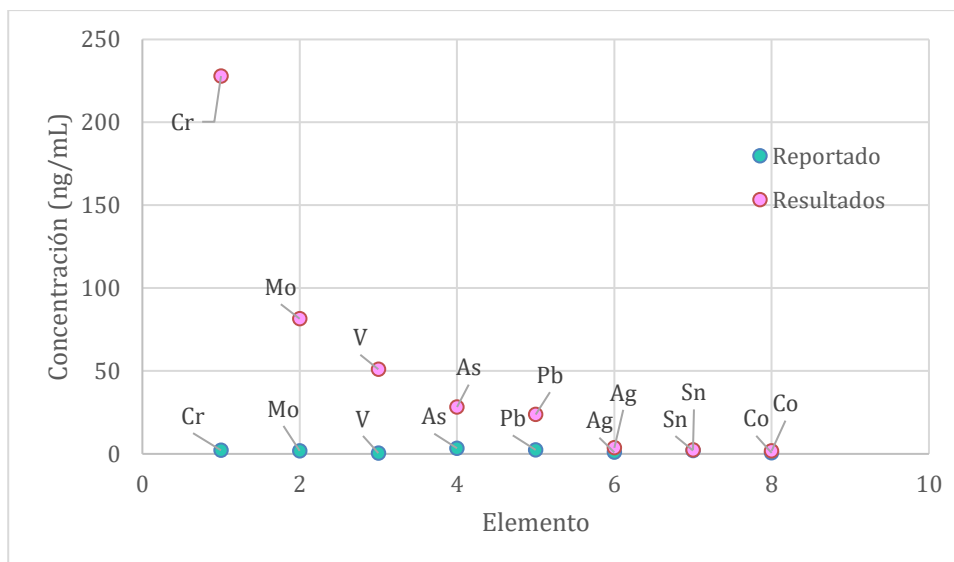


Figura 23. Gráfico comparativo de la mediana de las concentraciones reportadas respecto a la mediana de las concentraciones obtenidas de elementos traza y ultra trazas presentes en líquido pleural.

Los resultados obtenidos de los elementos cuantificados presentaron niveles similares a los reportados con excepción del cromo (Cr) y el vanadio (V), dónde se obtuvieron valores más altos dándonos una referencia de los elementos presentes en derrame pleural de pacientes atendidos en el INER que residen en la Ciudad de México.

La diferencia más significativa es en el cromo (Cr) con un nivel de concentración de aproximadamente 10 veces mayor (4.40-50.58) ng/mL, el cromo es un elemento considerado como cancerígeno del grupo I por la Agencia internacional de investigación de cáncer (IARC), generalmente la concentración de cromo (Cr) va de 0 a 30 ng/m³ en el aire de áreas urbanas; sin embargo, al fumar en espacios cerrados, la concentración puede ser de 10 a 400 veces más alta que en el aire libre además de otras fuentes como los procesos pirometalúrgicos, fuente industrial y el tráfico vehicular.

El molibdeno con una mediana de 0.43 ng/mL, en un nivel de concentraciones similar al reportado, es un metal presente en el aire cuya principal fuente es la industria y de procesos del acero; es un elemento que no se considera tóxico en bajas concentraciones, tiene funciones esenciales en el cuerpo humano, pero valdría la pena investigar más en su papel toxicológico y la relación de su concentración con estas patologías.

El vanadio (V) con un rango de (3.44-13.03) ng/mL, aproximadamente 10 veces mayor al reportado, fue detectado en todas las muestras analizadas, su presencia en líquido pleural se asocia principalmente a la combustión de automotores y catalizador (Xu et al., 2013) pero al igual que varios elementos, no existe norma o monitoreo oficial de este metal en el aire de

México, que podría afectar la salud en metrópolis contaminadas como la CDMX (Rodríguez, 2010).

El arsénico (As) con una mediana de 2.82 ng/mL es otro de los elementos que se asocian al cáncer de pulmón y provienen entre otras fuentes del consumo de tabaco al igual que el plomo (Pb) con una mediana de 2.30 ng/mL, el níquel (Ni), Cadmio (Cd) y selenio (Se), un estudio epidemiológico, entre la concentración de estos elementos respecto a las características de los pacientes considerados para este estudio, podría proporcionar mayores datos acerca de las fuentes y exposición de algunos contaminantes hacia la población de la CDMX.

El cobalto (Co) con una mediana de 0.18 ng/mL es un oligoelemento que en altas concentraciones se asocia al asma y la fibrosis pulmonar.

La plata (Ag) con una mediana de 0.36 ng/mL y el estaño (Sn) con una mediana de 0.23 ng/mL, se encuentran en rangos similares a los reportados; sin embargo, son elementos que no obtuvieron valores aceptables en los parámetros de validación evaluados en el método, por lo que valdría la pena optimizar el método para cuantificar con precisión y exactitud estos elementos en líquido pleural.

En general los resultados obtenidos sugieren una alta exposición a elementos de origen antropogénico como As, Pb, Ni, Cd, Se, Co, Ag, Sb, Cr, Mo, Ti, Sr, Fe, Zn, Al, Ni y Cu en la ciudad de México. Mientras que sugiere una disminución de Mg y K en el líquido pleural cuando se presentan patologías de pulmón.

13. CONCLUSIONES

Sobre la verificación del método.

Se desarrolló e implementó una metodología de análisis para la cuantificación de elementos traza en líquido pleural por medio de ICP-OES e ICP-MS con previa digestión de muestras en horno de microondas. Se evaluaron parámetros de validación de intervalo de trabajo, LOD, LOQ, sensibilidad y precisión.

- Los intervalos de trabajo obtenidos presentan una relación lineal con R^2 mayor a 0.998 para la mayoría de los analitos, por lo tanto, estos intervalos son linealmente aceptables con excepción del estaño (Sn) y boro (B).

- Los límites de detección se encuentran en un rango de (0.01-0.64) ng/mL para los elementos cuantificados en ICP-MS mientras que para los cuantificados en ICP-OES presentan LOD en un rango de (0.27-28.95) ng/mL.

- La sensibilidad de la técnica para cuantificar los elementos en líquido pleural es alta, está asociada a los valores de pendiente que se obtuvieron de las curvas de calibración.
- La precisión del método se evaluó utilizando los %RSD de cada muestra, para cada elemento y todos los porcentajes obtenidos tienen un valor <10% lo que significa que las variaciones entre las mediciones de una misma muestra no varían más allá del 10%.
- La exactitud evaluada con el recobro se obtuvo de manera satisfactoria para la mayoría de los elementos con excepción de Sn, Ag, Si y Mo que se encontraron por debajo del 80 % o por arriba del 120 % y de Pd, Pt, Rh, Hg, y Ba que se detectaron con % de recuperación muy altos por lo que no se tomaron en cuenta de forma cuantitativa por falta de precisión y exactitud.

A pesar de que falló en el parámetro de recobro y linealidad para algunos elementos, la metodología desarrollada en este trabajo presenta parámetros de validación satisfactorios para Cd, Sb, Co, Pb, Cr, As, Mo, Se, V, Ti, K, Li, Sr, Ca, Mg, Fe, Zn, Al, Ni y Cu. En el caso de los elementos Be, Pd, Pt, Tl, Sn, Rh, Hg, Ag, Ba, B y Si la validación no es satisfactoria y sólo se evalúa su detección de forma cualitativa.

Sobre las muestras analizadas.

Los resultados obtenidos muestran que el líquido pleural contiene elementos como Cd, Sb, Co, Pb, Cr, As, Mo, Se, V, Ti, K, Li, Sr, Ca, Mg, Fe, Zn, Al, Ni y Cu; elementos que respiramos, llegan a la zona alveolar hasta terminar almacenándose en el líquido pleural.

No existe una regulación de cantidades permitidas de ciertos elementos en el aire o como tal de la presencia de éstos en el líquido pleural, la difusión de estos resultados pueden ser el inicio de algunos estudios, para conocer la relación entre la exposición a partículas atmosféricas en la población a partir de las partículas ambientales PM_{2.5}.

Para los elementos Be, Pd, Pt, Tl, Sn, Rh, Hg, Ag, Ba, B y Si los resultados no fueron satisfactorios debido a que la validación falló en el recobro o linealidad; sin embargo, los resultados obtenidos pueden ser usados para caracterizar la composición elemental de los elementos traza presentes en derrame pleural de pacientes con padecimientos pulmonares.

Los rangos de concentraciones obtenidos en este trabajo se encuentran en rangos similares a los reportados en otros trabajos internacionales a excepción de manganeso, cromo y vanadio que se encuentran rangos mayores; es normal que no coincidan o se aproximen ya que se trata del estudio de distintas poblaciones en diferentes zonas geográficas, esto funciona como punto de comparación, ya que hasta la fecha no se han

reportado trabajos similares a nivel nacional, es importante empezar a tener bancos de información sobre la concentración de elementos potencialmente tóxicos (EPT) en líquido pleural para así desarrollar normas para el control de las emisiones de contaminantes y así disminuir el grado de exposición.

14. Aportaciones

El presente trabajo fue realizado de acuerdo con el Proyecto “BIOACCESIBILIDAD DE METALES-METALOIDES DE LAS PM2.5 EN LÍQUIDO PLEURAL DE PACIENTES CON CÁNCER PULMONAR DE LA CIUDAD DE MÉXICO” con financiamiento CONACyT- 840342.

15. Recomendaciones:

Debido a que los porcentajes de recuperación para los elementos Be, Pd, Pt, Tl, Sn, Rh, Hg, Ag, Ba, B y Si fueron menores al 80% o mayores al 120%; se sugiere probar con otras condiciones de digestión para disminuir los efectos de matriz sobre estos elementos, se sugiere realizar la prueba con H₂O₂ al 50:50 con HNO₃ para evaluar efectos de matriz.

Para cuantificar el sodio (Na) por ICP-OES sin saturar el equipo; tomando como referencia la preparación de la disolución artificial de líquido pleural, la disolución Gamble de Julien et al. 2011, la concentración aproximada de Na en líquido pleural es de 9000 mg/L, por lo que se recomienda realizar una dilución 1:1000 para su análisis.

Se sugiere acoplar ICP-OES o ICP-MS a un generador de hidruros para poder analizar de forma más específica a elementos como mercurio, arsénico, berilio.

16. BIBLIOGRAFÍA

IARC-INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. (s. f.).

<https://www.iarc.who.int/>

- Bai, Kuan Jen et al. 2019. "Alterations by Air Pollution in Inflammation and Metals in Pleural Effusion of Pneumonia Patients." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 16(5): 1–10.
- Bai, Kuan Jen et al, 2021. "Exposure to PM2.5 is associated with malignant pleural effusion in lung cancer patients." *International Journal of Environmental Research and Public Health*: 1–6.
- Baeza Hernández, M.G. (2005). Validación de un método de digestión ácida en horno de microondas para la cuantificación de selenio por absorción atómica en materia prima y fluido ruminal. (Tesis de Licenciatura, UNAM). Recuperado de: <http://132.248.9.195/pd2007/0616918/Index.htm>
- Boisa, Ndokiari et al. 2014. "Development and Application of an Inhalation Bioaccessibility Method (IBM) for Lead in the PM10 Size Fraction of Soil." *Environment International* 70: 132–42.
- Canales, J, E. (2018). Evaluación de As, Cd, Hg y Pb en placenta y cordón umbilical por medio de espectrometría de masas con plasma por acoplamiento inductivo (ICP-MS). Tesis de licenciatura. UNAM.
- Charles B. Boss and Kenneth J. Fredeen, Concepts, Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry; 2nd ed. Perkin Elmer Corporation, USA, 1997
- Colombo, C., Monhemius, J., Plant, J. 2008. "Platinum, palladium and rhodium release from vehicle exhaust catalysts and road dust exposed to simulated lung fluids." *Journal of ecotoxicology and environmental safety*. 1-19.
- EuroLab España. P.P. Morillas y colaboradores. Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados (1ª ed. 2016). Disponible en www.eurachem.org
- Figueroa, L. (2018). Caracterización de escorias de aluminio para su recuperación a través de espectroscopia de emisión atómica con plasma por acoplamiento inductivo (ICP-OES) y fluorescencia de rayos X. Tesis de licenciatura. UNAM.
- García, P., Hurlé, J. 2019. Anatomía humana. Capítulo 9. 2da Edición. Editorial médica Panamericana.
- Guillermo, Luis, and Toro Rend. 2009. "Derrame Pleural." (88): 11–26.
- Goullé, J et al. 2005. "Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair. *Journal forensic science international*. 39-44.
- Ho, S. et al. 2019. Chronic obstructive pulmonary disease patients have a higher risk of occurrence of pneumonia by air pollution. *Journal science of the total environment*. 524-529.
- Huang, F. et al. 2017. "Relationship between exposure to PM2.5 and lung cancer incidence and mortality: A meta-analysis. *Impact journal*. Vol 8 (No. 26). pp: 43322-43331.
- Jacobo, D, I. (2018). 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 plasma (ICP-MS) y espectroscopia de fluorescencia de rayos X. Tesis de licenciatura. UNAM.
- Jiménez Heinert, M., Grijalva Endara, A., & Ponce Solórzano, H. (2020). Plasma acoplado inductivamente en espectroscopia de emisión óptica (ICP-OES). *RECIMUNDO*, 4(4), 4-12. doi:10.26820/recimundo/4.(4).octubre.2020.4-12
- Juanchi Jimeno, Tania. 2021. Estudio de la zona afectada térmicamente en soldaduras de acero inoxidable AISI 304 usando el proceso GTAW y el efecto en sus propiedades mecánicas. Tesis de licenciatura. UNAM.
- Kastury, Farzana et al. 2018. “An Inhalation-Ingestion Bioaccessibility Assay (IIBA) for the Assessment of Exposure to Metal(Loid)s in PM10.” *Science of the Total Environment* 631–632: 92–104.
- Kirkham, P.A., Barnes, P.J., 2013. Oxidative stress in COPD. *Chest* 144, 266–273
- Klaassen, C., Watkins, J. 2001. Manual de toxicología. Mc Graw Hill. 5ta edición. 659-723.
- Lee, K. et al. 2017. Trace elements in pleural effusion correlates with smokers with lung cancer. Springer.
- Pelfrêne, Aurélie, Mark R. Cave, Joanna Wragg, and Francis Douay. 2017. “In Vitro Investigations of Human Bioaccessibility from Reference Materials Using Simulated Lung Fluids.” *International Journal of Environmental Research and Public Health* 14(2).
- Pineda Silva, Salomón. 2016. Evaluación de elementos presentes en filtros ambientales de la Zona Metropolitana del Valle de Toluca usando espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente. Tesis de licenciatura. UNAM.
- Taylor, H. E. (2001). *Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry. Practices and Techniques*. (1st ed.). San Diego: Academic Press.
- Thomas, R. (2001). *A Beginner’s Guide to ICP-MS. Part II: The Sample-Introduction System*. *Spectroscopy*, 16(5), 56–60
- Ortega Camacho, Daniela sustentante Verificación y aplicación de una técnica analítica para la determinación de elementos mayores por ICP-OES. Caracterización y clasificación de agua subterránea del Anillo de Cenotes, Yucatán, México / 2011
- Villagrana, Erika. (2006). Desarrollo de Técnicas de análisis químicos de cementos usando emisión atómica con plasma ICP OES. Universidad Nacional Autónoma de México. Licenciatura.
- Xing, Y. 2015. The impact of PM2.5 on the human respiratory system. *Journal of thoracic disease*.
- Zereini, F. et al. 2012. In vitro investigations of platinum, palladium, and rhodium mobility in urban airborne particulate matter (PM10, PM2.5, and PM1) Using simulated lung fluids. American chemical society.

ANEXO 1. Coeficientes de correlación y pendientes para los elementos cuantificados.

Tabla 16. Coeficientes de correlación y pendientes para los elementos cuantificados en ICP-MS.

Elemento	R²	Pendiente	Elemento	R²	Pendiente
Ti	0.9998	2310.9	As	0.9986	3519.7
Cr	0.9991	22247.0	Mo	0.9996	7663.7
Se	0.9987	616.2	Sb	0.9992	12764.0
Rh	0.9999	238237.0	Cd	0.9996	3226.2
Pd	0.9992	2817.3	Sn	0.9894	9139.6
Ag	0.9985	9345.4	Pt	0.9990	6813.9
Pb	0.9987	14979.0	Hg	0.9991	2821.1
Be	0.9997	3884.1	Tl	0.9996	19378.0
V	0.9998	27892.0	Co	0.9992	17788.0

Tabla 17. Coeficientes de correlación y pendientes para los elementos cuantificados en ICP-OES.

Elemento	R²	Pendiente	Elemento	R²	Pendiente
Ca	0.9996	39187.00	Si	0.9988	36285.00
Na	SATURADO	SATURADO	Al	0.9990	34316.00
Mg	0.9999	50278.51	Mn	0.9992	330515.00
K	0.9980	2000000.00	Ba	0.9995	93090.00
Li	0.9990	8000000.00	Fe	0.9996	33922.03
Ni	0.9999	6510.32	Cu	0.9997	5466.52
Sr	0.9995	6000000	B	0.9935	5101.6
Zn	0.9990	17685.62	-		

ANEXO 2. Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) del método para cuantificación de elementos en líquido pleural.

El cálculo del límite de detección y cuantificación instrumental, se realizó a partir de la lectura de 10 disoluciones blanco (Agua inyectable PISA); mientras que, el cálculo del límite de detección y cuantificación del método se obtuvo a partir de la lectura de 10 disoluciones blanco del método: 1 mL de agua inyectable PISA digerida con los reactivos de digestión y condiciones de digestión aplicadas en el método; con el valor de la desviación estándar de estas lecturas se aplicó la ecuación 1 para el cálculo del límite de detección (LOD) y la ecuación 2 para el cálculo del límite de cuantificación (LOQ) que se presentan en las siguientes tablas.

Tabla 18. Límite de detección y cuantificación instrumental de los elementos cuantificados en ICP-MS e ICP-OES.

ICP-MS			ICP-OES		
Elemento	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Elemento	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Be	0.01	0.04	K	0.27	0.89
Pd	0.01	0.04	Li	0.47	1.58
Pt	0.01	0.05	Mn	0.47	1.55
Cd	0.02	0.06	Sr	0.53	1.77
Tl	0.02	0.06	Ca	0.63	2.09
Sb	0.02	0.06	Mg	0.78	2.60
Co	0.02	0.06	Ba	0.99	3.32
Sn	0.03	0.10	Fe	1.43	4.78
Rh	0.05	0.17	Zn	1.56	5.22
Hg	0.06	0.19	Al	6.91	23.04
Pb	0.07	0.24	Ni	7.19	23.96
Ag	0.12	0.41	Cu	7.33	24.45
Cr	0.16	0.53	B	14.73	49.09
As	0.38	1.27	Si	28.95	96.51
Mo	0.38	1.27			
Se	0.59	1.97			
V	0.64	2.12			

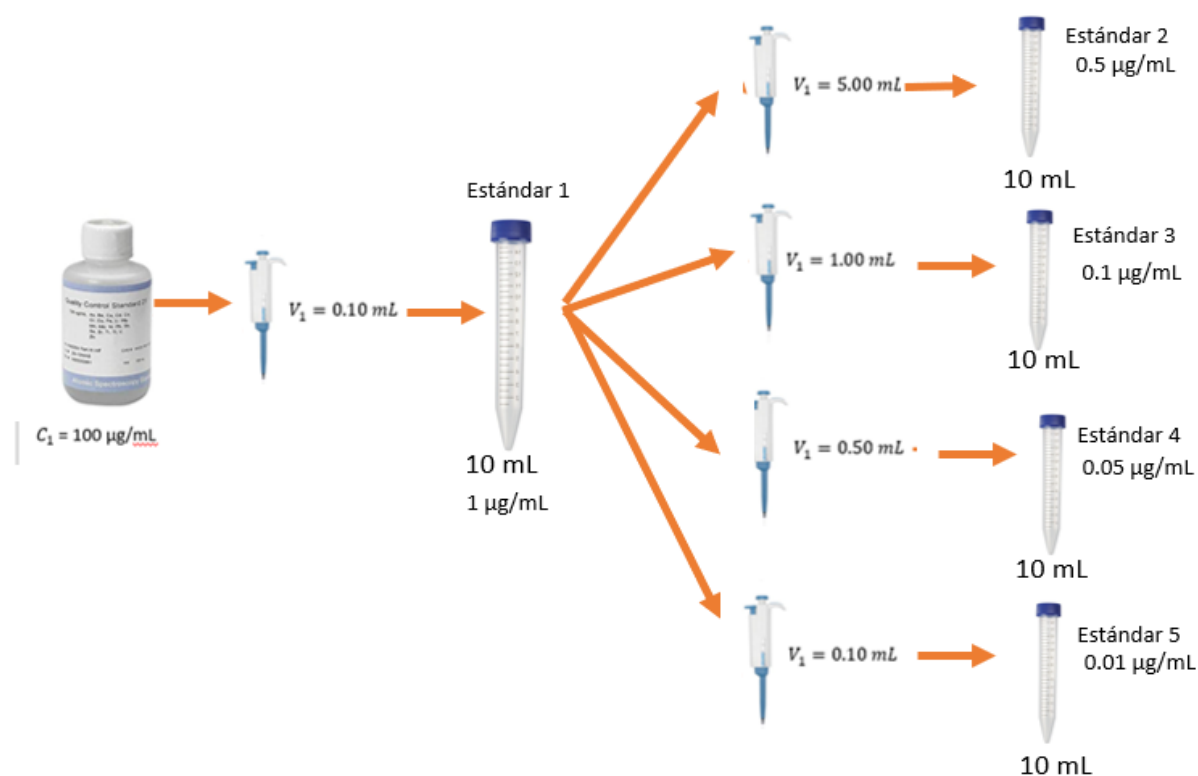
Ti	1.08	3.59			
-----------	------	------	--	--	--

Tabla 19. Límite de detección y cuantificación del método de los elementos cuantificados en ICP-MS e ICP-OES.

ICP-MS			ICP-OES		
Elemento	LOD (ng/mL)	LOQ M(ng/mL)	Elemento	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Be	0.10	0.40	K	2.70	8.90
Pd	0.10	0.40	Li	4.70	15.80
Pt	0.14	0.47	Mn	4.70	15.50
Cd	0.17	0.57	Sr	5.30	17.70
Tl	0.18	0.59	Ca	6.26	20.87
Sb	0.18	0.60	Mg	7.80	26.00
Co	0.19	0.64	Ba	9.90	33.20
Sn	0.30	0.99	Fe	14.30	47.80
Rh	0.50	1.70	Zn	15.60	52.20
Hg	0.57	1.89	Al	69.10	230.40
Pb	0.71	2.35	Ni	71.90	239.60
Ag	1.23	4.11	Cu	73.30	244.50
Cr	1.58	5.27	B	147.30	490.90
As	3.81	12.70	Si	289.50	965.10
Mo	3.81	12.70			
Se	5.90	19.70			
V	6.36	21.20			
Ti	10.80	35.90			

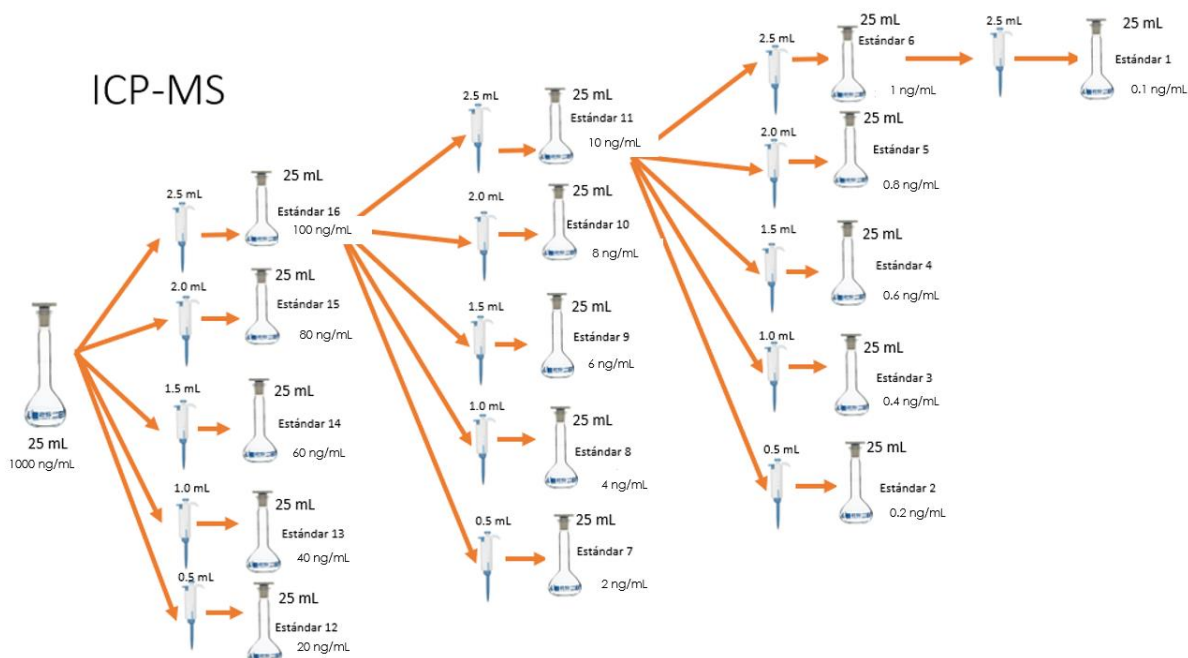
ANEXO 3. Diagramas de la preparación de las curvas de calibración.

Figura 23. Esquema de la preparación de la curva de calibración para elementos cuantificados en ICP-OES.



La curva de calibración consiste en 5 disoluciones estándar de concentraciones $0.01 \mu\text{g/mL}$, $0.05 \mu\text{g/mL}$, $0.1 \mu\text{g/mL}$, $0.5 \mu\text{g/mL}$ y $1 \mu\text{g/mL}$. La solución de $1 \mu\text{g/mL}$ se preparó a partir de una alícuota de 0.1 mL de las disoluciones estándar s7 y s21 (ver tabla 6), a partir de esta disolución se prepararon los demás estándares.

Figura 24. Esquema de la preparación de la curva de calibración para elementos cuantificados en ICP-MS.



La curva de calibración consiste en 16 disoluciones estándar de concentraciones (0.1-100) ng/mL. Para preparar los estándares de la curva, primero se preparó una disolución con concentración de 1000 ng/mL a partir de las disoluciones patrón multi-elementales (Tabla 10).

A partir de la disolución de concentración de 1000 ng/mL, se tomaron alícuotas de 0.5 mL, 1.0 mL, 1.5 mL, 2.0 mL y 2.5 mL y se añadieron a matraces volumétricos de 25.0 mL para obtener las disoluciones estándar de concentraciones 20 ng/mL, 40 ng/mL, 60 ng/mL, 80 ng/mL y 100 ng/mL.

Ahora partiendo de la disolución de concentración de 100 ng/mL, se tomaron alícuotas de 0.5 mL, 1.0 mL, 1.5 mL, 2.0 mL y 2.5 mL y se añadieron a matraces volumétricos de 25.0 mL para obtener las disoluciones estándar de concentraciones 2 ng/mL, 4 ng/mL, 6 ng/mL, 8 ng/mL y 10 ng/mL.

Repitiendo el proceso de la disolución de concentración de 10 ng/mL, se tomaron alícuotas de 0.5 mL, 1.0 mL, 1.5 mL, 2.0 mL y 2.5 mL y se añadieron a matraces volumétricos de 25.0 mL para obtener las disoluciones estándar de concentraciones 0.2 ng/mL, 0.4 ng/mL, 0.6

ng/mL, 0.8 ng/mL y 1.0 ng/mL. Finalmente, de la disolución de 1.0 ng/mL se tomó alícuota de 2.5 mL para preparar disolución de 25.0 mL con concentración de 0.1 ng/mL.