



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Centro de Investigación en Ciencia Aplicada
y Tecnología Avanzada, Unidad Altamira



Análisis de metales pesados en el ostión *Crassostrea virginica* mediante la técnica de Espectroscopia de Plasma Inducido por Láser (LIBS)

T E S I S

Para obtener el grado de

Maestría en Tecnología Avanzada

Presenta:

Ing. Xochitl Patricia Urrutia Meza

Directores de tesis

Dr. Fabio Felipe Chalé Lara

Dr. Rogelio Ortega Izaguirre

ALTAMIRA, TAMAULIPAS

JUNIO, 2019



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

México, D.F. a 08 de Mayo de 2019

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICATA-ALT en su sesión ROCP No. 005 celebrada el día 22 del mes de MAYO conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

URRUTIA

MEZA

XOCHITL PATRICIA

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre (s)

Con registro:

A	1	7	0	4	2	0
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de: Maestría en Tecnología Avanzada

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:
“Análisis de metales pesados en el ostión *Crassostrea virginica* mediante la técnica de Espectroscopia de Plasma Inducido por Láser (LIBS)”

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:
Aplicar la Técnica LIBS en la determinación de metales pesados en el ostión *Crassostrea virginica*

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:
DR. FABIO FELIPE CHALÉ LARA Y DR. ROGELIO ORTEGA IZAGUIRRE

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en:
Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada – IPN, Unidad Altamira
que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis



DR. FABIO FELIPE CHALÉ LARA

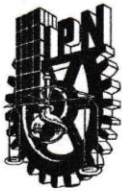
Aspirante


XOCHITL PATRICIA URRUTIA MEZA


DR. ROGELIO ORTEGA IZAGUIRRE

Presidente del Colegio


DR. EDGAR ONOFRE BUSTAMANTE
CENTRO DE INVESTIGACION EN CIENCIA
Y TECNOLOGIA AVANZADA
DEL I.P.N.
UNIDAD ALTAMIRA



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Altamira, Tamaulipas siendo las 10:00 horas del día 10 del mes de Junio del 2019 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del IPN - CICATA, UA para examinar la tesis titulada:

Análisis de metales pesados en el ostión *Crassostrea virginica* mediante la técnica de Espectroscopia de Plasma inducido por Láser (LIBS)

Presentada por el alumno:

Urrutia	Meza	Xochitl Patricia						
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)						
		Con registro:						
		A	1	7	0	4	2	0

aspirante de:

MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA AVANZADA

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Fabio Felipe Chalé Lara

Dr. Rogelio Ortega Izaguirre

Dr. Edgar Onofre Bustamante

Dr. Felipe Caballero Briones

Dr. Eugenio Rodríguez González

Dr. Hernán Peraza Vázquez

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES



Dr. Edgar Onofre Bustamante

CENTRO DE INVESTIGACION EN CIENCIA
APLICADA Y TECNOLOGIA AVANZADA
DEL I.P.N.
UNIDAD ALTAMIRA



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 21 del mes Junio del año 2019, el (la) que suscribe Xochitl Patricia Urrutia Meza alumno (a) del Programa de Maestría en Tecnología Avanzada con número de registro A170420, adscrito IPN-CICATA Unidad Altamira a, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Fabio Felipe Chalé Lara y Dr. Rogelio Ortega Izaguirre, y cede los derechos del trabajo intitulado Análisis de metales pesados en el ostión *Crassostrea virginica* mediante la técnica de Espectroscopia de Plasma inducido por Láser (LIBS), al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección xochitlurrutia@hotmail.com, fchale@ipn.mx y rortegai@ipn.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Xochitl Patricia Urrutia Meza

Dedicatoria

A mis padres Guadalupe y Antonio, por su amor y fortaleza.

A mi esposo Francisco Javier, por su amor y apoyo incondicional.

*A mis tres pequeños: Javier Antonio, Juan Francisco
y Scarlet Patricia, por su gran amor y comprensión.*

A todos ellos por acompañarme en esta bella aventura en la ciencia.

Agradecimientos

Al Instituto Politécnico Nacional por la oportunidad de pertenecer a la gran familia politécnica.

Al Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada Unidad Altamira, por la oportunidad de ser parte de un prestigioso centro educativo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado para la realización del presente proyecto.

Al Sistema de Beca de Estímulo Institucional de Formación de Investigadores (BEIFI) por el apoyo económico proporcionado para el desarrollo del presente Proyecto.

Al Laboratorio de Análisis y Monitoreo Ambiental del Centro Interdisciplinario de Investigaciones y Estudios sobre Medio Ambiente y Desarrollo CIIEMAD – IPN, por el apoyo proporcionado al presente Proyecto.

A los profesores y personal administrativo por su apoyo en la realización del Proyecto.

A la Dra. Teresa Flores Reyes por la oportunidad de colaborar con ella y por las aportaciones al presente proyecto.

A los integrantes de mi comité tutorial Dr. Edgar Onofre Bustamante, Dr. Hernán Peraza Vázquez y Dr. Felipe Caballero Briones, por su tiempo, aportaciones y consejos que fortalecieron mi proyecto.

Al Dr. Eugenio Rodríguez González por compartir su experiencia y asesoría en el presente proyecto, y por permitirme el acceso y utilización del laboratorio de óptica.

Al Dr. Fabio Felipe Chalé Lara quién aportó su experiencia y asesoría para la realización del proyecto, así también por los consejos y acertivas palabras que siempre tuvo hacia mi persona.

Al Dr. Rogelio Ortega Izaguirre por la asesoría y aportaciones que permitieron el desarrollo del proyecto; y por su tiempo y consejos encaminados al logro de ser una mejor persona.

A la comunidad del ejido Morón, Aldama, Tamaulipas por las facilidades otorgadas para la realización del proyecto.

A toda mi familia, por su amor, comprensión y apoyo durante el desarrollo del proyecto.

A mis amigas de toda la vida: Biancca, Olga, Nadia y Bere, por su compañía en cada etapa de mi vida.

A mis compañeros y amigos del CICATA ALTAMIRA, por la gran amistad y consejos brindados que permitieron una estancia amena y cordial.

RESUMEN

El sistema acuático del sur de Tamaulipas está expuesto a contaminantes tanto de la corteza terrestre como de las actividades antropogénicas. Uno de los organismos de interés económica en la zona es el ostión *Crassostrea virginica*, que es un molusco de alto grado proteico y nutritivo, cuya demanda ha ido en aumento, pero su producción se ha visto afectada debido a la contaminación de los ecosistemas acuáticos. Para evaluar un método alternative en el análisis de la concentración de metales pesados en organismos de *C. virginica*, se utilizó la técnica de Espectroscopia de Plasma Inducida por Láser (LIBS), empleando un láser monopolso Nd: YAG (1064 nm). Para identificar metales pesados en el tejido de *C. virginica*, se realizaron dos muestreos del ostión en la desembocadura del río Tigre, en Aldama, Tamaulipas. El primer muestreo fue realizado en septiembre de 2017 y el segundo en mayo de 2018; en cada muestreo se recolectaron 90 organismos. Los parámetros fisicoquímicos del agua se midieron en ambos muestreos, la temperatura y la salinidad del agua fueron de 31.58 y 30.66°C, y 14.2 y 35.8, respectivamente. El índice de condición fisiológica del ostión fue de 18 en septiembre y 24 en mayo. Para el análisis LIBS del ostión se elaboraron pastillas con el tejido de estos. En los espectros adquiridos se identificaron las líneas atómicas para el Fe, Mg, Al, Cu, Cr, C, Na, Ca, H y O. Finalmente, se realizaron curvas de calibración para diferentes líneas atómicas de Cu, con concentraciones de 0, 2, 10, 20, 50 y 100 ppm. Se realizó una extrapolación para determinar la concentración del Cu en el blanco, se obtuvo una concentración de 62 µg/g y se corroboró el resultado por la técnica de Espectroscopia de Absorción Atómica.

ABSTRACT

The lagoon system of the southern area of Tamaulipas is exposed to pollutants from both the earth's crust and anthropogenic activities. One of the organisms that has been affected is the oyster *Crassostrea virginica*, which is a mollusk of high protein and nutritive degree, its demand has been increasing but its production has been affected due to the contamination of aquatic ecosystems. To study the concentration of heavy metals in *C. virginica* organisms, the Laser Induced Plasma Spectroscopy (LIBS) technique was used. In the analysis, a Nd: YAG monopulse laser (1064 nm) was used. To identify heavy metals in the tissue of the *C. virginica* oyster, two samplings were realized at the mouth of the Tigre River, in Aldama, Tamaulipas, the first sampling was made in September 2017 and the second in May 2018, in each sampling 90 organisms were collected. Physicochemical parameters of the water were registered for both samples. Water temperature was 31.58 and 30.66°C and water salinity was 14.2 and 35.8, respectively. The index of physiological condition was 18.3 and 24, respectively. For the LIBS analysis, tablets were made with the oyster tissue. In the spectrum, the atomic lines were identified for Fe, Mg, Al, Cu, Cr, C, Na, Ca, H and O. Finally, Calibration curves were made for different atomic lines of Cu, with concentrations of 0, 2, 10, 20, 50 and 100 ppm. An extrapolation was carried out to determine the concentration of Cu in the sample, a concentration of 62 µg / g was obtained and the result was corroborated by the Atomic Absorption Spectroscopy technique.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
ÍNDICE DE TABLAS	XV
Capítulo 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes	4
1.2. Objetivos	12
1.2.1. Objetivo general	12
1.2.2. Objetivos específicos.....	12
Capítulo 2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	13
2.1. Ostiones	13
2.1.1. Hábitat.....	14
2.1.1.1. Laguna de San Andrés	15
2.1.2. El ostión como alimento	16
2.1.3. Producción	17
2.1.4. Captura del ostión	18
2.2. <i>Crassostrea virginica</i>	18
2.2.1. Ciclo de vida del ostión.....	18
2.2.2. Depredadores	19
2.2.3. Estado fisiológico.....	20
2.2.3. Composición química del ostión	20
2.3. Contaminantes	21
2.3.1. Metales pesados	22
2.3.2. Metales pesados en ostiones	22
2.3.3. Toxicología de los metales en seres humanos	24
2.4. Técnicas Espectroscópicas	29
2.4.1. Niveles de ionización.....	29
2.4.2. Espectroscopia de Absorción Atómica	30
2.4.3. Láser	32
2.4.4. Espectroscopia de Plasma Inducido por Láser (LIBS)	35
2.5. Curvas de calibración.....	42
2.5. Método de adición estándar.....	43

Capítulo 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	45
3.1. Determinación de los parámetros fisicoquímicos de la desembocadura del río Tigre y el estado fisiológico del ostión <i>Crassostrea virginica</i> en época seca y de lluvia.	46
3.1.2. Medición de los parámetros físico – químicos del agua del sitio de muestreo.	47
3.2. Recolección de ostión en septiembre de 2017 y mayo de 2018.	47
3.3. Biometría del ostión.....	48
3.3.1. Extracción y secado del tejido	49
3.3.2. Índice de Condición Fisiológica (ICF)	49
3.4. Aplicación de la técnica LIBS para el análisis del tejido del ostión.....	49
3.4.1. Instalación experimental LIBS	49
3.4.2. Metodología de la aplicación de la técnica LIBS para análisis del tejido del ostión	51
3.5. Elaboración de pastillas del ostión <i>Crassostrea Virginica</i>	52
3.6. Análisis LIBS del tejido del ostión con diferentes concentraciones de Cu.....	54
3.6.1. Elaboración de seis pastillas del ostión <i>Crassostrea Virginica</i> con diferentes concentraciones de Cu.....	55
3.6.2. Análisis LIBS del tejido del ostión con diferente concentración de Cu.	56
3.7. Análisis por Espectroscopia de Absorción Atómica	58
Capítulo 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
4.1 Determinación de los parámetros físico – químicos de la desembocadura del río Tigre y el estado fisiológico del ostión <i>Crassostrea virginica</i> en septiembre 2017 (época de lluvia) y mayo 2018 (época de seca).	59
4.1.1. Parámetros físico – químicos de la desembocadura del río Tigre registrados en los muestreos de septiembre de 2017 y mayo de 2018.	59
4.1.2. Estado fisiológico del ostión <i>C. virginica</i> recolectado en septiembre de 2017 y mayo de 2018.	60
4.2 Análisis elemental del ostión <i>C. virginica</i> de los dos muestreos mediante la técnica LIBS.	62
4.2.2. Espectros de ambos muestreos	62
4.2.3. Espectro diferencia de intensidades registradas en ambos muestreos.....	64
4.3. Análisis del tejido del ostión con diferentes concentraciones de Cu mediante LIBS.....	68
4.3.1. Análisis semicuantitativo mediante la técnica LIBS del tejido del ostión con diferentes concentraciones de Cu	70
4.3.2. Análisis mediante la técnica Espectroscopia de Absorción Atómica del tejido del ostión con diferentes concentraciones de Cu	76
Capítulo 5. CONCLUSIONES	77
TRABAJOS FUTUROS	78

GLOSARIO79
PRODUCTIVIDAD80
REFERENCIAS.....82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales estados productores de ostión	2
Figura 2. Espectros LIBS de muestras de ostión de Florida. Adaptada de Johnson. (2013)	5
Figura 3. Espectros en el tejido del cerdo. Adaptada de Lin Huang. (2016)	7
Figura 4. Espectros LIBS del tejido del pescado tilapia. Adaptada de Sosa Saldaña. (2016)	8
Figura 5. Ubicación de estaciones de muestreo en la laguna de San Andrés, Aldama, Tamaulipas.....	9
Figura 6. Ubicación geográfica de la Laguna de San Andrés, Aldama, Tamaulipas y sus estaciones de muestreo. Adaptada de (Vázquez, 2005)	10
Figura 7. Partes del ostión.....	14
Figura 8. Sitio de muestreo en la Laguna de San Andrés, Aldama, Tamaulipas	16
Figura 9. Ciclo de vida del ostión, Adaptada de (Goldsborough. 2001)	19
Figura 10. Bioacumulación y biomagnificación	23
Figura 11. Toxicología de metales pesados	25
Figura 12. Principales componentes de un espectrómetro de Absorción Atómica.....	30
Figura 13. Componentes de un láser.	33
Figura 14. Diagrama de instalación experimental LIBS	39
Figura 15. Gráfica de calibración por el método de adición estándar	44
Figura 16. Diagrama del diseño metodológico.....	45
Figura 17. Localización del sitio de recolección del ostión <i>Crassostrea virginica</i> en la Laguna de San Andrés, Aldama, Tamaulipas.	46
Figura 18. Sonda Hydrola DS5.....	47
Figura 19. Recolección de ostión <i>C. virginica</i> en la desembocadura del Río Tigre.....	47
Figura 20. Lavado de ostión	48
Figura 21. Mediciones de la valva del ostión.	48
Figura 22. Espectro LIBS del tejido del ostión con diferentes frecuencias de disparo.	51
Figura 23. Proceso de elaboración de pastilla del tejido del ostión <i>Crassostrea virginica</i> .	53

Figura 24. Proceso de elaboración de pastillas del tejido del ostión <i>Crassostrea virginica</i> con diferentes concentraciones de Cu.	56
Figura 25. Espectro de Cobre (I) de la base de datos NIST	57
Figura 26. Espectro de Cu (I) de la base de datos NIST	57
Figura 27. Depredadores del ostión: balanos (<i>Balanus</i>), almejas (<i>Ruditapes ohillippinarum</i>), poliquetos (<i>Polychaeta</i>) y caracol (<i>Melongena corona</i>).	60
Figura 28. Mediciones de la valva del ostión en septiembre de 2017 y mayo de 2018.	60
Figura 29. Espectros LIBS representativo del tejido del ostión recolectado en muestreos de septiembre de 2017 y mayo de 2018.	62
Figura 30. Espectros LIBS del ostión recolectado en septiembre 2017 y mayo 2018.	63
Figura 31. Espectro LIBS del ostión de la diferencia entre las intensidades de septiembre y mayo.	64
Figura 32. Espectro diferencia del intervalo de 360 a 450 nm	65
Figura 33. Espectro diferencia del intervalo de 450 a 550 nm	66
Figura 34. Espectro diferencia del intervalo de 550 a 650 nm	66
Figura 35. Espectro diferencia del intervalo de 650 a 800 nm	67
Figura 36. Espectro LIBS del tejido del ostión con diferentes concentraciones de Cu.	68
Figura 37. Espectros LIBS de las muestras del tejido del ostión y del patrón de cobre. ...	69
Figura 38. Espectro LIBS de la muestra del tejido del ostión con diferentes concentraciones de Cu.....	69
Figura 39. Gráfica del espectro LIBS de la muestra del tejido del ostión	70
Figura 40. Relaciones de intensidad entre el Na y diferentes concentraciones de Cu	71
Figura 41. Curva de calibración de la relación de intensidad de Na I (588.9 nm) /Cu I (521.5 nm) para diferentes concentraciones de Cu en el tejido del ostión.	72
Figura 42. Curva de calibración de la relación de intensidad de Na I (588.9 nm) /Cu I (324.6 nm) para diferentes concentraciones de Cu en el ostión <i>C. virginica</i>	72
Figura 43. Curva de calibración de la relación de intensidad de Na I (589.5 nm) /Cu I (324.6 nm) para diferentes concentraciones de Cu en el tejido del ostión <i>C. virginica</i>	73
Figura 44. Curva de calibración de la relación de intensidad de Na I (589.5 nm) /Cu I (515.11 nm) para diferentes concentraciones de Cu en el tejido del ostión.	73
Figura 45. Gráfica de Líneas de Cu con diferentes concentraciones.	74

Figura 46. Curva de calibración de intensidades de Cu obtenidas en el análisis LIBS del ostión.75

Figura 47. Estimación por extrapolación de la concentración de Cu en el tejido del ostión empleado como blanco.76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentración de Plomo (Pb) y Cadmio (Cd) en <i>Crassostrea Virginica</i> durante diferentes temporadas en la Laguna de San Andrés, Tamaulipas.	9
Tabla 2. Concentraciones de metales en diferentes lugares del país	11
Tabla 3. Clasificación Taxonómica del ostión	15
Tabla 4. Componentes químicos del tejido del ostión	21
Tabla 5. Elementos principales presentes en el ostión	21
Tabla 6. Límites máximos de metales pesados permitidos en moluscos bivalvos	24
Tabla 7. Situaciones de emergencia derivadas con productos químicos	25
Tabla 8. Ventajas y desventajas de la aplicación de la técnica LIBS	41
Tabla 9. Concentración de Cu en disoluciones	55
Tabla 10. Identificación de muestras con diferente concentración Cu	55
Tabla 11. Parámetros físicos – químicos del sitio de muestreo	59
Tabla 12. Peso en seco del tejido y valva del ostión	61
Tabla 13. Intensidades LIBS de líneas de Cu con diferentes concentraciones.	74

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN

Los contaminantes químicos influyen negativamente en los ecosistemas, cada vez es más común encontrar enfermedades en el ser humano como trastornos digestivos e intoxicaciones derivadas por consumir productos provenientes de ecosistemas contaminados por metales pesados, particularmente los que se extraen de los ecosistemas acuáticos [1]. Por lo anterior es indispensable evaluar de manera periódica la concentración de metales pesados en organismos acuáticos. Entre los organismos más vulnerables a la contaminación acuática se encuentran los moluscos [2], principalmente el ostión, ya que es sedentario y al ser un organismo filtrador está expuesto a la bioacumulación de metales pesados, los cuales sufren una biomagnificación afectando así a sus consumidores.

De este modo un ecosistema acuático se puede monitorear a través de la caracterización de los moluscos, conociendo su estado fisiológico y las condiciones en las cuales se desarrollan. Los ostiones son elementos claves por ser bioacumuladores [3] y por su ubicación en la cadena trófica, aunado a que el consumir ostiones proporciona una fuente importante de nutrientes [4] y la recolección de ostiones es una actividad productiva de gran relevancia en la región del sur de Tamaulipas.

De acuerdo con el informe del Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2017, SAGARPA[5], México ocupa el sexto lugar en producción ostrícola, la producción nacional fue de 53 mil 37 toneladas, entre los principales estados productores del país se encuentran Veracruz, Tabasco, Baja California, Nayarit y Tamaulipas como se muestra en la Figura 1, concentrándose el 93% de la producción nacional en el Golfo de México, aportando Tamaulipas 3,990 toneladas.



Figura 1. Principales estados productores de ostión.

Sin embargo, la producción del ostión ha disminuido, en el 2012 Tamaulipas era el tercer estado del país con mayor producción ostrícola, la producción anual reportada era de 3,990 ton, ahora está en la sexta posición con un total de 2,528 toneladas [5]. Estos datos reflejan las repercusiones de los cambios climáticos en el ecosistema acuático y la importancia de su monitoreo [7].

Las técnicas espectroscópicas que se utilizan actualmente para determinar la concentración de metales pesados en el molusco bivalvo se realizan mediante un análisis químico en laboratorio y por tratarse de técnicas unielementales, cuando se trata de un análisis multielemental aumenta considerablemente el tiempo y el costo.

Ante esta problemática surge la necesidad de una técnica de análisis multielemental, que con una preparación mínima de la muestra permita un monitoreo continuo, como la técnica de Espectroscopia de Plasma Inducido por Láser (LIBS).

La Espectroscopia de Plasma Inducido por Láser (*LIBS por sus siglas en inglés*) se ha aplicado en la detección de metales pesados en distintas especies animales como el cerdo [8], el pescado tilapia [9] y en otros tejidos biológicos [10].

El objetivo del presente trabajo de investigación es la aplicación de la técnica LIBS para la identificación de metales pesados en el tejido del ostión *Crassostrea virginica*, para lo cual

se realizó la recolección de organismos en la desembocadura del Río Tigre de Aldama, Tamaulipas, en septiembre de 2017 y mayo del 2018, se hizo un análisis elemental del tejido de ostión en una presentación de pastilla de 1 g, aplicando un láser Nd: YAG de una longitud de onda de 1064 nm. Se identificaron en el tejido del ostión las líneas de C, Mg (I y II), Cr (I y II), Fe (I y II), Na (I), Ca (I y II), Al (I y II), Cu (I y II), H (I), K (I) y O (I).

La estructura de la tesis está conformada como sigue: en el Capítulo dos se describe el fundamento teórico de la investigación, abordando los siguientes temas: Ostiones, *Crassostrea virginica*, Metales Pesados y Técnica LIBS. En el Capítulo tres se refiere a la metodología del presente estudio incluyendo la descripción de la zona de estudio (Laguna de San Andrés, en Tamaulipas). El Capítulo cuatro incluye resultados y discusión, y por último el Capítulo cinco especifica conclusiones y recomendaciones para trabajos futuros.

1.1. Antecedentes

Existen en la literatura diversos trabajos sobre el análisis elemental por LIBS en distintas muestras biológicas, como el de Johnson *et al.* (2013), ellos recolectaron organismos *C. Virginica* en seis sitios muestrales de dos reservas estuarinas costeras: 4 sitios en Grand Bay, Mississippi en marzo del 2011 y 2 sitios en Apalachicola Bay, Florida, en febrero del mismo año. Mediante el análisis espectral LIBS, identificaron las líneas de Al, C, Ca, H, K, Mg, Na, Si, Sr y Zn e hicieron agrupaciones intra e Inter sitio de los ostiones según su origen geográfico[11].

En cuanto al método ellos proponen, recolectar cinco ostras de igual tamaño (aproximadamente 6 por 4 cm) de cada sitio muestral. Las conchas se lavaron con agua Milli-Q estéril. Se registró el peso húmedo del tejido del ostión y el peso de la concha. Los tejidos se agruparon y se homogeneizaron con una mezcladora estéril Warring. Los homogeneizados se liofilizaron y se registraron los pesos secos. Los tejidos se trituraron finamente y se pasaron alícuotas de muestras a través de un tamiz de nylon de malla 100. Se elaboraron pastillas sin ningún aditivo o agente aglutinante, mediante la compresión de 0,5 g de tejidos tamizados en un molde de acero cilíndrico bajo una presión mecánica de $1,4 \times 10^8 \text{ kg m}^{-2}$ durante 30 minutos. Las pastillas presentaron un diámetro de 13 mm y un espesor de 2 mm.

Se utilizó un láser Nd: YAG Q-switch (Quantel, Big Sky Brilliant, EE. UU.) de longitud de onda de 532 nm. El espectro ilustrado se normalizó por la intensidad de pico de Na I (588,99 nm). En la

Figura 2 se muestran las líneas espectrales de C, Mg, Al, Ca, H, K y Na, siendo la línea de Na la de mayor intensidad.

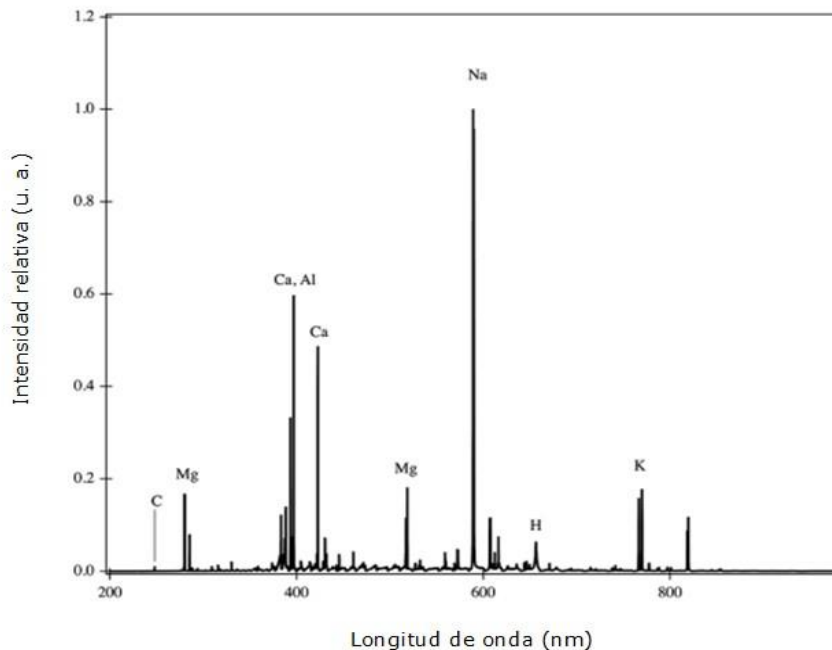


Figura 2. Espectros LIBS de muestras de ostión de Florida. Adaptada de Johnson (2013).

En el estudio mencionado, se realizó un análisis de componentes principales (*PCA, por sus siglas en inglés*) como un primer paso en el análisis de factores para identificar los componentes que pueden explicar las relaciones dentro de los datos. Una vez observado el agrupamiento visual, se llevó a cabo un análisis discriminante (*DFA, por sus siglas en inglés*) para maximizar las diferencias inherentes entre los conjuntos de muestras de ostras definidas. Se hizo un análisis de agrupamiento jerárquico (*HCA, por sus siglas en inglés*) para definir la cantidad de grupos y subgrupos correspondientes a regiones y sitios empleando una matriz de 600 espectros que tenían 21 variables de las cuales se redujeron a 3 grupos de componentes principales PC1, PC2 y PC3, con varianza de 58.01%, 22.3% y 6.1%, respectivamente. En el análisis discriminante se consideró la mitad del conjunto de datos de la matriz (300 por 3 PC) en la elaboración del modelo de clasificación, éste a su vez fue validado por los otros 300 espectros restantes. El 91.3% de los espectros agrupados fue clasificado correctamente de acuerdo con su lugar de origen.

Otro trabajo fue el desarrollado por Wuang *et al.* (2016) [8], en el que contaminaron carne fresca de cerdo con una solución de Cromo (Cr) con diferentes concentraciones, después de secar el tejido para eliminar el agua hicieron pastillas. Hicieron un análisis LIBS e

identificaron las líneas características del Cr I 425.43, 427.48 y 428.97, definiendo como línea de calibración la línea del Cr I 425.43. Elaboraron un modelo para comparar la intensidad de las líneas espectrales contra la concentración de Cr, obtenida por Espectroscopia de Absorción Atómica (AAS, por sus siglas en inglés). Las soluciones con Cr se prepararon mezclando dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) con una pureza $\geq 99.8\%$, y agua desionizada, a las siguientes concentraciones: 2,3,4,5,6,9,11,12,13,14,17 y 18 $\mu\text{g/L}$. La carne fue molida y sumergida en la solución durante 12 h, se tomaron muestras y se enjuagaron tres veces con agua desionizada se secaron en un congelador al vacío hasta que el peso fue constante para evitar la influencia del contenido de agua, se pulverizaron y tamizaron con una malla del número 150, se elaboraron pastillas tomando 3 g de muestra a una presión de 25 MPa en una prensa hidráulica, obteniendo medidas de las pastillas de 30 mm de diámetro y 4 mm de espesor, se hicieron 3 muestras por cada concentración. Se empleó un láser Nd: YAG (1064 nm) (Beamtech Optronics) con un Q-switch de energía máxima de 300 mJ (en varianza energía de $\sim 3\%$), duración de pulso de 8 ns y un máximo la frecuencia de repetición del pulso de 5 Hz, distancia focal de 10 cm en la superficie de la muestra de cerdo prensado, se obtuvieron 50 espectros para cada muestra, y cada espectro era la acumulación de dos puntos de pulso diferentes en la superficie de la muestra. En Figura 3 se presenta un espectro de este estudio donde se observan algunas de las líneas características de los elementos presentes en la muestra del cerdo, entre ellas las líneas del Mg I y II, Al I, Ca II, el Cr I, así como algunas bandas de CN. Se realizó una curva de calibración para el Cr considerando el promedio de las líneas

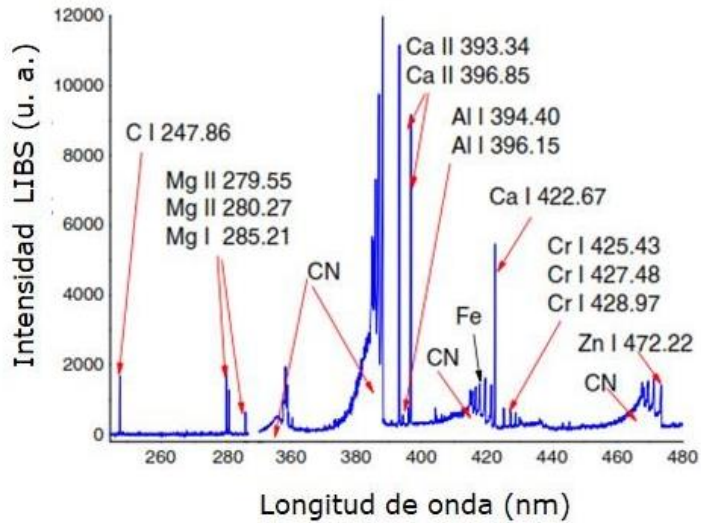


Figura 3. Espectros en el tejido del cerdo. Adaptada de Lin Huang. (2016)

También en 2016 se publicó un trabajo realizado por Sosa Saldaña *et al.* (2016), ellos emplearon la técnica LIBS para monitorear la acumulación de plomo y cobre en el pez comestible "tilapia del Nilo" (*Oreochromis niloticus*). Las muestras se extrajeron del músculo del pescado, con las siguientes medidas: 2 cm de ancho, 2.5 cm de largo y 0.5 cm de espesor; con un peso de 1.60 ± 0.10 g. Se hicieron curvas de calibración para el Cobre (Cu) y Plomo (Pb) con diferentes concentraciones, 10000, 1000, 200, 100, 50 y 20 $\mu\text{g/g}$. Se utilizó un láser de Nd: YAG, de una longitud de onda de 1064 nm, con Q-Switch activo, monopulso, con una duración del pulso de 7 – 10 ns. En la Figura 4 se observan las líneas espectrales identificadas en el pescado, las de color negro son las líneas del músculo de la tilapia contaminado con Cu y las líneas de tono gris son las líneas del espectro de la muestra sin contaminar, se observa una mayor intensidad en el espectro del tejido contaminado de las líneas Cu y las intensidades de las líneas del Ca permanecen casi igual en ambas muestras, se obtuvieron límites de detección de 25 $\mu\text{g/g}$ para Pb y 100 $\mu\text{g/g}$ para Cu [9].

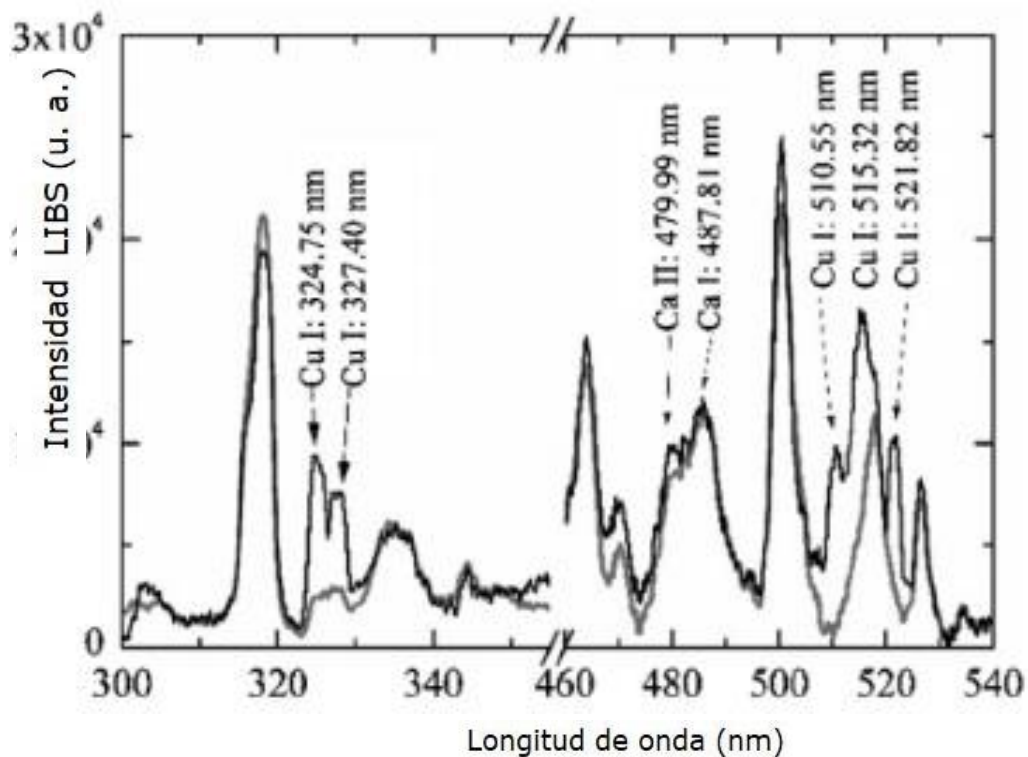


Figura 4. Espectros LIBS del tejido del pescado tilapia. Adaptada de Sosa Saldaña. (2016)

Con respecto a estudios realizados del ostión *C. virginica* de la laguna de San Andrés ubicada en Aldama, Tamaulipas, Vázquez *et al.* en 1990 [12] analizaron mediante AAS el contenido de siete metales pesados (Cadmio, Cobre, Hierro, Manganeso, Níquel, Plomo y Zinc), en tejido de organismos *C. virginica* en la laguna de San Andrés en 11 estaciones de muestreo como se ilustra en la Figura 5. El período de muestreo fue de agosto de 1984 a junio de 1985.

Recolectaron muestras durante diferentes condiciones climatológicas: lluvia (ago - sep 84), norte (oct - dic 84), seco (abril 85), lluvia (abril - junio 85). Las muestras secas de 1 gramo se almacenaron en bolsas de plástico, se congelaron a -20°C y fueron liofilizados.

En la Tabla 1 se muestra la concentración de metales en el tejido del ostión de las cuatro temporadas, se obtuvo un promedio para plomo de $4.85 \mu\text{g/g}$, cadmio $2.76 \mu\text{g/g}$ y cobre $4.9 \mu\text{g/g}$.

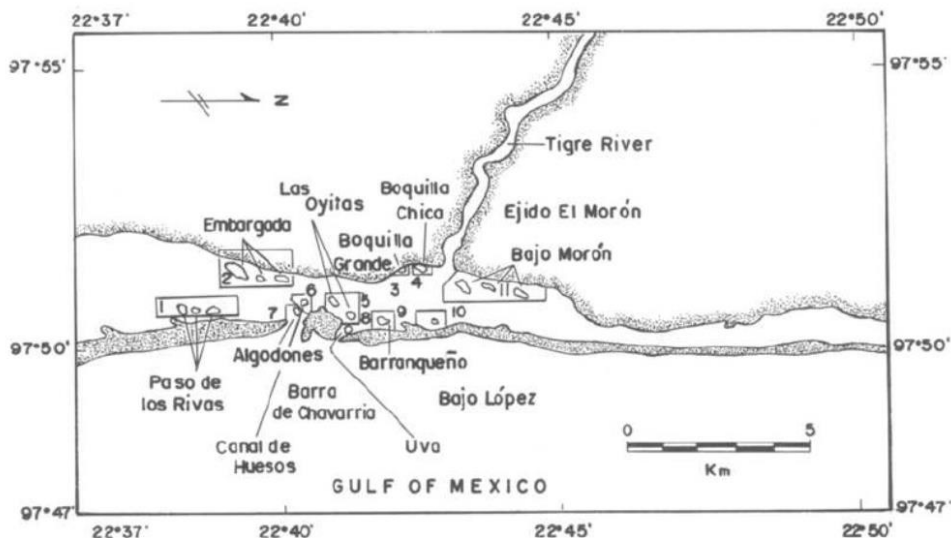


Figura 5. Ubicación de estaciones de muestreo en la laguna de San Andrés, Aldama, Tamaulipas.

Tabla 1. Concentración de Plomo (Pb) y Cadmio (Cd) en *Crassostrea Virginica* durante diferentes temporadas en la Laguna de San Andrés, Tamaulipas.

Concentración de Plomo, Cadmio, Cu ($\mu\text{g/g}$)				
Metal	Temporada	Mínimo	Máximo	Media
Plomo	I	4.7	6.6	5.5
	II	5.3	7.6	6.2
	III	3.3	4.4	3.8
	IV	3.3	4.8	3.9
Cadmio	I	1.5	4	2.2
	II	1.5	2.1	1.8
	III	1.5	7.5	2.5
	IV	1.5	4.5	2.3
Cobre	I	0.98	4.55	2.9
	II	4.66	18.6	8.0
	III	1.49	12.9	5.8
	IV	0.58	5.68	2.7

Temporadas: (I) lluvia agosto – septiembre 84, (II) norte octubre - diciembre 84, (III) seco abril 85, (IV) lluvia abril - junio 85.

Vázquez-Sauceda et al. en el año 2000 recolectaron muestras mensuales de ostión *C. virginica* mediante buceo libre, en la Figura 6 se muestra la ubicación geográfica de la laguna de San Andrés y las cinco estaciones de muestreo, el cual se realizó de abril a septiembre del año 2000. Se recolectaron 10 organismos y 200 ml de agua de mar por estación. Los organismos fueron disectados para separar el tejido de la concha y se realizó un análisis en el ostión por la técnica de absorción atómica bajo la Norma Oficial Mexicana NMX-AA-051-SCFI-2016[13], el estudio demostró la presencia de Plomo y Cadmio en el ostión[14]. El mayor contenido de plomo en el ostión se reportó en las estaciones 1 y 2, las concentraciones reportadas fueron de 0.85 ± 0.10 y 0.86 ± 0.09 $\mu\text{g/g}$ respectivamente, siendo inferior a lo indicado por la Norma Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009[15], misma que especifica plomo 1.0 $\mu\text{g/g}$. En lo referente al cadmio, los valores obtenidos en las 5 estaciones fueron superiores a 0.5 $\mu\text{g/g}$ que es lo señalado en la Norma Mexicana ya citada, los valores registrados de cadmio por orden de estación fueron de 2.31, 2.25, 2.25, 2.21 y 2.33 $\mu\text{g/g}$. La estación cinco registró los valores más altos, por su ubicación en la desembocadura del río Tigre y se consideró que la concentración del Cadmio es debido a la erosión y a los procesos biogeoquímicos. Con respecto al cobre la mayor concentración fue de 18.6 $\mu\text{g/g}$ correspondiente a la temporada II.

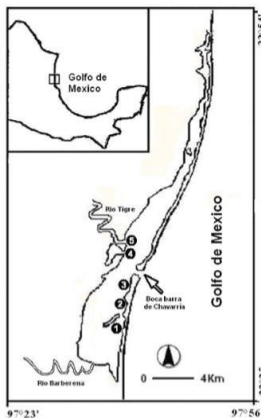


Figura 6. Ubicación geográfica de la Laguna de San Andrés, Aldama, Tamaulipas y sus estaciones de muestreo. Adaptada de (Vázquez, 2005)¹

¹ Vázquez-Sauceda M. L., Aguirre-Guzmán G., Sánchez-Martínez J. G., Pérez-Castañeda R. y Rábago-Castro J. 2005. Contenido de cadmio y plomo en agua, ostión y sedimento de la Laguna de San Andrés, Aldama, Tamaulipas, México. *Ciencia y Mar*. 9(27):3-9.

Se han realizado trabajos enfocados al análisis de metales pesados en diversos sistemas acuáticos del país, reportando las cifras que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Concentraciones de metales en diferentes lugares del país

Referencia	Localidad	Pb (µg/g)	Cu (µg/g)
Ávila-Peréz et al. (1990)	El Chijol, Veracruz	11	280
Botello et al. (1976)	Laguna de Términos, Campeche		172
Sims y Presley (1976)	Bahía San Antonio, EUA.	0.8	161
Goldberg et al. (1978)	Costa del Atlántico, EUA.	0.5	220
Villanueva et al. (1988)	Laguna del Ostión, México		38
Páez et al. (1988)	Mazatlán, Sinaloa	1.8	53.8
Rosas et al. (1983)	Laguna del Carmen, Campeche		3.04

No existen estudios recientes sobre análisis de metales pesados de la desembocadura del Río Tigre, esto puede ser debido a lo complejo de la técnica por ser unielemental, por lo tanto, se requiere de una técnica alternativa que permita el análisis de diferentes metales para conocer la situación actual del ostión de la región.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Analizar metales pesados en organismos *Crassostrea virginica* recolectados en la desembocadura del Río Tigre, Aldama, Tamaulipas mediante la técnica de Espectroscopía de Plasma Inducido por Láser (LIBS).

1.2.2. Objetivos específicos

- Determinar los parámetros fisicoquímicos (temperatura y salinidad) de la desembocadura del río Tigre y el estado fisiológico del ostión *Crassostrea virginica* en época de seca y de lluvia.
- Determinar los elementos presentes en el ostión *C. virginica* de los dos muestreos mediante la técnica LIBS.
- Cuantificar la concentración de Cu presente en el tejido del ostión mediante LIBS y comparar los análisis con la técnica de Absorción Atómica.

Capítulo 2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1. Ostiones

Los bivalvos pertenecen al filo Mollusca, un grupo diverso que incluye especies como los quitones, gasterópodos, colmillos de mar, cefalópodos (calamar y pulpo), almejas, ostras, mejillones y vieiras. El filo tiene seis clases entre ellas los Lamelibranquios o Bivalvos.

El ostión se caracteriza por tener una concha producida por la misma ostra a través de un órgano llamado manto, sus dos valvas son de forma irregular y asimétrica, son dos superficies de estructuras calcáreas que cubren totalmente el tejido del ostión, la valva superior es más pequeña y delgada que la valva inferior. La cara exterior es áspera y la interior cuenta con una superficie lisa creada a base de carbonato de calcio llamada “nácar” [16].

El proceso de formación de la valva se inicia cuando la valva inferior se fija al sustrato, el cual puede ser otra valva o rocas, existe un hueco entre valvas, en el cual se encuentra el tejido del cuerpo del ostión. Las dos valvas se unen por el músculo abductor, el cual es un ligamento que permite abrir y cerrar de forma rápida generando una especie de corriente a chorro [16].

El ostión es hermafrodita protándrico, madura primero como macho. Cuando hay presencia abundante de alimentos, las hembras dominan la proporción sexual lo contrario a cuando hay áreas sin suficiente alimentación. Cuando escasea el alimento las hembras se transforman en machos [17].

Durante el ciclo reproductivo las larvas maduras se adhieren al sustrato mediante una secreción de cemento de una glándula en el pie, llegando así a su estado juvenil. La tasa de crecimiento del ostión varía con una media entre 6 a 9 meses [16].

El organismo del ostión está conformado por un aparato digestivo adaptado para filtrar hasta 150 litros de agua por día, misma que contiene protozoarios, huevecillos, larvas y algas; el aparato respiratorio tiene finos apéndices (cilios cubiertos con mucus) de las

branquias que fijan el oxígeno y desprenden el dióxido de carbono, el órgano ciliado (velum) permite la captura de su alimento, después desarrolla una mancha ocular y un pie larval mediante el cual se posiciona en sustratos para su asentamiento; cuenta con un sistema nervioso y un corazón de un solo ventrículo; un sistema que permite que circule el agua dentro de la concha compuesto de dos tubos denominados sifones. En la Figura 7 se observan las partes internas del ostión.



Figura 7. Partes del ostión.

Existen diversas especies del género *Crassostrea* de acuerdo al área, en las costas atlánticas europeas y americanas, está presente las especies *Crassostrea Ungulata*, *Crassostrea virginica*, el "ostión de manglar" o *Crassostrea rhizophorae*, *Crassostrea puelchana*, *Crassostrea spreta*; mientras que, en las costas del Océano Pacífico americano, se identifican *Crassostrea columbiensis* y *Crassostrea equatorialis*. En Japón, el "ostión japonés" *Crassostrea gigas*, y la *Crassostrea laperousi*. Y en el área de Filipinas e Indochina, la especie presente es *Crassostrea madresensis*. [16]

2.1.1. Hábitat

El ostión *Crassostrea Virginica* (Gmelin, 1791) habita tanto en el mar como en aquellas zonas litorales donde se mezclan aguas saladas y dulces, ya sean esteros, desembocaduras de río o lagunas costeras. El ostión pertenece al filo molusco, clase Bivalva por estar compuesto de dos valvas con las cuales protege su tejido, su clasificación taxonómica completa se indica en la Tabla 3.

Tabla 3. Clasificación Taxonómica del ostión

Reino	Animalia
Filo	Molusco
Clase	Bivalvo
Subclase	Pteriomorphia
Orden	Ostreoida
Familia	Ostreidae
Género	Crassostrea
Especie	Virginica

2.1.1.1. Laguna de San Andrés

La Laguna San Andrés se encuentra ubicada entre las coordenadas 22°19' 49" a 23° 59' 23"N y 97°45'40" a 98°06'10"O; cuenta con una superficie de 732 km² (8,300 ha).

Por la diversidad biológica que prevalece en la zona, la laguna representa una fuente de producción y alimentación de diferentes especies de tortugas marinas, aves playeras, canoras y de ornato, así como especies piscícolas de peces. Alberga manglares, y pastos marinos [6], como se puede observar en la Figura 8.



Figura 8. Sitio de muestreo en la Laguna de San Andrés, Aldama, Tamaulipas

La vegetación en los márgenes de la laguna es de selva baja caducifolia con vegetación secundaria, vegetación halófila como el pastizal salino de zacahuite y manglares. El clima es templado subhúmedo, la precipitación promedio anual registrada es de 635-791 mm; evaporación 1,475-1,876 mm anual. Hay presencia de huracanes en verano y nortes en invierno. La temperatura media anual identificada es de 17-24 °C. Es una plataforma estrecha en la cual hay presencia de minerales de montmorillonita y kalenita; existe marea diurna y predomina un oleaje bajo. Existe aporte de agua dulce por ríos [18].

La Biodiversidad está compuesta de moluscos, crustáceos, peces, tortugas, aves, pastos marinos (*Ruppia marítima*), manglares (mangle blanco *Laguncularia racemosa* y rojo *Rhizophora mangle*). Alta integridad ecológica en praderas marinas, dunas y playas. Zona de crecimiento y alimentación de crustáceos (*Callinectes rathbunae*, *C. sapidus*, *Litopenaeus setiferus*, *Macrobrachium acanthurus*) y de peces. La laguna está identificada como una zona de crecimiento de moluscos *Crassostrea virginica* e *Ischadium recurvum*[6].

2.1.2. El ostión como alimento

Los ostiones han sido alimento para el hombre desde la época prehistórica, se han encontrado restos de conchas en las cavernas del período Paleolítico. Son altamente valorados por su efecto nutritivo, pueden servirse cocidos, guisados, ahumados, en vinagre, enlatados, a la plancha, salteados, en su concha o crudos, como por ejemplo los

ostiones frescos o en coctel. Sus partes principales identificables al comerlos son el manto, músculo, la gónada y la grasa. De la gónada se extrae una pequeña bolsa o tira negra que bordea al músculo, la cual es la grasa, con sabor a mantequilla. El músculo tiene una consistencia firme, el manto es crocante, sabe a alga. El sabor de la gónada por su parte permite diferenciar si se trata de un ostión hembra o macho, el sabor más ácido de la hembra, y en el macho algo dulce. Al abrir la concha se debe tirar el agua que contiene el ostión, ya que es agua de mar y la salinidad acumulada de aproximadamente seis ostiones es alta para el organismo humano [17].

En México su recolección suele ser artesanal y para consumo doméstico, aunque actualmente se han implantado diferentes técnicas de cultivo lo que ha permitido una producción que satisface una demanda mayor. Posee una alta fecundidad, se pueden producir hasta 60 millones de huevecillos [19].

2.1.2.1. Valor nutritivo del ostión

El ostión contiene vitaminas A, B, C y D; ácidos grasos omega - 3, compuestos glicerofosfóricos, cloruros, carbohidratos y proteínas, lo que produce una acción estimulante al apetito.

El contenido de minerales refiere al zinc, hierro y cobre que contiene el tejido. La concha del ostión ha sido utilizada en la obtención de glucosamina, un fármaco empleado en problemas de articulaciones para personas de la tercera edad [4].

2.1.3. Producción

El cultivo de moluscos bivalvos forma gran parte de la producción acuícola mundial que está creciendo rápidamente, es aproximadamente el 20 por ciento anual, en el año 2000 se produjeron 14 millones de toneladas.

Los mayores productores de ostión en el mundo son: Japón, Francia, Chile, Estados Unidos, España, Perú, México y Australia; ocupando México el sexto lugar mundial en volumen de producción[16].

2.1.4. Captura del ostión

El ostión *C. virginica* es llamado ostión de fondo, ya que crece en el fondo de los estuarios. Los pescadores utilizan embarcaciones menores que miden de 4 a 6 metros de eslora con motor fuera de borda o remos, los ostiones se extraen a mano con guantes durante la marea baja o mediante el buceo.

Otro método comúnmente empleado es mediante las "gafas", que son dos rastrillos de 2.5 a .5 metros de longitud, unidos formando una pinza; mismas que se introducen abiertas en el agua donde hay bancos ostrícolas; al ser cerradas, sujetan las "piñas" o "manos" de ostiones, que son izadas por el pescador, para después "descornarlos", es decir, limpiar los ostiones de adherencias y crías; al final se colocan en costales llamados "arpillas", que pesan unos 40 kilogramos y contienen de 500 a 600 ostras, o sacan la pulpa de su concha colocándolas en frascos para su refrigeración o consumo[19].

2.2. *Crassostrea virginica*

2.2.1. Ciclo de vida del ostión

El ciclo del ostión inicia con la descarga de los gametos en la columna de agua, esto ocurre en respuesta a diferentes estímulos, como lo son temperaturas más cálidas, feromonas y la presencia de fitoplancton. Una vez fertilizados los huevos, éstos se desarrollan en larvas trocóforas que se mantienen de reservas internas en el huevo como suministro de energía.

Aproximadamente 24 horas después, la trocófora se convierte en una larva véliger con concha, utiliza el ciliado (velum) para capturar alimento y nadar. Dos o tres semanas después, la véliger desarrolla una mancha ocular y un pie larval, el que permite fijarse al substrato. Ya asentada, cementa su valva izquierda al substrato y se transforma por metamorfosis en una ostra juvenil, descartando su velum, reabsorbiendo su pie, y agrandando sus agallas[16]. En la Figura 9 se presenta un esquema del ciclo de vida de los ostiones [20].

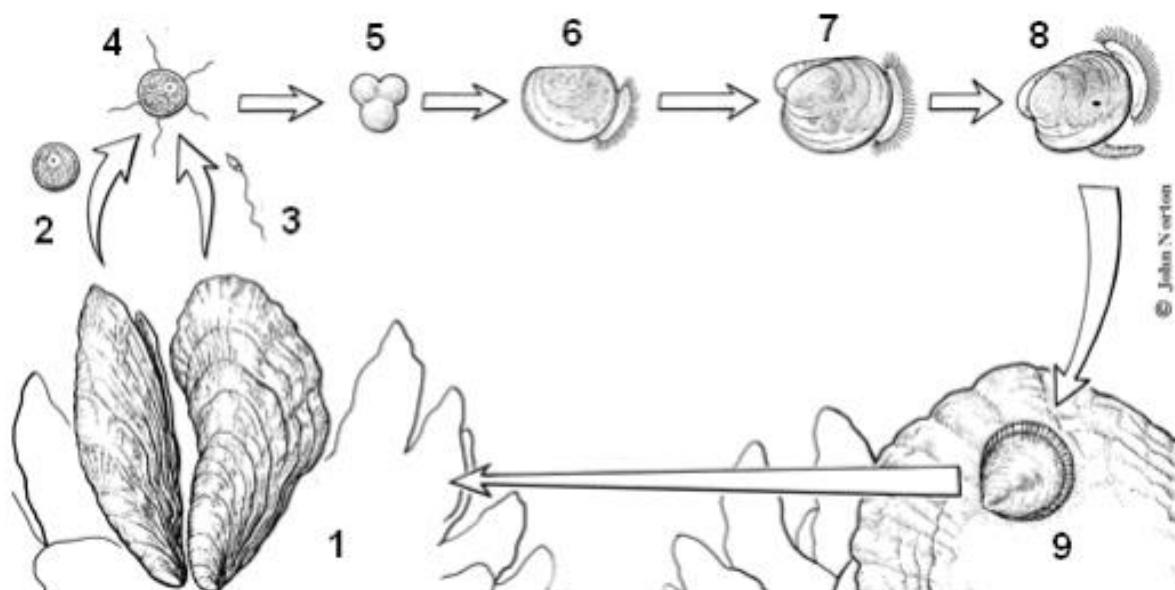


Figura 9. Ciclo de vida del ostión, Adaptada de (Goldsborough. 2001)²

El desarrollo del ostión se ve afectado por la influencia de distintos factores, como son: temperatura, salinidad, circulación del agua, condición del sustrato, alimentación, contaminación por metales pesados, depredadores enfermedades o situaciones comunes como el estrés fisiológico o posreproductivo.

2.2.2. Depredadores

ALgunos depredadores del ostión son las estrellas de mar (*Asteroidea*), pulpos (*Octopoda*), esponjas (*Poríferos*), planarias (*Turbelarios*), balanos (*Balanus*) y lagartos (*Hydrosaurus*).

² Goldsborough, W. y D. Meritt. 2001. Oyster Gardening for Restoration and Education. Maryland Sea Grant College Program for the Oyster Alliance Publication Number UM-SG-SGEP-99-05 1-12 p.

2.2.3. Estado fisiológico

El ostión es una especie euriterma es decir que se puede desarrollar en sitios donde la temperatura varía en un amplio intervalo, sin embargo el aumento en la temperatura disminuye el oxígeno disuelto y aumenta la salinidad, dos parámetros que podrían afectar su metabolismo; al aumentar la temperatura el metabolismo suele ser más activo implicando un mayor movimiento ciliar, aumento en el ritmo respiratorio y cardiaco, así como una mayor cantidad de agua filtrada lo que trae consigo una mayor nutrición pero a la vez una mayor adquisición de contaminantes. El ostión *Crassostrea virginica* durante el período de calor de abril a noviembre se reproduce en una temperatura promedio de 20 grados centígrados, con una salinidad de 10 a 32 [19].

Otro aspecto importante es la salinidad, Polanco et. al. en 2002 [7] reportaron que al disminuir la salinidad se origina un retraso en el desarrollo sexual del ostión influyendo a tal grado de no alcanzar una madurez, afectando el número de integrantes de la población.

El análisis de la condición fisiológica del *C. virginica* se calcula mediante biometría fisiológica (ICF) propuesta por Chávez-Villalba [21]. El ICF permite conocer el estado fisiológico del *C. virginica* evaluando su estado nutricional y su calidad comercial. Se obtiene mediante la siguiente métrica:

$$ICF = \frac{P_1 \times 1000}{P_2} \quad (1)$$

Donde P_1 es el peso s

eco del tejido (g) y P_2 es el peso seco de la concha (g).

2.2.3. Composición química del ostión

El ostión tiene un 80 % de agua en su organismo, tal como se observa en la Tabla 4, la cual muestra la composición química del tejido del ostión, así como la media y desviación estándar del porcentaje presente de proteínas y grasas[16].[4].

Tabla 4. Componentes químicos del tejido del ostión

Componente químico	Promedio y desviación estándar (%)
Humedad (H ₂ O)	80 ± 3
Proteína (C, H, O, N y S)	11 ± 2
Grasa	2.7 ± 0.8
Glucógeno (C ₂₄ H ₄₂ O ₂₁)	2 ± 1

El contenido elemental en los ostiones se muestra en la Tabla 5, entre los cuales se encuentran el magnesio, fósforo, potasio, calcio y sodio, minerales que representa una valiosa fuente nutritiva para quien los consume [16].

Tabla 5. Elementos principales presentes en el ostión

Minerales (mg/100 g)	
Magnesio	38
Fósforo	129
Potasio	288
Calcio	25
Sodio	178

2.3. Contaminantes

Existen tres tipos de contaminantes, biológicos, físicos y químicos, los biológicos son restos orgánicos, bacterias, virus y protozoos, restos vegetales que provocan un mayor crecimiento de las plantas acuáticas disminuyendo el oxígeno disuelto produciendo olores desagradables; los físicos como sedimentos con partículas arrastradas de suelos, tierras de cultivo, minas, sustancias radiactivas, y químicos como los residuos de fertilizantes, residuos industriales, productos procedentes de la descomposición de otros compuestos.

Dentro de los contaminantes más comunes se encuentran los microorganismos patógenos, desechos inorgánicos, nutrientes inorgánicos como los fosfatos y nitratos que provocan un crecimiento elevado de algas y otras especies implicando la eutrofización del agua; materiales y sedimentos suspendidos.

Otro tipo de contaminantes químicos son las sustancias radiactivas las cuales son isótopos radioactivos solubles en agua y las sustancias químicas inorgánicas como las sales, ácidos y metales, sobretodo los metales pesados.

2.3.1. Metales pesados

Los metales pesados se encuentran presentes de forma natural en la corteza terrestre, pero sus concentraciones en cuerpos acuáticos cada vez se han ido incrementando debido a las actividades antropogénicas tanto del campo como del rápido crecimiento urbano. Los metales pesados tienen una densidad mayor a 5 g/cm^3 y un peso atómico comprendido entre 63.54 (Cu) y 200.59 (Hg).

Se pueden clasificar en dos categorías: metales de transición (Co, Cu, Mn y Zn, esenciales en bajas concentraciones, pero tóxicos en concentraciones altas) y los metales y metaloides (Pb, Cd, Hg, As, Se y Sn que son tóxicos en bajas concentraciones)[22].

Se encuentran en la parte izquierda y central de la tabla periódica; además existen metales alcalinos y alcalinotérreos de los grupos I y II A, metales de transición y los grupos III y IV A [23].

2.3.2. Metales pesados en ostiones

Al ser filtradores los ostiones están expuestos a la acumulación de contaminantes físicos, biológicos o químicos. Los primeros se refieren a objetos que no deben permanecer en la especie de estudio, como pueden ser trozos de madera, vidrio, material orgánico o de empaquetamiento; los contaminantes biológicos incluyen organismos vivos o material orgánico que puede ser una amenaza para la salud y con respecto a los contaminantes químicos, dentro de ésta última clasificación se encuentran productos agroquímicos, medicamentos y los metales pesados, mismos que prevalecen dentro del agua en tres

formas: disueltos, en forma coloidal y en sedimentos, al estar en sedimentos o disueltos es cuando se incorporan a los organismos como el fitoplancton y los moluscos. La bioacumulación se presenta cuando una concentración de cierta sustancia es más elevada en el organismo que en su entorno [24].

En el caso de los metales, estos se biomagnifican es decir, que a la par de que va creciendo la cadena trófica, el nivel de acumulación se irá transfiriendo al siguiente nivel al ser ingerido un organismo pequeño por su depredador, como se observa en la Figura 10.

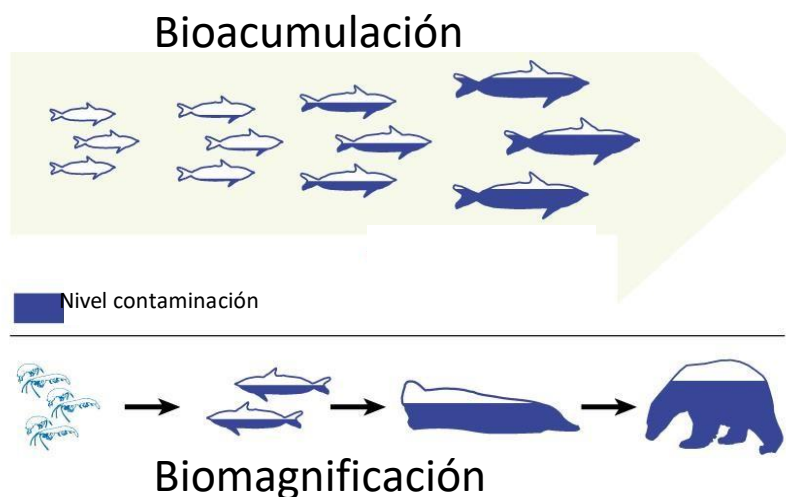


Figura 10. Bioacumulación y biomagnificación

Algunas afectaciones en el ostión ocasionadas a metales pesados son que el Cr disminuye la tasa de crecimiento, aun así puede alcanzar un tamaño comercial, lo relevante es que, al ir incorporando las concentraciones del metal al organismo, estas representan cantidades peligrosas para el hombre. La toxicidad del Cd por el contrario impide al organismo adaptarse y no le permite un desarrollo dimensional normal ya que produce una resistencia metabólica y acumula altas concentraciones del metal, así como una disminución en la capacidad reproductiva [25][26].

En la Tabla 6 se especifican los límites máximos de metales pesados en los moluscos bivalvos, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009 [15].

Tabla 6. Límites máximos de metales pesados permitidos en moluscos bivalvos

Metal	Límite máximo permitido ($\mu\text{g/g}$)
Cadmio (Cd)	0.5
Plomo (Pb)	1.0
Mercurio (Hg)	1.0

La Food and Drugs Administration (FDA, 2003), estableció los niveles máximos de los metales para el consumo de mariscos, siendo éstos de 4.0 $\mu\text{g/g}$ para Cd, 13 $\mu\text{g/g}$ para Cr y 1.7 $\mu\text{g/g}$ para Pb.

2.3.3. Toxicología de los metales en seres humanos

Los oligoelementos son elementos que requiere el organismo en concentraciones traza para el desarrollo de las funciones biológicas; estos son Fe, Cu, Mn, Zn, I, Co, Mb, Se, Cr, Sn, Va, Si y Ni, los cuales aproximadamente conforman el 0.1 % de la masa corporal. Existen otros que se requieren en concentraciones altas como los alcalinos Na y K; y alcalinotérreos Ca y Mg [23]. Sin embargo una deficiencia o concentración alta de estos elementos así como un tiempo largo de exposición provoca daños graves en la salud, retraso mental o la muerte [27].

Existen diferentes factores que determinan el grado en que se ve afectada la salud por la ingesta de metales pesados.

- La forma en que se encuentra el metal
- Dosis
- Edad o estadio de la persona expuesta
- Tiempo de exposición
- Vía de exposición

Más del 25 % de la mortandad mundial está vinculada a factores ambientales, 800,000 niños se ven afectados cada año por exposición al plomo, también es el causante del 2 % de cardiopatías isquémicas y 3% de enfermedades cerebrovasculares, así

también en el 2015 se reportó que el plomo fue la causa del 12.4 % de la carga mundial de discapacidad del desarrollo intelectual idiopático[28].

El 9% de la carga de cáncer de pulmón es por la función que se desempeña y el 5 % derivado de la contaminación del aire. En la Tabla 7 se citan varios acontecimientos derivados de la contaminación química.

Tabla 7. Situaciones de emergencia derivadas con productos químicos

2006	Desechos tóxicos en Cote d'Ivoire	85000 consultas 8 muertes
2007	Envenenamiento por bromuro de sodio Angola	467 personas envenenadas
2009	Envenenamiento por Pb por pilas recicladas, China.	1000 personas envenenadas 18 niños murieron
2012	Envenenamiento por Pb, Cd, As, en Perú	Provincia Hualgayoc completa intoxicada

El consumo de ostiones contaminados con metales pesados repercute en alto grado en la salud, ya que son sustancias incompatibles que no se eliminan y se acumulan en diferentes órganos del cuerpo. En la Figura 11 se especifican algunos de los efectos de la toxicología de los metales pesados en el cuerpo humano.



Figura 11. Toxicología de metales pesados.

El estado de valencia en el que el metal se encuentra influye en la toxicidad, por ejemplo el Cr VI es de mayor riesgo que el Cr III [23].

Uno de los principales causantes de estos trastornos en la salud es el plomo, no existe un nivel de acumulación del plomo seguro, sin embargo, el exceso de plomo perjudica gravemente al organismo ya que entra a los tejidos blandos, entre ellos órganos y cerebro. El plomo es un metal abundante en la corteza terrestre, tiene tres isótopos (206, 207 y 208), siendo la forma más común el PbS, algunas fuentes emisoras antropogénicas son la minería, la fundición, producción, el reciclaje y la eliminación de productos con plomo. El Pb se deposita en los huesos reemplazando el calcio, debido a que los iones Pb^{2+} y el Ca^{2+} que son similares, provocando osteoporosis.

La absorción del plomo es mayor en los niños (hasta cuatro o cinco veces más que en los adultos) y en las personas con deficiencia de calcio o hierro. El plomo depositado en los huesos pasa al flujo sanguíneo. También trae consigo efectos nocivos en el coeficiente intelectual, anemia, alteraciones neurológicas y modificando concentraciones de algunos neurotransmisores como la adrenalina y noradrenalina; así también afecta la sincronización de las conexiones intercelulares durante el crecimiento[29]. Es medido en microgramos de plomo por decilitro de sangre ($\mu\text{g}/\text{dL}$), un nivel de plomo de 10 $\mu\text{g}/\text{dL}$ amerita atención médica. El Pb puede permanecer en la sangre 25 días en el adulto, hasta 10 meses en un infante, 90 días en el hueso trabecular y hasta 20 años en el cortical [30].

La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que una vez dentro del cuerpo, el plomo se distribuye hasta alcanzar el cerebro, el hígado, los riñones, depositándose también en huesos y dientes. Los niños necesitan calcio para que el cerebro haga las conexiones para formarse adecuadamente, si en el proceso el plomo sustituye al calcio, afecta el coeficiente intelectual (CI). “Se calcula que, a nivel poblacional, la exposición al plomo influye en la pérdida de hasta cinco puntos de CI”.

El cromo (Cr III) es cancerígeno por vía gastrointestinal, causando cáncer de pulmón, perforación del tabique nasal, asma y dermatitis por contacto. El Cr no se acumula en el

cuerpo y su vida media es de días, aunque puede permanecer más tiempo en el cabello y las uñas [23], la concentración máxima permisible es de 5 µg/g.

Con respecto al cobre (Cu), es un elemento traza, es decir, que el cuerpo humano requiere de su consumo para la ejecución de sus funciones vitales, sin embargo, un exceso de este trae consecuencias a la salud, entre las cuales están el daño al hígado y riñones, ocasiona estrés oxidativo el cual destruye la mitocondria y la membrana celular. Entre sus principales causas de acumulación se encuentra el consumir alimentos con valores altos de Cu, así como el uso de plaguicidas. Algunos de sus síntomas son convulsiones, colapso cardiovascular, cirrosis hepática y trastornos del movimiento. Existen tratamientos quelantes que solo requieren penicilamina y en algunos casos la hemodiálisis. El cadmio es poco abundante en la corteza terrestre, es un subproducto de la industria del zinc, en cuanto a su origen antropogénico, el cadmio proviene de operaciones metalúrgicas, de combustión y producción de hierro y acero, así como de producción de zinc, plomo y cobre.

El hombre está expuesto al Cd principalmente por el humo del tabaco, agua contaminada y alimentos diversos como vegetales, cereales y moluscos[31]. En un estudio en Suecia se reportó que de los pacientes que estaban en diálisis existió una mayor incidencia de personas que habían estado expuestas al Cd con respecto a las que no lo habían estado [32].

El Cd se acumula en riñones, hígado, vesícula y otros órganos, dejando el cuerpo vulnerable a edema pulmonar, cáncer de pulmón, dolor de vientre, daños a la estructura ósea, etc., la vida media del Cd es similar a la del Pb de aproximadamente 20 años. La concentración en un análisis de sangre como límite es de 5 µg/L.

El arsénico proviene de actividades de combustión y procesos de fundición; tiene un límite por norma establecido de 0.01 mg/L, la concentración puede ser aguda (exposición alta en breve tiempo) o crónica (baja concentración durante un tiempo largo), algunos de sus efectos son problemas gástricos, náuseas, alteraciones en el comportamiento y en la piel.

El mercurio es el único metal líquido, se encuentra en la naturaleza en tres formas como Hg elemental o metálico en estado de valencia cero, compuestos inorgánicos mercuriosos

con valencia 1+ y mercurícos con valencia 2+, y compuestos orgánicos. Entre los daños a la salud se le atribuyen depresión, irritabilidad, ansiedad, problemas en las articulaciones y daño renal entre otros, conforme se acumula mayor concentración de mercurio en el cuerpo las afectaciones se hacen crónicas, sus efectos son eretismo, temblor y estomatitis. El eretismo mercurial tiene en su sintomatología la irritabilidad, pérdida de la memoria e hiperactividad, otras alteraciones son las gastrointestinales como gastritis, náuseas, vómitos y dolor abdominal [23]. El límite semanal tolerable para una persona en cuanto a la ingesta del mercurio es de 96 µg por semana. En el examen de orina el límite máximo es de 50 mg/g.

La principal causa de emisiones de metales es la combustión de carbón en la industria eléctrica, calefacción, extracción minera; al estar el mercurio en el medio ambiente algunas bacterias lo transforman en metilmercurio, convirtiéndose en la principal vía para la ingesta de mercurio el consumir alimentos como el pescado y el marisco contaminado con metilmercurio, el que es un compuesto orgánico alojado en organismos acuáticos.

Es importante señalar que cualquier cantidad de Hg, Pb, y Cd en el organismo humano siempre representa toxicidad, ya que no son necesarios para realizar alguna función fisiológica del organismo. Un posible efecto a largo plazo por la acumulación de metales es la carcinogénesis, el Centro Internacional de investigaciones sobre el cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) estableció en el grupo 1, referido como Cancerígeno para humanos a varios metales pesados. Para determinar una exposición a los metales se emplean análisis de sangre y orina.

Derivado de la elevada concentración de metales en el ambiente, la toxicología de los mismos y la escasez de medidas terapéuticas para disminuir sus efectos sistémicos se requiere de técnicas que permitan un monitoreo de organismos con la finalidad llevar a cabo acciones encaminadas a la disminución de las concentraciones de estos elementos [31]. La selección de la técnica para la detección de metales depende de diferentes factores como lo son el tiempo de análisis, el costo, la exactitud y sensibilidad requerida.

2.4. Técnicas Espectroscópicas

Son técnicas basadas en la emisión o absorción de la radiación electromagnética por parte de la materia. Cada capa de electrones tiene un nivel de energía diferente, las más cercanas al núcleo son de menor energía. Un electrón al absorber determinada energía se transfiere a un nivel de mayor energía que corresponde exactamente a la energía absorbida. Al desexcitarse el electrón regresa a un nivel menos energético, emitiendo un fotón con las mismas características, siendo la configuración más estable la de menor energía. Cada nivel tiene subcapas designadas con las letras s (sharp), p (principal), d (difuso) y f (fundamental), cada una de ellas tiene forma diferente, la subcapa s tiene un único orbital esférico, las subcapas p tiene tres orbitales en forma de mancuerna, las subcapas d y f tienen formas complejas, la subcapa d tiene cinco orbitales mientras que la subcapa f tiene siete orbitales.

Los orbitales se llenan en orden creciente de energía, con dos electrones como máximo por orbital de acuerdo con el principio de construcción de Aufbau, considerando que un orbital es una función de probabilidad alrededor del núcleo, con respecto a lo anterior el principio de incertidumbre de Heisenberg refiere que nunca se sabe con precisión el lugar en el cual se encuentra el electrón.

2.4.1. Niveles de ionización

2.4.1.1. Energía de ionización

Es la energía requerida para arrancar un electrón de la capa o nivel energético más externo de un átomo neutro y gaseoso, ya que está débilmente retenido. La energía de ionización depende de la estructura electrónica del último nivel del átomo, el radio y la carga nuclear. La configuración electrónica del elemento brinda información respecto a la estabilidad del átomo.

La reacción se expresa:



Donde $A(g)$ es un átomo en estado gaseoso, E_i es la energía de ionización y e^- un electrón.

2.4.2. Espectroscopia de Absorción Atómica

Consiste en transformar una muestra en estado vapor y medir la radiación electromagnética absorbida por los átomos.

Durante la absorción atómica los átomos de un elemento en estado fundamental absorben energía radiante a una determinada longitud de onda. La cantidad absorbida aumenta de acuerdo con la cantidad de átomos del elemento analizado en el camino óptico. Se pueden analizar hasta 70 elementos en cantidades tan pequeñas como 10^{-14} g. La atomización se obtiene mediante una flama.

Los elementos principales de un sistema de Absorción Atómica son:

1. Una fuente de radiación que emita la línea espectral del elemento de interés.
2. Un sistema de atomización, que suministre energía suficiente para la disociación del analito y la formación de átomos libre
3. Un monocromador para aislar la línea espectral medida.
4. Un detector es un dispositivo que capta la señal óptica proveniente del monocromador, está acoplado con un sistema de registro de los datos obtenidos.

En la Figura 12 se presenta el esquema de los principales componentes de un espectrómetro de Absorción Atómica.

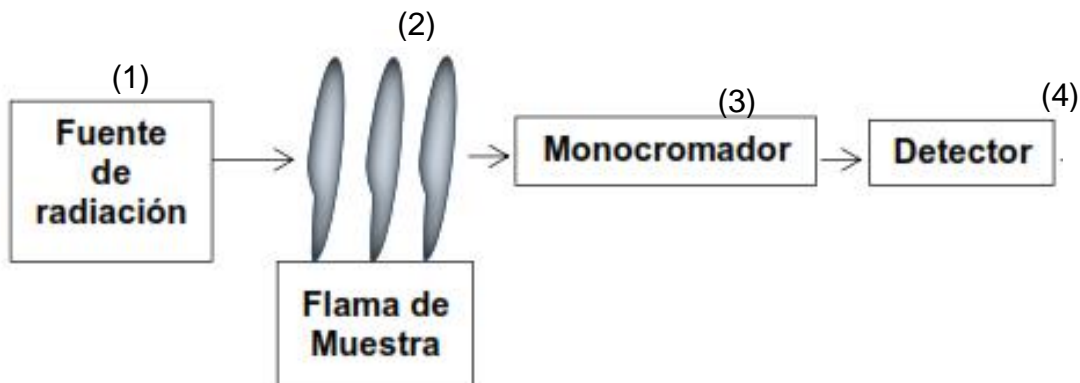


Figura 12. Principales componentes de un espectrómetro de Absorción Atómica.

La Absorción Atómica se puede realizar en cuatro variantes según los requerimientos y tipos de muestra:

1. Aspiración directa a la llama.
2. Dilución con un segundo disolvente orgánico
3. Retro-extracción.
4. Mineralización, cuando es necesaria la destrucción de la materia orgánica, se realiza por calcinación en seco, o por vía húmeda. La primera puede originar pérdidas por volatilización, por lo que se opta por la digestión por vía húmeda [33].

Para el análisis por Absorción Atómica de metales pesados en alimentos se debe cumplir la Norma Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009 [15], misma que establece los requisitos sanitarios para las áreas de captura de moluscos bivalvos así como las especificaciones sanitarias que deben cumplir dichos productos y los métodos de prueba.

La metodología abarca desde la preparación de la muestra para lo cual se deben lavar los moluscos bivalvos con agua potable retirando la arena y cualquier material extraño. Desconchar la carne con cuidado, sin lesionar el cuerpo del molusco. Colectar aproximadamente 150 g de carne sobre un tamiz del número 10 y dejar escurrir durante 5 minutos. Descartar las conchas, moler la carne en una mezcladora o licuadora hasta su homogenización.

Para la digestión por vía húmeda en la determinación de Cd, Cu, Fe, Pb y Zn, se pesa 0.1 mg de la muestra. Se añade 10 ml de ácido nítrico concentrado y se puede dejar reposar toda la noche o iniciar directamente la digestión, calentar suavemente en un matraz Kjeldhal, digerir la muestra 3 horas o más hasta la aparición del color traslúcido, enfriar, recuperar, filtrar y llevar a un volumen conocido en matraz volumétrico para posteriormente correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

2.4.2.1. Espectro de Absorción

Se presenta cuando un gas relativamente frío se coloca delante de una fuente luminosa, los átomos del gas más frío absorben los fotones, observándose mediante un

espectrómetro series de líneas oscuras correspondientes a la supresión de luz en determinadas frecuencias.

2.4.3. Láser

En 1960 fue construido el primer láser por Theodore Maiman, empleando como medio activo un cristal de rubí sintético.

En 1962 se llevó a cabo por Brench y Cross el primer plasma inducido por láser, más tarde en 1964 se empleó el láser para análisis de superficies, siendo éste el origen de la técnica de espectroscopia de plasma inducido por láser (LIBS). A partir de 1980 se han ido desarrollando nuevas aplicaciones para la técnica LIBS, desde la determinación composicional hasta ablación sobre diferentes tipos de muestra y en cualquier estado de agregación [34].

2.4.3.1. Tipos de láser y su radiación

El láser de Neodimio utilizado está compuesto por itrio y Aluminio, YAG por sus siglas en inglés (Ytrium Aluminum Garnet). Una de sus ventajas es que se obtienen pulsos cortos con alta potencia sin desgaste del medio activo, permite trabajar a altas frecuencias y densidades de energía.

Existen otras variantes como lo son:

Nd: YAG (NIR), es de estado sólido, el lente utilizado es dopado con un ion de neodimio. Su radiación es de 1,064 nanómetros.

Nd: YAG (GREEN), la radiación es de 532 nanómetros.

Nd: YAG (UV) su radiación es de 266 nanómetros.

2.4.3.2. Láser

El láser emite luz monocromática de baja divergencia, está compuesto por un medio activo, una cavidad resonante, dos espejos y una fuente de bombeo que puede ser una lámpara de xenón.

El medio activo es una barra de cristal dopado, puede ser de Nd:YAG, tiene una cavidad resonante, la cual está formada por dos espejos, uno de ellos muy reflectante mientras el otro lo es solo parcialmente, siendo este último el espejo la salida del haz láser. En la Figura 13 se ilustran los componentes básicos de un láser.

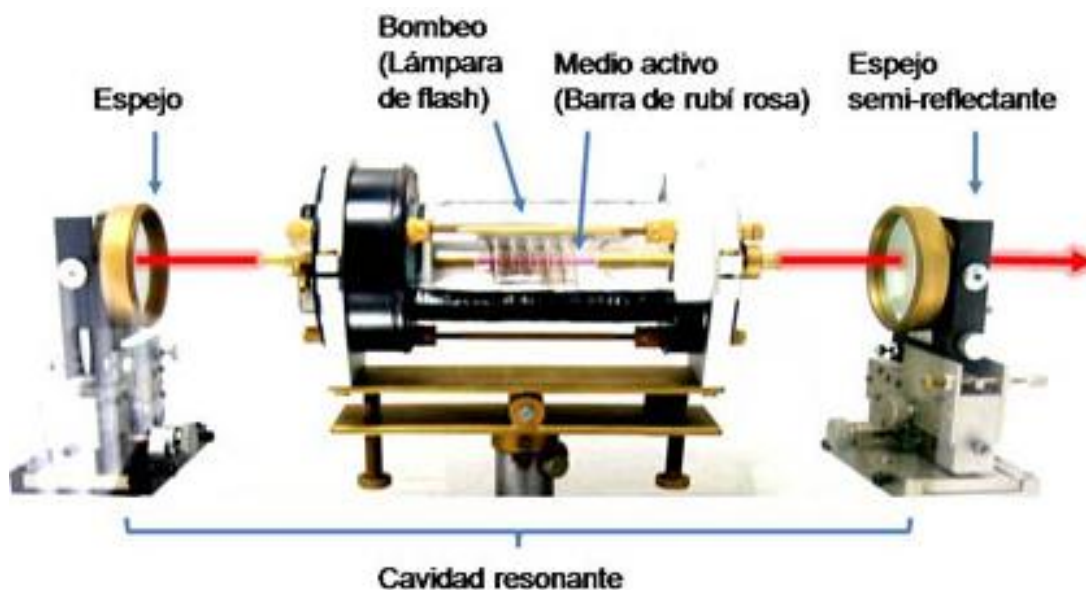


Figura 13. Componentes de un láser³.

Al incidir una onda electromagnética con cierta frecuencia en la cavidad láser los fotones son reflejados por sus dos espejos emitiendo otros fotones de iguales características al fotón incidente, esto es una emisión inducida, en la cual los electrones son transferidos de un nivel más bajo de energía a uno más alto. Si esto ocurre al punto de que la población del nivel energético más elevado es mayor que la población del nivel base, se presenta el fenómeno llamado inversión de población y la luz láser es expulsada de la cavidad láser a través del espejo que tiene una menor reflexión.

2.4.3.3. Régimen Q: switch

El Q: switch es un obturador óptico, que consiste en un cristal que se introduce en la cavidad del láser entre el medio activo y el espejo que es totalmente reflejante cuya

³ <https://clpu.es/divulgacion/bits/como-funciona-un-laser>

transmitancia cambia eléctricamente permitiendo el paso de la radiación sin perturbación alguna o evitándola. Al activarse el Q: switch el cristal se vuelve transparente permitiendo que los fotones lleguen al espejo reflejante e inicien su recorrido.

Un haz láser puede constar de unos cuantos nanosegundos, debido a que la inversión de la población tiene una corta duración. Cuando el Q: switch se desactiva se evita un nuevo pulso.

2.4.3.4. Espectros de emisión

Un espectro es la emisión de la radiación de una partícula, es la huella dactilar de un elemento que identifica los átomos presentes en la muestra. Los espectros de emisión de átomos en fase gaseosa producen líneas de emisión dentro del espectro visible en longitudes de onda determinadas.

La emisión de la radiación de un átomo energizado es debido al decaimiento de un electrón de una órbita de mayor energía a una de menor energía, la radiación se emite mediante un cuanto de energía en forma de luz llamado fotón, el cual se emitirá con una frecuencia única proporcional a la diferencia de energía el electrón antes y después de la transición.

Los fotones son partículas de luz que poseen una energía E , definida por la fórmula de la energía del fotón:

$$E = h\nu \tag{2}$$

Donde ν es la frecuencia de luz y h es la constante de Planck[27].

El estado excitado se representa por el número cuántico principal inicial n_i y el estado final por el número n_f , el estado final puede ser otro estado excitado o el estado basal, el

número cuántico principal puede tomar valores de 1 al 7. La diferencia de energía entre ambos estados o niveles está dada por la ecuación de Rydberg.

$$\Delta E = h\nu = R \left(\frac{1}{n_i^2} - \frac{1}{n_f^2} \right) \text{ para } n_i < n_f \quad (3)$$

Donde R es la constante de Rydberg igual a $1.09 \times 10^7 \text{ m}^{-1}$.

Mediante un espectrómetro, el fotón emitido se verá como una sola línea brillante a una cierta longitud de onda, al ser varios electrones que se transfieren a diferentes niveles de excitación cuando se desexcitan emiten fotones de diferentes longitudes de onda agregándose más líneas al espectrómetro, formando un espectro atómico.

Las intensidades en las bandas del espectro de una mezcla son proporcionales a las concentraciones de los componentes individuales.

2.4.3.5. Espectro Continuo

Es el espectro emitido por sólidos, líquidos o gases densos a muy altas temperaturas, sus electrones están libres y no en órbitas, que al chocar emiten luz en cualquier frecuencia, mezclándose todas las longitudes de onda entre sí de forma continua.

2.4.4. Espectroscopia de Plasma Inducido por Láser (LIBS)

La Espectroscopia de Plasma Inducido por Láser (Láser Induced Breakdown Spectroscopy, LIBS por sus siglas en inglés) es una técnica de espectroscopia de emisión atómica que consiste en la generación de un plasma mediante un pulso láser de corta duración y de alta energía, el cual se hace incidir sobre la superficie de una muestra ablacionando una pequeña porción de la misma, el material ablacionado se disocia (breaks down) en iones y átomos excitados. Una vez enfriado el plasma lo suficiente como para reducir el ruido luminoso de fondo se aprecia un espectro de emisión, el cual está compuesto por las líneas de emisión de las especies moleculares y atómicas de los elementos presentes en la porción ablacionada de la muestra [35], para una mejor

percepción de las líneas de emisión es importante la elección de un correcto tiempo de retardo entre la formación del plasma y la adquisición de la señal.

Los elementos son inducidos a emitir luz al recibir energía por una temperatura muy elevada o una descarga eléctrica, dicha luz es única para cada átomo o ión, esta radiación emitida es un espectro único para cada elemento [34].

Las ventajas de LIBS con respecto a otras técnicas de análisis elemental es que requiere una preparación mínima o nula de la muestra, la técnica puede analizar cualquier muestra independientemente de su estado de agregación, es decir que las muestras pueden estar en estado líquido, sólido o gaseoso, convirtiéndola en una alternativa a los métodos que implican un proceso químico en la preparación de las muestras. LIBS ha sido empleada para determinar rápidamente composiciones elementales para diferentes tipos de muestra [36].

Otro aspecto de igual relevancia es que LIBS es que se pueda obtener información del espectro de la muestra *in situ* y en tiempo real, haciendo posible un análisis para trabajo de campo aún en lugares de difícil acceso o alejados de un laboratorio químico.

2.4.4.1 Plasma inducido por láser

El plasma es una mezcla local de electrones libres, iones y átomos, es un conjunto eléctricamente neutro. Se le ha llamado al plasma el cuarto estado de la materia porque equivale a un estado de mayor energía.

El primer paso para la formación del plasma es la vaporización de la superficie de la muestra o material a analizar, dicha vaporización es posible cuando la energía del láser aplicada al blanco es mayor al valor umbral de fluencia, es decir mayor al calor latente de vaporización, durante esta fase el calor provoca un movimiento de choque en los átomos desprendiendo a los electrones y dando lugar a la ionización de los átomos y la generación de electrones libres. La temperatura del plasma puede variar de 5000 a 20000 K.

Durante la evolución del plasma, se presentan tres situaciones, al inicio existe una ruptura de enlaces, luego se expande y por último se enfría. Así también se logra una ablación láser, esto es que se producen partículas, ya sea que provengan del blanco o de la condensación [36].

Otro aspecto relevante en la formación del plasma es la fluencia Láser, la cual es la energía aplicada al material o muestra por unidad de área dada en joules/área, de igual forma se considera en un análisis por LIBS la densidad de potencia, que es inversamente proporcional al tamaño del spot.

2.4.4.2. Interacción con la materia

La interacción de un electrón en un medio es considerada como una colisión y consiste en una transferencia de energía a la materia. Esto ocurre por la radiación ionizante sobre una materia, la cual es una colisión radiactiva, en ella el electrón incidente pasa cerca de los electrones que están en la corteza de los átomos de la materia, esto provoca una repulsión entre las cargas del mismo signo, produciéndose un cambio en la dirección y una disminución en la velocidad y en consecuencia una pérdida de energía la cual se emite en forma de radiación electromagnética la cual es llamada radiación de frenado o bremsstrahlung.

2.4.4.3. Tiempos de detección

En el proceso de interacción láser-materia la densidad electrónica y la temperatura del plasma son elevadas, se presenta en el espectro una emisión continua, es decir una luz intensa, por la recombinación y el bremsstrahlung de las interacciones ión-electrón, en dicha emisión continua las líneas espectrales de átomos e iones están superpuestas, efecto que implica una dificultad en la detección de elementos presentes en la muestra.

De aquí la importancia de identificar el mejor tiempo de retardo y el período de tiempo que la luz es detectada, es decir, la integración de la señal, esto con la finalidad de obtener una mejora en la emisión de la señal láser respecto al fondo.

Generalmente estos tiempos se definen entre 1 y 3 μs y entre 1 y 10 μs respectivamente. El tiempo de integración óptimo varía con respecto a la matriz de la muestra, motivo por el cual debe ser analizado para cada caso específico [37].

2.4.4.4. Instalación LIBS

LIBS mediante un láser pulsado y un lente de enfoque genera un plasma de una pequeña parte de la muestra permitiendo una caracterización multielemental de los componentes en un mismo tiempo.

Un sistema LIBS consta de un sistema óptico mediante el cual se enfoca la radiación del láser sobre una parte de la muestra, excitando los átomos para emitir luz, un sistema óptico que colecta la radiación emitida por el plasma sobre la rendija de entrada de un espectrómetro, donde la luz es difractada y separada en las diferentes longitudes de onda que la componen, un detector que convierte los fotones emitidos en una señal eléctrica y un sistema de hardware y software que permite el análisis de la señal [36].

Los componentes de un sistema LIBS se enlistan a continuación:

- Fuente de excitación: Láser Nd: YAG (NIR) de estado sólido, dopado con un ion de neodimio
- Sistemas colectores:
 - Sistema de lentes: la luz emitida por el plasma es guiada o focalizada por los lentes.
 - Fibra óptica: es el medio que colecta la señal y la transmite hacia el espectrómetro, permite hacer un análisis a distancias tanto cortas como largas, en laboratorio y en campo.
- Espectrómetro: es el sistema de detección del láser. Puede ser acoplado a un dispositivo de carga lineal CCD por sus siglas en inglés (Charge Coupled Device), o intensificada ICCD, que brinda una mayor resolución y sensibilidad. Separa los componentes de la luz del plasma.
- Generador de retardo es un dispositivo que controla el tiempo a partir del cual se inicia la integración de la señal del plasma, disminuyendo la captura del fondo electrónico producido al inicio de la formación del plasma.
- Sistema de hardware y software Ocean View para el análisis de datos.

En la Figura 14 se muestra un esquema de los componentes principales de una instalación experimental LIBS.

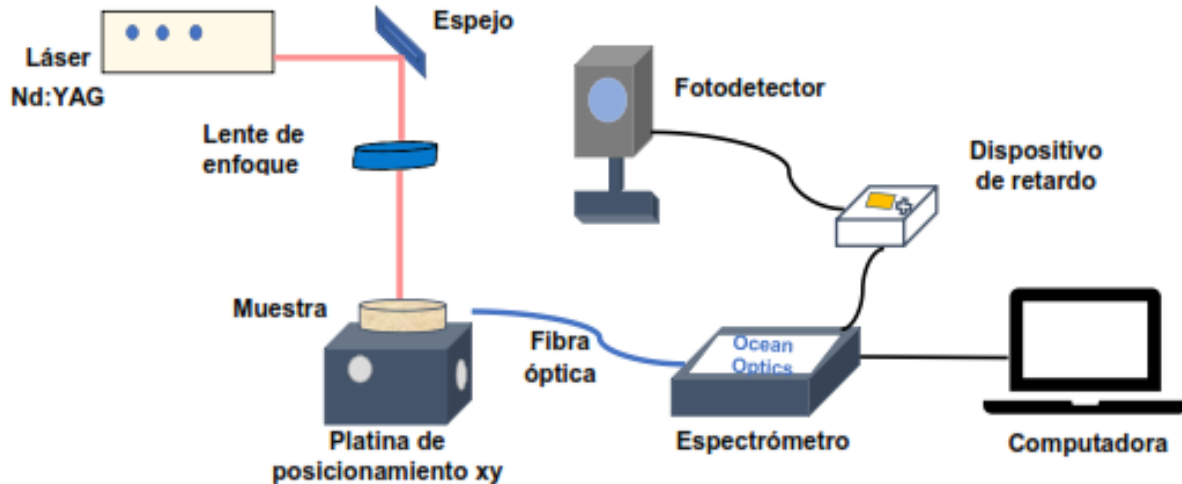


Figura 14. Diagrama de instalación experimental LIBS

2.4.4.5. Condiciones de trabajo a considerar en la aplicación de la técnica LIBS

Propiedades del material (absorción, rugosidad superficial, estabilidad mecánica).

Parámetros del láser:

- Ancho de pulso (pueden ser nanosegundos o femtosegundos)
- Energía de pulso varía entre 50 y 500 mJ
- Distancia focal, es la distancia entre el punto de focalización y la superficie de la muestra.
- Longitud de onda
- Densidad de energía o fluencia del láser: J/cm^2

$$\delta_E = \frac{E}{A} \quad (4)$$

Donde E es la energía del láser dada en J y A es el área del spot en cm²

- Densidad de potencia: W/cm² o fotones/cm²

$$\delta_P = \frac{\text{Potencia del pulso}}{A} \quad (5)$$

$$\text{Potencia del pulso} = \frac{E}{t} \quad (6)$$

Donde E es la energía y t es el tiempo

2.4.4.6 Consideraciones en análisis de muestras biológicas

Se debe considerar las propiedades del material empleado como muestra, ya que los materiales tienen diferentes propiedades de absorción, rugosidad superficial, estabilidad mecánica, etc.

Al tratarse de una muestra biológica, la muestra no presenta conductividad térmica, el calor absorbido es conducido hacia afuera de forma menos rápida que una muestra con alta conductividad, implicando esto una cantidad mayor de material vaporizado.

2.4.4.7. Ventajas y desventajas de la técnica LIBS

En la Tabla 8 se enlistan algunas de las ventajas y desventajas de la técnica LIBS[38] como una técnica analítica.

Tabla 8. Ventajas y desventajas de la aplicación de la técnica LIBS

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> - Contacto mínimo con la muestra - Pueden ser superficies y muestras frágiles - Preparación de la muestra nula o mínima. - Análisis multielemental de forma simultánea. - Equipo portátil. - Fácil automatización. - Capacidad de análisis en ambiente y temperatura. 	<ul style="list-style-type: none"> - Efectos de interferencia (efecto matriz, mismo que se forma por la alta densidad de material que existe en el plasma) - Solapamiento - Autoabsorción de las líneas de emisión.

2.4.4.8. Interferencias en LIBS

Se pueden presentar tres casos de interferencias en la aplicación de la técnica LIBS, entre ellos se encuentra: la autoabsorción, el solapamiento espectral y el efecto matriz.

- 1) Autoabsorción se presenta cuando una línea espectral de emisión de cierta especie en una determinada longitud de onda es absorbida por el plasma debido a que hay un elemento en esa muestra que puede absorber esa longitud de onda.

- 2) El solapamiento espectral se da cuando diferentes especies en el plasma pueden emitir en la misma longitud de onda o una muy próxima. En caso de que el monocromador no tenga una alta resolución no es posible separar la longitud de onda, por lo que no sera posible distinguir si es el elemento A o B.

- 3) El efecto matriz es el efecto de todos los componentes de la muestra distintos al analito en la medida de una cantidad está influenciado por el entorno que rodea a los átomos en estado fundamental que se presende analizar.

2.5. Curvas de calibración

Una curva de calibración es la representación gráfica de una señal que se mide en función de la concentración de un analito [39].

Mediante un modelo de mínimos cuadrados se estiman los parámetros para determinar la linealidad de la curva, lo cual muestra la capacidad de un método analítico para obtener resultados proporcionales a la concentración de un elemento o compuesto en una muestra, en intervalo determinado. Se realiza una comparación de una propiedad del analito con la del estándar de concentración conocida del mismo analito, se llevan a cabo determinados métodos de acuerdo con el analito que se desee analizar.

En el ajuste por mínimos cuadrados la recta se define por una ordenada al origen (b) y la pendiente (m), mediante la ecuación de la recta:

$$y = mx + b \quad (7)$$

Cada punto definido de la variable “ x ” por lo regular se refiere a la concentración del analito, y la variable “ y ” refiere la respuesta instrumental.

Se determinan los valores de la ordenada al origen, la pendiente y el coeficiente de determinación (R^2), para analizar el ajuste de los puntos experimentales al modelo matemático utilizado.

El método de los mínimos cuadrados es el más utilizado para determinar los parámetros de la curva de calibrado, el objetivo es que la suma de los cuadrados de las distancias verticales entre cada punto experimental y la recta de calibrado sea mínima o tienda a cero[40].

Las expresiones matemáticas empleadas para la determinación de los parámetros son:

Pendiente:

$$m = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} \quad (8)$$

Donde x es la variable independiente, y es la variable dependiente, m es la pendiente y n es el número total de puntos de los datos.

Intercepto (Ordenada al origen)

$$b = \sum y - m \sum x \quad (9)$$

Donde m es la pendiente y b el punto de intersección.

Coefficiente de determinación

$$R^2 = \frac{(n \sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{(n \sum x^2 - (\sum x)^2)(n \sum y^2 - (\sum y)^2)} \quad (10)$$

2.5. Método de adición estándar

Consiste en añadir una cantidad conocida de analito a una muestra de la cual se desconoce su concentración [41], se adicionan diferentes volúmenes de una disolución patrón a varias alícuotas de la muestra que tengan igual tamaño [42].

En la Figura 15 se observa una gráfica de calibración para el método de adición estándar. La concentración de la muestra incógnita se calcula mediante la ecuación de la recta o por extrapolación en la gráfica.

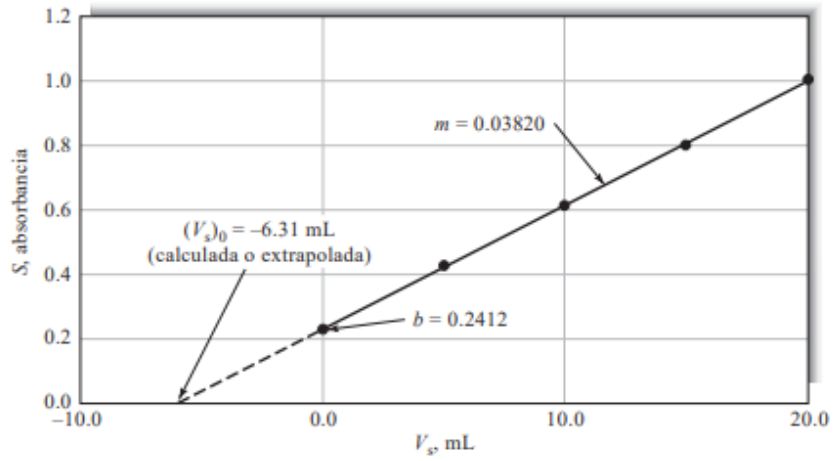


Figura 15. Gráfica de calibración por el método de adición estándar ⁴

⁴ D. Skoog, F. Holler, and T. Nieman, "Principios de análisis instrumental. Ed," 2001.

Capítulo 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En la Figura 16 se presenta el diseño metodológico del presente proyecto de investigación en un diagrama de bloques.

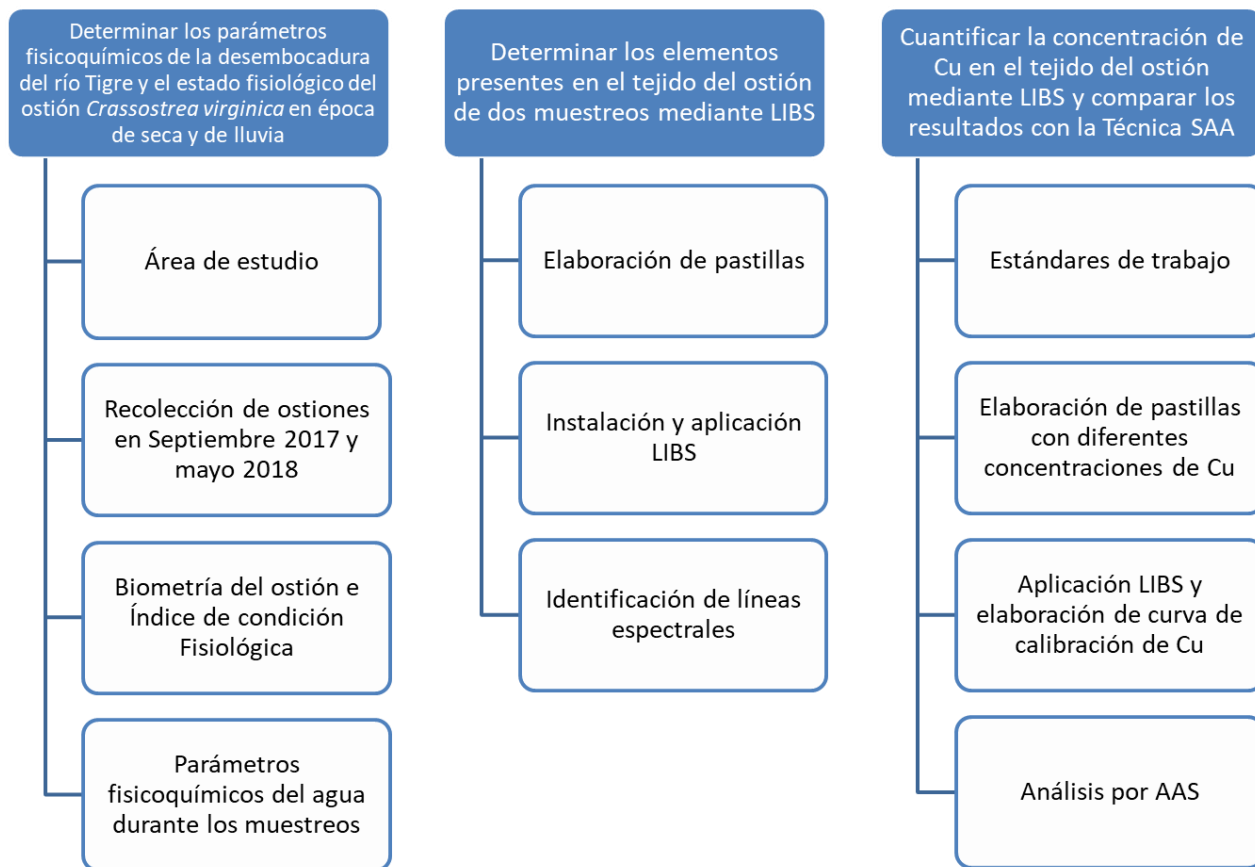


Figura 16. Diagrama del diseño metodológico.

3.1. Determinación de los parámetros fisicoquímicos de la desembocadura del río Tigre y el estado fisiológico del ostión *Crassostrea virginica* en época seca y de lluvia.

El sitio de muestreo seleccionado fue el banco natural de ostión que se encuentra en la desembocadura del río Tigre ubicado en Aldama, Tamaulipas, debido a sus características físicas se trata de un área expuesta a cambios en la profundidad, ya sea por las lluvias o mareas bajas; y es el área reportada con mayor concentración de metales en otros estudios [43] [44].

En la Figura 17 se muestra una imagen del sitio de recolección del ostión *Crassostrea virginica* el cual se encuentra en la posición geográfica 22°42'50.82"N y 97°51'44.79"O.



Figura 17. Localización del sitio de recolección del ostión *Crassostrea virginica* en la Laguna de San Andrés, Aldama, Tamaulipas.

3.1.2. Medición de los parámetros físico – químicos del agua del sitio de muestreo.

Para la determinación de las condiciones físicas y químicas en las que crece el ostión, se realizaron mediciones de temperatura y salinidad durante las recolecciones, empleando una sonda multiparámetros marca Hydrolab DS5 mostrada en la Figura 18.



Figura 18. Sonda Hydrolab DS5.

3.2. Recolección de ostión en septiembre de 2017 y mayo de 2018.

La recolección del ostión *C. virginica* de septiembre 2017 y mayo de 2018 se realizó de forma manual, se recolectaron 30 ostiones de diferentes tamaños, los organismos seleccionados se colocaron en una hielera para su transportación al laboratorio de CICATA Altamira. En la Figura 19 se observa una imagen de la recolección de las muestras en época de seca en mayo de 2018, el nivel del agua de la laguna es de 70 cm aproximadamente.



Figura 19. Recolecta de ostión *C. virginica* en la desembocadura del Río Tigre.

En la Figura 20 se muestra una imagen de la forma en la que se lavaron los ostiones, para ello se utiliza un cepillo de plástico lo cual permite eliminar los epibiontes que trae el ostión sobre su concha.



Figura 20. Lavado de ostión.

3.3. Biometría del ostión

Se realizaron mediciones del ancho, largo y longitud de la valva húmeda de 30 ostiones con un vernier digital de la marca Mitutoyo para conocer las variaciones de la talla de los ostiones empleados como muestras, así como para comprobar que todos los ostiones utilizados cumplen con la talla mínima establecida para su extracción, la cual es de 70 mm [15]. En la

Figura 21 se muestra un esquema de la forma de medir la valva del ostión.

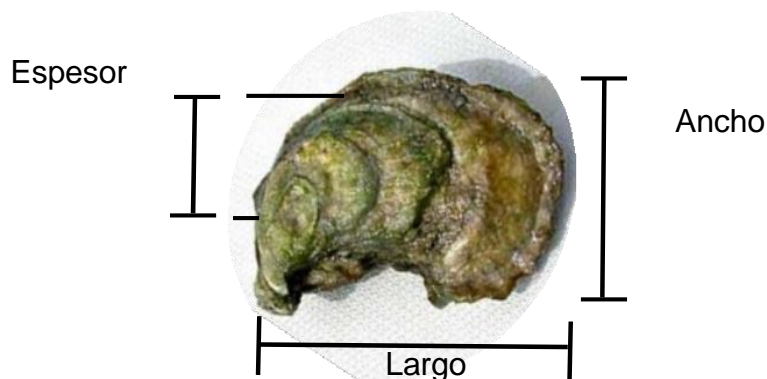


Figura 21. Mediciones de la valva del ostión.

3.3.1. Extracción y secado del tejido

Después del lavado los ostiones se abrieron con una espátula y una vez desconchado el ostión, se extrajo el tejido blando y se colocó en recipientes de vidrio, después se colocaron en una mufla a 100 ° C durante 24 horas con el objetivo de eliminar el agua presente en el tejido del ostión [45].

3.3.2. Índice de Condición Fisiológica (ICF)

Se calculó el Índice de Condición Fisiológica con el objetivo de conocer la salud fisiológica del ostión empleado como muestra. Se pesó de forma individual el tejido seco y la valva seca de 30 ostiones, con una balanza granataria marca Scout Pro (precisión 0.1 g) y se obtuvo el ICF mediante la métrica propuesta por Chávez-Villalba et al.[21]

$$ICF = \frac{P_1 \times 1000}{P_2} \quad (11)$$

Donde P_1 es el peso seco del tejido (g) y P_2 es el peso seco de la concha (g).

3.4. Aplicación de la técnica LIBS para el análisis del tejido del ostión

Se realizó la identificación multielemental del ostión mediante la aplicación de la Técnica LIBS en cada muestreo para lo cual se elaboró una pastilla de 1 g del tejido seco del ostión, lo que equivale aproximadamente a cinco ostiones.

3.4.1. Instalación experimental LIBS

Para identificar los metales pesados en el ostión por LIBS se empleó un equipo láser Nd:YAG de longitud de onda de 1064 nm.

La instalación experimental LIBS cuenta con los componentes descritos a continuación:

- Láser Q-smart 450 by Quantel de 1064 nm
- Fotodetector ThorLabs PDA10A.
- Espejo ThorLabs NB1-K14.

- Fibra óptica P600-1-SR Ocean Optics.
- Espectrómetro Ocean Optics USB4000 UV/NIR con rango espectral de 200 a 900 nm y resolución óptica de 0.35 nm.
- Sistema de hardware y software Ocean View para el análisis de datos.

Se emplearon los siguientes parámetros:

- Lente de 50 mm de distancia focal.
- Distancia entre la lente y la superficie de la muestra 50 mm
- Área del spot en la muestra 0.2 cm²
- Fluencia o densidad de energía 2.25 J/cm² (0.45 J / 0.2 cm²)

Se hizo un análisis LIBS de una muestra del ostión con diferentes frecuencias para determinar la frecuencia en la cual se obtenía el menor fondo en el espectro, en la Figura 22 se muestra el espectro promedio LIBS de un total de 50 espectros de la pastilla de Cu con concentración de 2 ppm con diferentes frecuencias de 1, 2, 4, 10 y 20 Hz. Las señales con menor fondo fueron las de las frecuencias de 1, 2 y 4 Hz, esto es porque conforme es mayor la frecuencia del pulso existe un mayor fondo continuo proveniente de la colisión de los electrones. Así también se visualiza la variación de las intensidades de las diferentes frecuencias, se aprecia una mayor intensidad en las líneas de mayor frecuencia resultado de la excitación adicional que los pulsos producen en el vapor del material eyectado en los primeros pulsos.

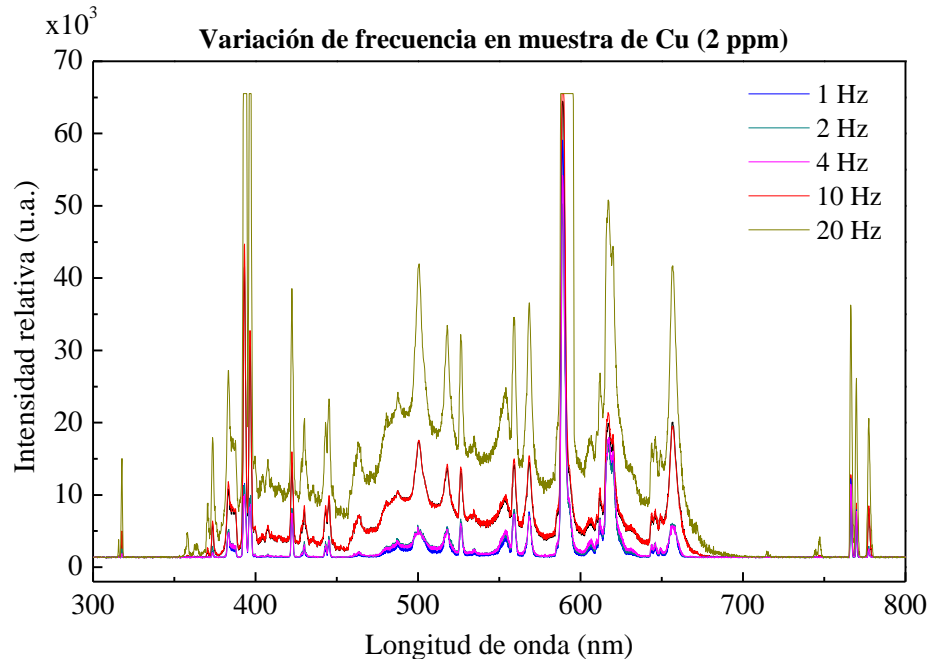


Figura 22. Espectro LIBS del tejido del ostión con diferentes frecuencias de disparo.

Se seleccionó la frecuencia de 4 Hz para la realización de las mediciones LIBS, debido a que es la frecuencia a la cual se obtienen los espectros con menos fondo electrónico.

3.4.2. Metodología de la aplicación de la técnica LIBS para análisis del tejido del ostión

Se caracterizó la pastilla del ostión recolectado en septiembre del 2017 (PS17) y a pastilla del mes de mayo del 2018 (PS18), se analizó una pastilla del tejido del ostión de cada muestreo aplicando el láser en distintos puntos de forma aleatoria, se realizaron tres series de 50 disparos de forma continua con una frecuencia de 4 Hz, obteniéndose 150 espectros por muestra, de los cuales se obtuvo un espectro promedio.

Se realizó una calibración para una correcta identificación de las líneas presentes en el espectro, para lo cual se consideraron las líneas características del Na tanto en el espectro LIBS como en la base de datos NIST. Se identificaron las líneas espectrales de los elementos presentes en el tejido del ostión, al igual que las intensidades de las principales líneas características de cada elemento tomando como referencia las intensidades de las líneas espectrales de la base de datos NIST [46].

Se obtuvo el espectro diferencia restando las intensidades obtenidas en el espectro LIBS de la muestra recolectada en mayo menos las intensidades del espectro obtenido de la muestra recolectada en septiembre.

3.5. Elaboración de pastillas del ostión *Crassostrea virginica*

En la Figura 23 se muestra el proceso realizado para la obtención de una pastilla del tejido del ostión consta de varias etapas que inician con el secado del tejido del ostión, continuando con una pulverización que se lleva a cabo con un mortero de vidrio, después se tamiza y se coloca un 1 g en un molde cilíndrico para prensarlo y obtener pastillas de 18 y 3 mm de diámetro y espesor respectivamente.

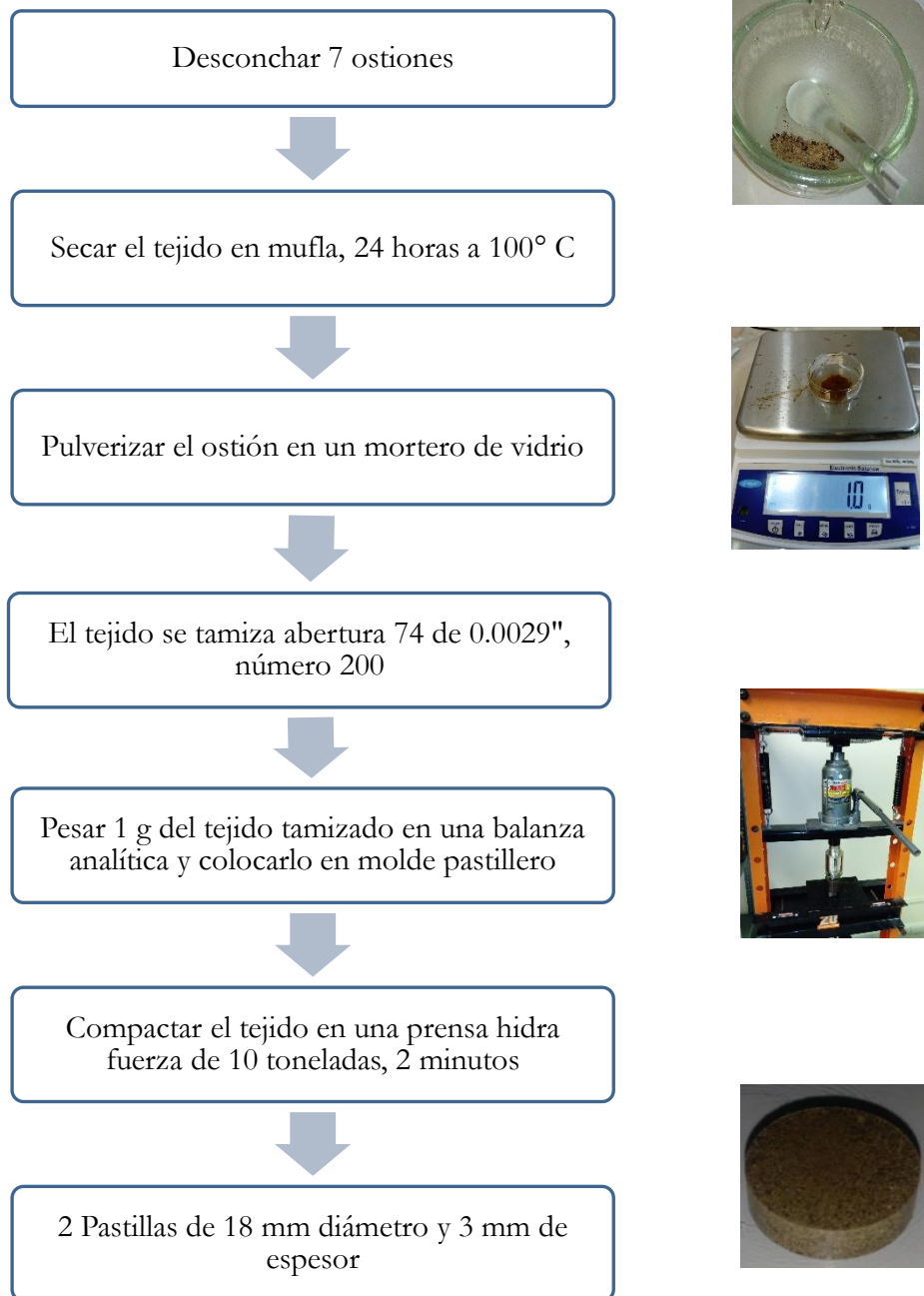


Figura 23. Proceso de elaboración de pastilla del tejido del ostión *Crassostrea virginica*

3.6. Análisis LIBS del tejido del ostión con diferentes concentraciones de Cu.

3.6.1. Método de adición estándar

Se realizaron seis estándares de trabajo con diferentes concentraciones de Cu para la elaboración de la curva de calibración. En la elaboración de la solución madre y las disoluciones se utilizó Nitrato Cúprico $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, Baker Analyzed A. C. S. Reagent Pm 232.590S.

a) Solución madre de Cu

Se preparó una solución madre de 50 ml con una concentración de 100 $\mu\text{g/g}$ de Cu, misma que se obtuvo a partir de 14.8 g de Nitrato Cúprico $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ aforado a 50 ml con agua desionizada.

b) Estándares de trabajo

Se realizaron seis estándares de trabajo (pastillas de 1 g de tejido de ostión seco), incluyendo el blanco a partir de la disolución madre de Cu.

Para la construcción de los estándares de trabajo se tomaron 1, 5, 10, 25 y 50 ml de la solución madre de Cu, y se aforaron a 50 mL con agua desionizada. Se aplica con una micropipeta 1 ml de diferente concentración a cada estándar de trabajo.

Las diferentes concentraciones forman parte del intervalo en el cual se cuantificará el analito, las concentraciones corresponden a 2, 10, 20, 50 y 100 $\mu\text{g/g}$ de Cu. Cada disolución y cada estándar de trabajo está conformado de la siguiente manera, tal como se expone en la Tabla 9 y Tabla 10.

Tabla 9. Concentración de Cu en disoluciones

Disolución	Concentración (ppm)	Volumen Sol madre (ml)	Volumen Agua (ml)
1	2	1	49
2	10	5	45
3	20	10	40
4	50	25	25
5	100	50	0

Tabla 10. Identificación de muestras con diferente concentración Cu

Muestra (pastillas)	Nombre	Concentración Cu en cada pastilla (ppm)
1	Blanco	Blanco
2	Cu2	2
3	Cu10	10
4	Cu20	20
5	Cu50	50
6	Cu100	100

3.6.1. Elaboración de seis pastillas del ostión *Crassostrea virginica* con diferentes concentraciones de Cu.

En la Figura 24 se identifican los pasos del diagrama del proceso para la elaboración de las pastillas del tejido del ostión con diferentes concentraciones de Cu.

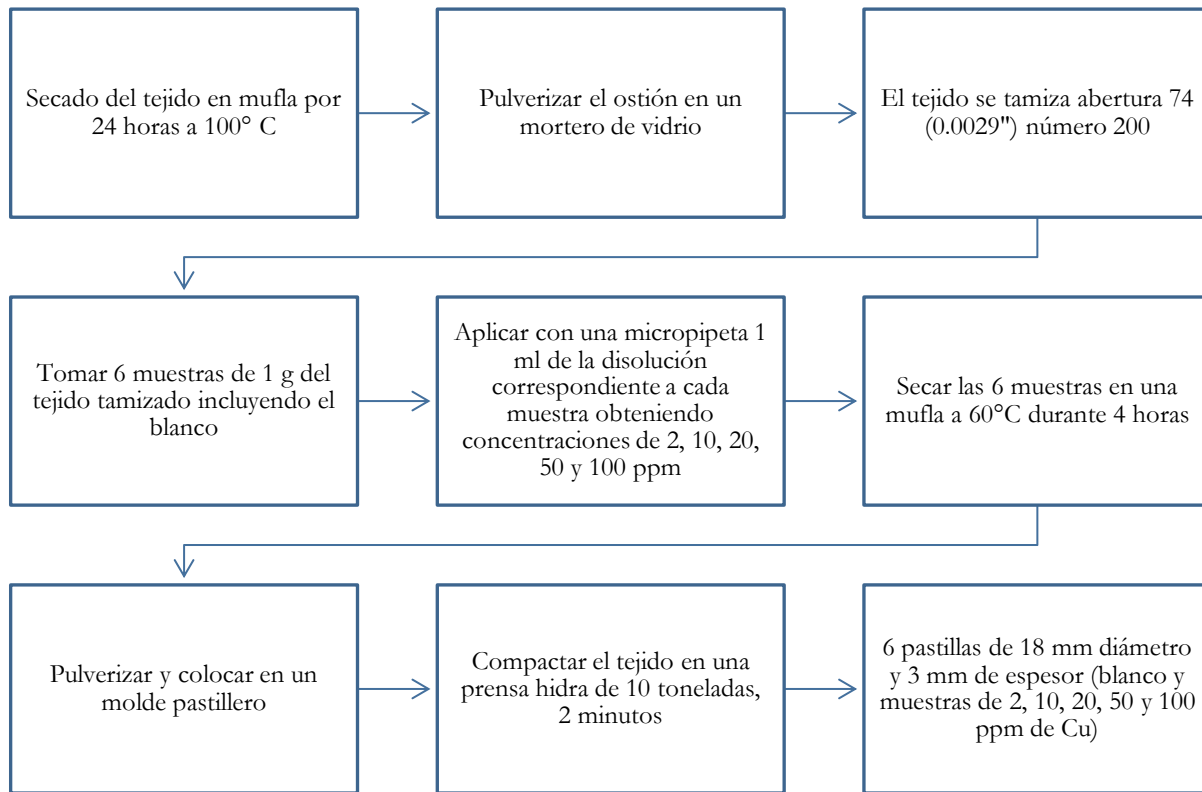


Figura 24. Proceso de elaboración de pastillas del tejido del ostión *Crassostrea virginica* con diferentes concentraciones de Cu.

3.6.2. Análisis LIBS del tejido del ostión con diferente concentración de Cu.

Se analizaron las seis muestras del tejido del ostión de diferente concentración de Cu incluyendo el blanco aplicando el láser en distintos puntos de forma aleatoria efectuando tres series de 50 disparos de forma continua con una frecuencia de 4 Hz, obteniendo un espectro promedio de los 150 espectros obtenidos para cada una de las muestras del tejido del ostión con concentraciones del analito de 2, 10, 20, 50 y 100 ppm, así como del blanco, el cual es una pastilla a la que no se añadió el analito. Se obtuvieron 150 espectros de un patrón de Cu mediante el mismo proceso de 3 series de 50 pulsos láser.

Así también se corroboraron las líneas del Cu en la base de datos del NIST, en la Figura 25 se presenta el espectro de la base de datos NIST del Cu para las líneas características 324.7 y 327.4 nm. En la se presenta el espectro de las líneas 510.6, 515.3 y 521.8 nm.

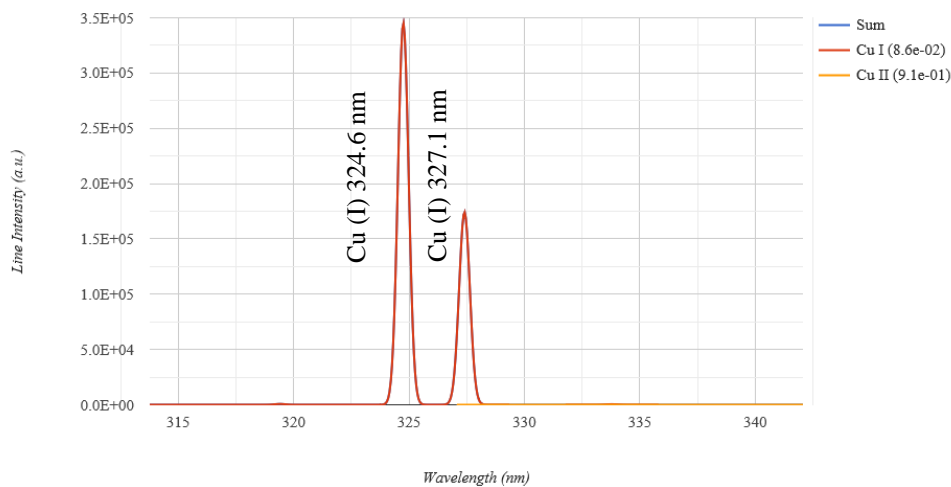


Figura 25. Espectro de Cobre (I) de la base de datos NIST.

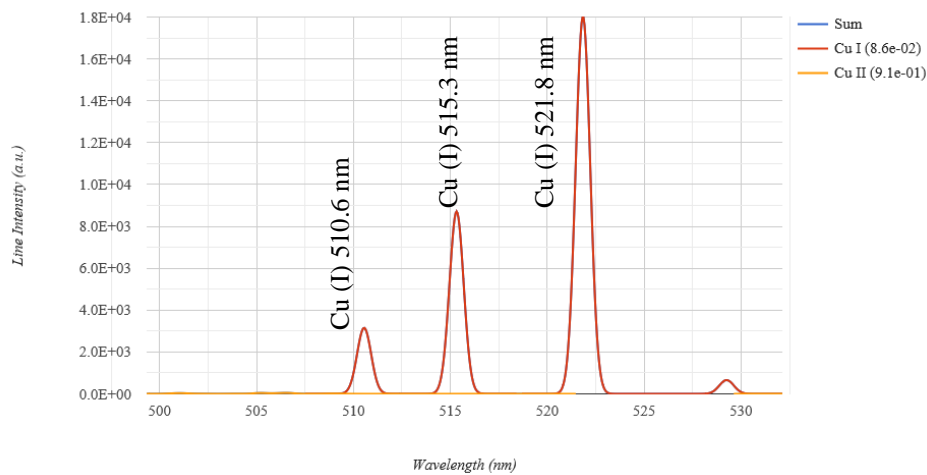


Figura 26. Espectro de Cu (I) de la base de datos NIST.

Se analizaron diferentes líneas características del Cu, para lo cual se obtuvo la media de las intensidades obtenidas de 150 disparos láser para cada estándar de trabajo de la longitud de onda específica.

Cada punto de la curva de calibración representa la media de las intensidades obtenidas del analito en cada uno de los estándares de trabajo, con la finalidad de relacionar la concentración con la intensidad de la señal emitida de LIBS. Se realizó una extrapolación para identificar la concentración de Cu presente en el blanco.

Se efectuaron curvas de calibración para las relaciones de intensidades entre líneas del Cu con respecto al Na para identificar la correlación que existe al incrementar solo la concentración del Cu.

Se determinó la concentración de Cu presente en el blanco mediante la ecuación de la recta obtenida por el método de mínimos cuadrados y por extrapolación de la recta.

3.7. Análisis por Espectroscopia de Absorción Atómica

Se analizó el tejido del ostión empleado como blanco por la técnica de Espectroscopia de Absorción Atómica bajo el método de análisis IPN AA-06-00 en el Laboratorio de Análisis y Monitoreo Ambiental del Centro Interdisciplinario de Investigaciones y Estudios sobre Medio Ambiente y Desarrollo CIIEMAD – IPN.

Capítulo 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Determinación de los parámetros físico – químicos de la desembocadura del río Tigre y el estado fisiológico del ostión *Crassostrea virginica* en septiembre 2017 (época de lluvia) y mayo 2018 (época de seca).

4.1.1. Parámetros físico – químicos de la desembocadura del río Tigre registrados en los muestreos de septiembre de 2017 y mayo de 2018.

Se obtuvo el promedio de 20 mediciones de los parámetros físicos – químicos de la desembocadura del Río Tigre durante los muestreos realizados en septiembre de 2017 y mayo de 2018, las medias obtenidas de los parámetros se especifican en la Tabla 11.

Tabla 11. Parámetros físicos – químicos del sitio de muestreo

Parámetro	Septiembre 2017	Mayo 2018
Temperatura ° C	31.5	30.6
Salinidad	14	35

Los resultados obtenidos corresponden a la temperatura y salinidad de un ambiente idóneo para el crecimiento del molusco [19] .

La temperatura en los estuarios fluctúa de 20 a 30 ° C durante todo el día, la hora en la cual se llevaron a cabo las mediciones en ambos muestreos osciló entre las 12:00 y 15:00 horas, lo que corresponde al horario de mayor temperatura. Con respecto a la salinidad, en el hábitat del ostión predomina un intervalo entre 10 y 35 [19], reportándose los valores de las mediciones de los muestreos dentro del mismo.

La Figura 27 muestra algunos depredadores del ostión encontrados en los muestreos.



Figura 27. Depredadores del ostión: balanos (*Balanus*), almejas (*Ruditapes ohillippinarum*), poliquetos (*Polychaeta*) y caracol (*Melongena corona*).

4.1.2. Estado fisiológico del ostión *C. virginica* recolectado en septiembre de 2017 y mayo de 2018.

4.1.2.1. Biometría del ostión

Se tomaron las medidas del ancho, longitud y el largo de la valva del ostión durante los dos muestreos, registrando la media de las medidas de 30 ostiones. En la Figura 28 se muestran los resultados obtenidos en ambos muestreos.

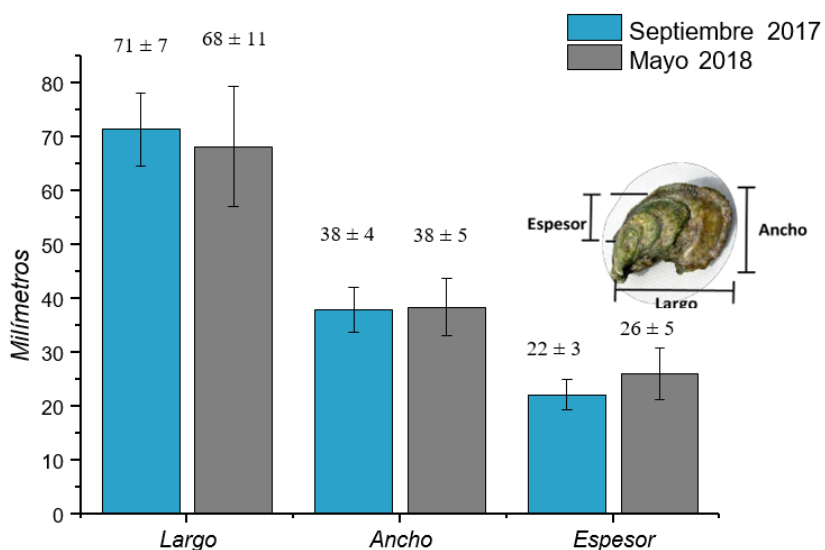


Figura 28. Mediciones de la valva del ostión en septiembre de 2017 y mayo de 2018.

La medida de los ostiones recolectados corresponde a la talla comercial que es de 70 a 90 milímetros [47], esto indica que son organismos adultos y que son aptos para la comercialización, así también son muestras de tamaño similar a las reportadas por Johnson L. *et al.* [11]

4.1.2.2. Índice de Condición Fisiológica (ICF) del ostión

La Tabla 12 muestra los valores obtenidos del Índice de Condición Fisiológica mediante el cual se describe la salud fisiológica del ostión [48], se registraron los valores obtenidos del ICF de ambos muestreos al igual que los pesos del tejido y de la valva seca del ostión.

Tabla 12. Peso en seco del tejido y valva del ostión

	Septiembre 2017	Mayo 2018
Peso tejido seco (g)	0.58	0.86
Peso valva seca (g)	31.75	34.76
ICF	18.27	24.69

Se observó un peso de la concha y del tejido del ostión menor en septiembre que en mayo, sin embargo la talla del ostión de septiembre es mayor que la de mayo, esto puede ser debido a un desove parcial del organismo [21]. El ICF es bajo de acuerdo a valores reportados que oscilan entre los 25 a 30 [49]. El peso de la valva seca fue menor en septiembre al igual que el tejido del mismo mes.

4.2 Análisis elemental del ostión *C. virginica* de los dos muestreos mediante la técnica LIBS.

4.2.2. Espectros de ambos muestreos

En la Figura 29 se observa un espectro de la caracterización de los ostiones recolectados en dos épocas distintas del año, en el mes de septiembre considerado como un mes de lluvia y en el mes de mayo con características de una época de seca.

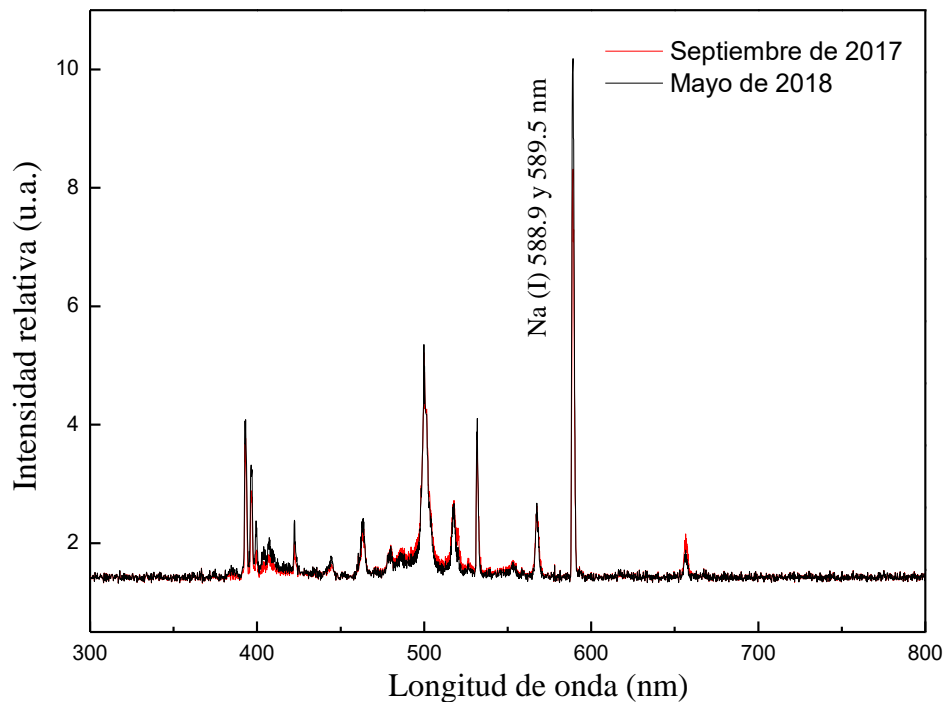


Figura 29. Espectros LIBS representativo del tejido del ostión recolectado en muestreos de septiembre de 2017 y mayo de 2018.

Se puede observar que las intensidades y los elementos identificados son muy similares en ambos muestreos, obteniendo una mayor intensidad en las líneas del Sodio (I) 588.9 y 589.5 nm en el mes de mayo, esto se puede deber a que en mayo el porcentaje de agua de mar en la desembocadura del río es mayor lo que implica una mayor concentración de sodio.

En la Figura 30 se observan por separado los espectros obtenidos de cada uno de los muestreos del ostión, con lo cual se percibe de forma más clara que algunos elementos tienen mayor intensidad en mayo y otros en septiembre. Se obtienen las relaciones de intensidades de las dos líneas características del Na con respecto al Ca y al Cr para determinar si existe diferencia en las razones obtenidas de septiembre y de mayo de los elementos citados.

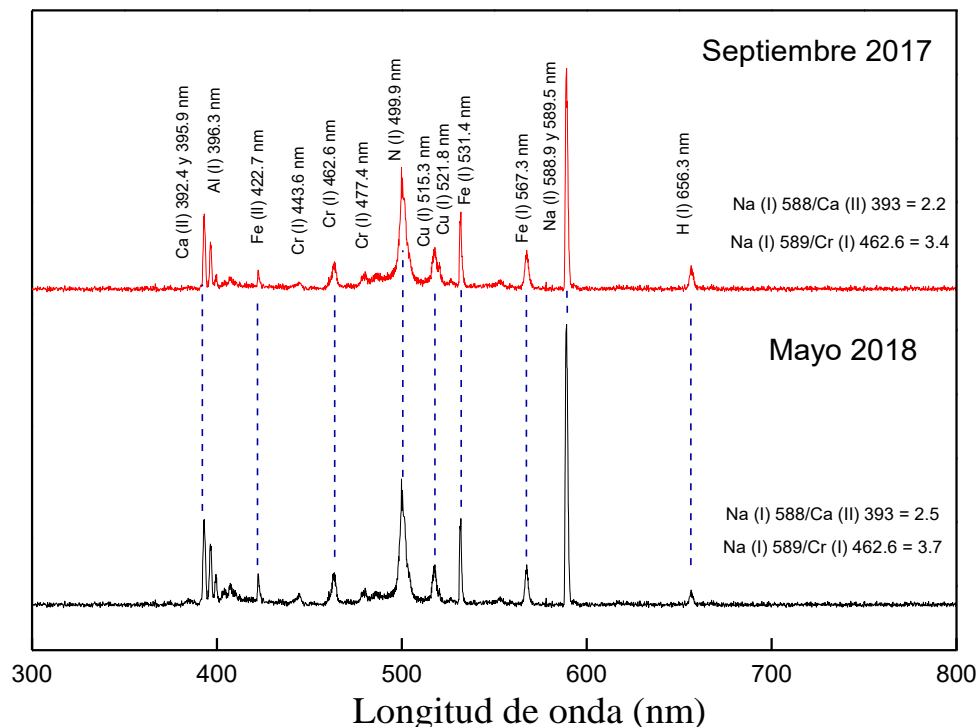


Figura 30. Espectros LIBS del ostión recolectado en septiembre 2017 y mayo 2018.

Se identificaron los elementos presentes en el tejido del ostión, como lo son Ca, Al, Fe, Cr, N, Na e H, los cuales se encuentran en ambos muestreos solo que, con mayor intensidad en algunas de sus líneas en el muestreo de mayo, lo anterior se puede deber a que mayo se caracteriza por una época seca en la cual existe una mayor concentración de los elementos presentes en el agua. Se obtuvieron razones diferentes en los muestreos esto confirma que es posible realizar una resta entre las intensidades de ambos muestreos con la finalidad de identificar a los elementos que tuvieron una mayor intensidad en mayo y los fueron mayores en septiembre.

4.2.3. Espectro diferencia de intensidades registradas en ambos muestreos.

En la Figura 31 se visualiza el espectro obtenido de efectuar una resta entre las intensidades de los dos muestreos, se efectuó la diferencia de las intensidades de mayo menos las intensidades del mes de septiembre para una identificación más sencilla de las líneas con mayor intensidad en cada uno de los muestreos.

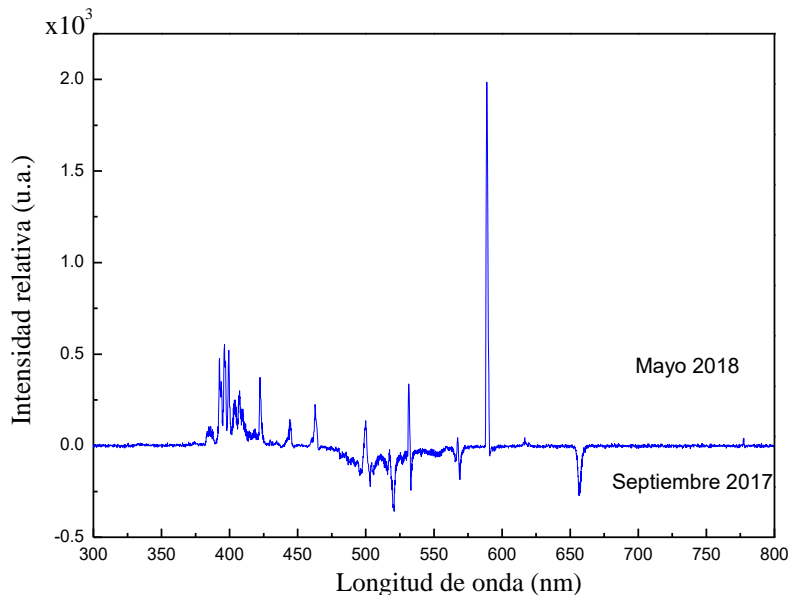


Figura 31. Espectro LIBS del ostión de la diferencia entre las intensidades de septiembre y mayo.

Las líneas que se observan con una intensidad en una escala mayor a cero corresponden a las líneas de los elementos cuya intensidad es mayor en el mes de mayo que en el mes de septiembre; del mismo modo las líneas cuyas intensidades que se encuentran en una escala negativa del eje “y” corresponden a las líneas que obtuvieron una mayor intensidad en septiembre que en el mes de mayo.

El espectro diferencia se seccionó en cuatro intervalos para lograr una mayor visibilidad de la identificación de los elementos presentes en el tejido del ostión *Crassostrea virginica*, en las Figuras 32 – 35 se observan los intervalos con la identificación de los elementos presentes.

En la Figura 32 que comprende el intervalo de 360 a 450 nm se identifican las mayores intensidades en el mes de mayo, entre los elementos presentes se encuentra el Ca II, Al (I), Fe (I) y Cr (I), el Ca II y el Al. Estos elementos también fueron identificados en el ostión por Akpovo et. al. en 2011 [49].

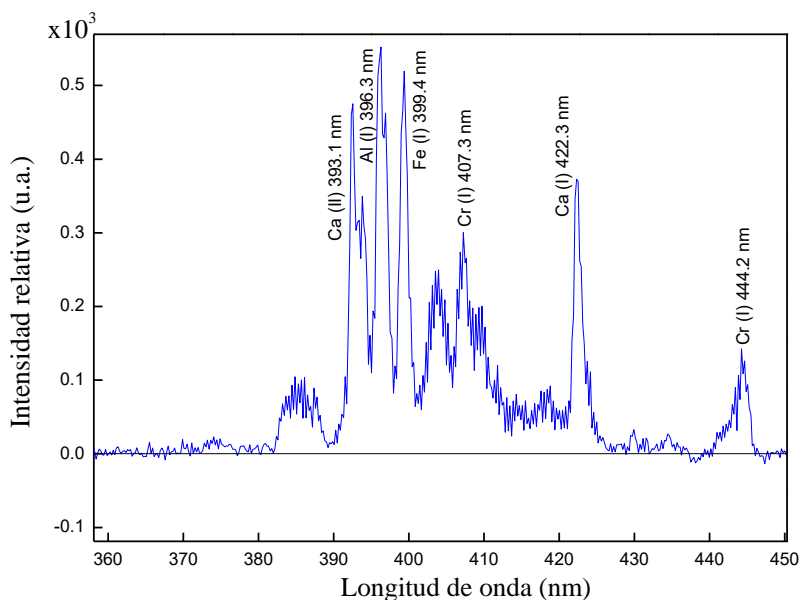


Figura 32. Espectro diferencia del intervalo de 360 a 450 nm

En la Figura 33 se presenta el espectro correspondiente a las longitudes de onda en el intervalo 450 y 550 nm, los elementos con mayor intensidad en el mes de mayo son el Mn (I), el N, Cr (I) y la línea 531.5 del Fe (I), y aquellos elementos para los que se obtuvo mayor intensidad en septiembre son Cr (I), la línea 520.7 del Fe (I) y O(I).

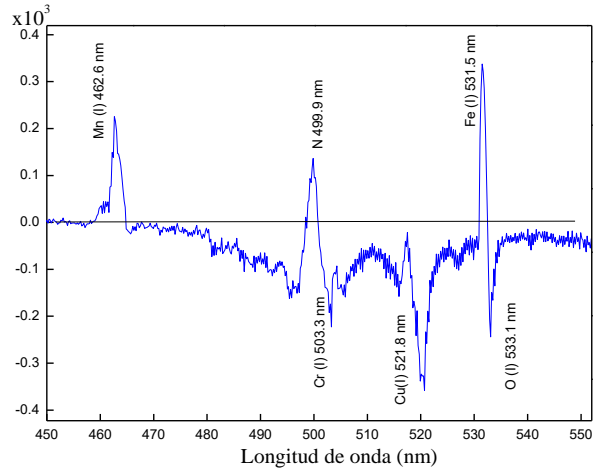


Figura 33. Espectro diferencia del intervalo de 450 a 550 nm

La Figura 34 corresponde al espectro LIBS del tejido del ostión *virginica* perteneciente al intervalo entre 550 y 650 nm, en el cual se identifica que se obtuvo mayor intensidad en las líneas del Na en el mes de mayo y una mayor intensidad en la línea 568.7 nm.

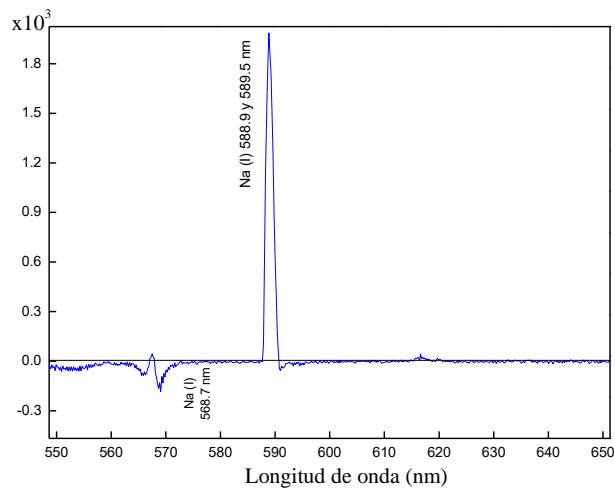


Figura 34. Espectro diferencia del intervalo de 550 a 650 nm

En la Figura 35 se visualiza el espectro correspondiente al último intervalo en el cual fueron identificadas la línea del H con una intensidad mayor en el mes de mayo y las líneas características del triplete del O de las que se obtuvo mayor intensidad en septiembre.

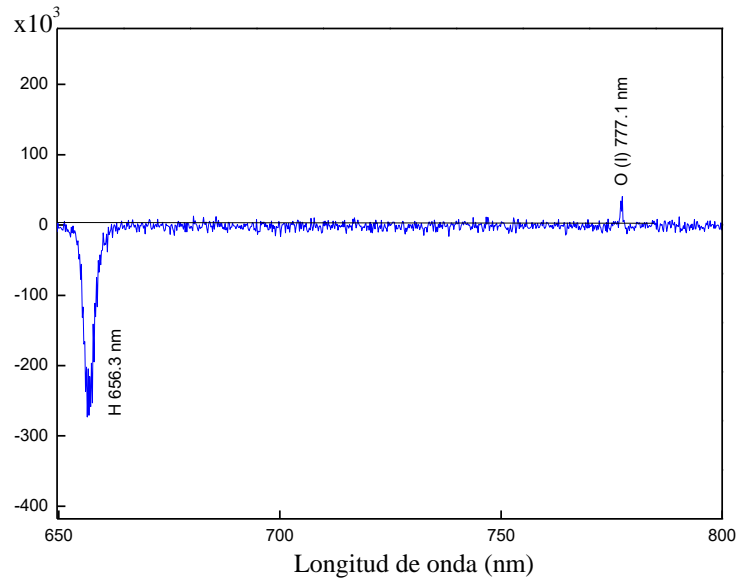


Figura 35. Espectro diferencia del intervalo de 650 a 800 nm

Los elementos identificados con mayor intensidad en el ostión en época seca son Ca, Al, Fe, Cr, Mn y Na; y en época de lluvia algunas líneas de Cr, Cu e H. En el caso del elemento Na, existe una mayor concentración en época seca debido a que existe una mayor evaporación de agua, aunado a un mayor volumen de agua de mar por la acción de la marea.

4.3. Análisis del tejido del ostión con diferentes concentraciones de Cu mediante LIBS.

En la Figura 36 se visualiza el espectro del tejido del ostión con diferentes concentraciones de Cu.

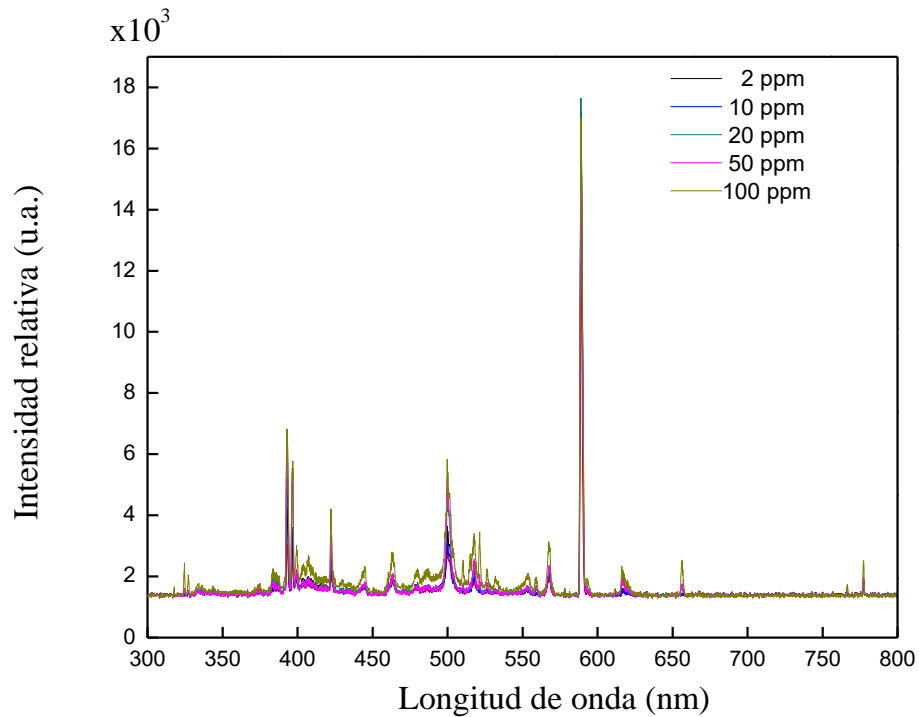


Figura 36. Espectro LIBS del tejido del ostión con diferentes concentraciones de Cu.

En la Figura 37 se observan los espectros obtenidos por LIBS y se identifican las líneas características del Cu: 324.6, 327.1, 510.3, 515.1 y 521.5 nm obteniéndose relaciones de intensidades de los espectros de las muestras correspondientes a las intensidades de las líneas principales del patrón de Cu analizado por LIBS.

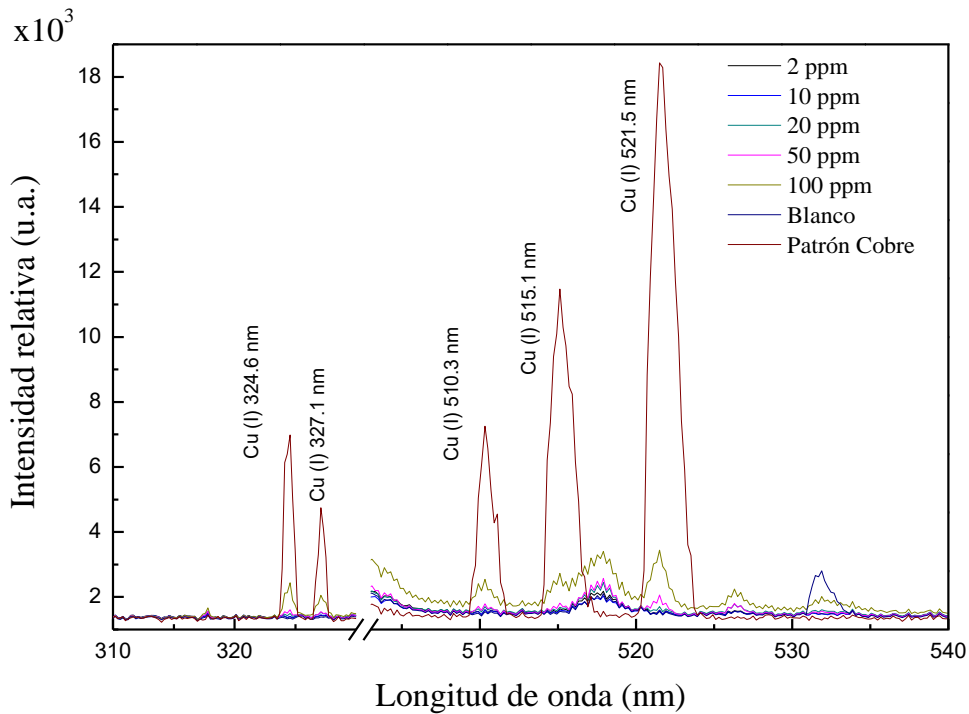


Figura 37. Espectros LIBS de las muestras del tejido del ostión y del patrón de cobre.

A parte en la Figura 38 se observa el espectro LIBS obtenido del tejido del ostión con diferentes concentraciones de Cu.

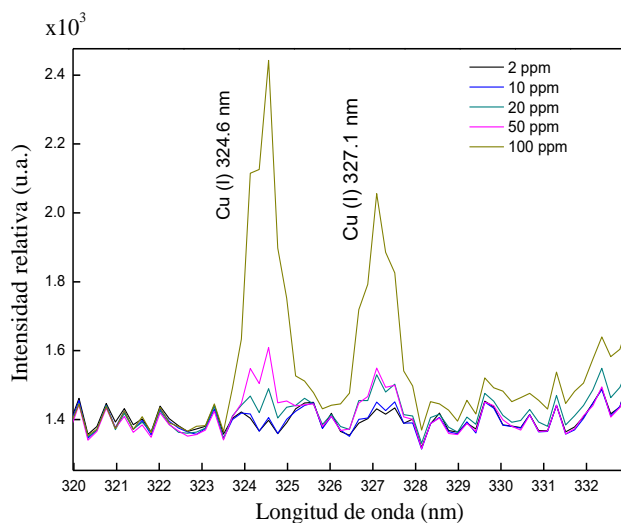


Figura 38. Espectro LIBS de la muestra del tejido del ostión con diferentes concentraciones de Cu.

En la pastilla que contiene 100 ppm de Cu las intensidades de las líneas tienen una relación de intensidad correspondiente a las intensidades del espectro obtenido de NIST, lo cual corrobora su presencia.

En la Figura 39 se presenta el espectro LIBS del tejido del ostión con diferentes concentraciones de Cu, donde se observa la presencia de las principales líneas del Cu con intensidades relativas a las observadas en el espectro de Cu del NIST, estos resultados validan la presencia del Cu en las muestras.

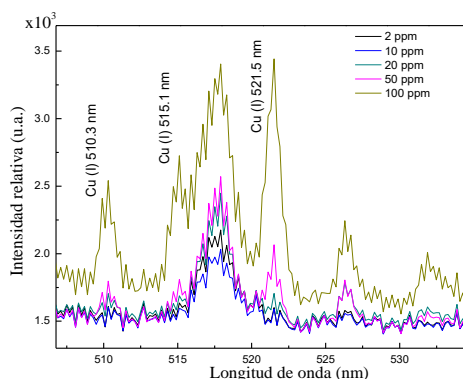


Figura 39. Gráfica del espectro LIBS de la muestra del tejido del ostión

Se observa la presencia de las principales líneas del Cu con intensidades relativas a las observadas en el espectro de Cu del NIST, estos resultados validan la presencia del Cu en las muestras.

4.3.1. Análisis semicuantitativo mediante la técnica LIBS del tejido del ostión con diferentes concentraciones de Cu

Se hizo un análisis de la relación de intensidades de algunos elementos presentes en el espectro del tejido del ostión para identificar si existe una variación con respecto a la concentración del analito.

Se determinó la relación de intensidades de la línea 588.9 de Na (I) con respecto a la línea 521.5 del Cu (I) para las diferentes concentraciones del analito, en la Figura 40 se observan las razones de las intensidades obtenidas.

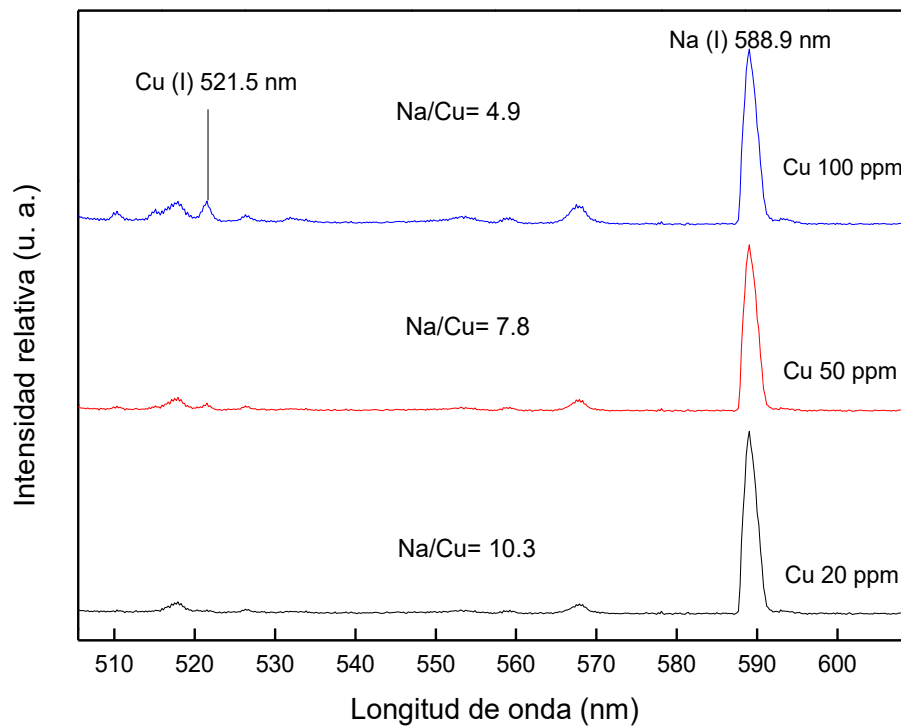


Figura 40. Relaciones de intensidad entre el Na y diferentes concentraciones de Cu

Al aumentar las concentraciones del Cu aumenta la intensidad de la línea espectral, en el caso del Na la concentración no varía, por lo cual no cambia la intensidad de la línea, por lo anterior se obtiene un cambio en la relación de intensidades del Na con respecto al Cu.

En las Figuras 41 - 44 se presentan las curvas de calibración realizadas para relacionar la intensidad de las líneas características del Na (I) 588.9 y 589.5 nm con respecto a las líneas de Cu (I) 324.6, 515.11 y 521.5 nm.

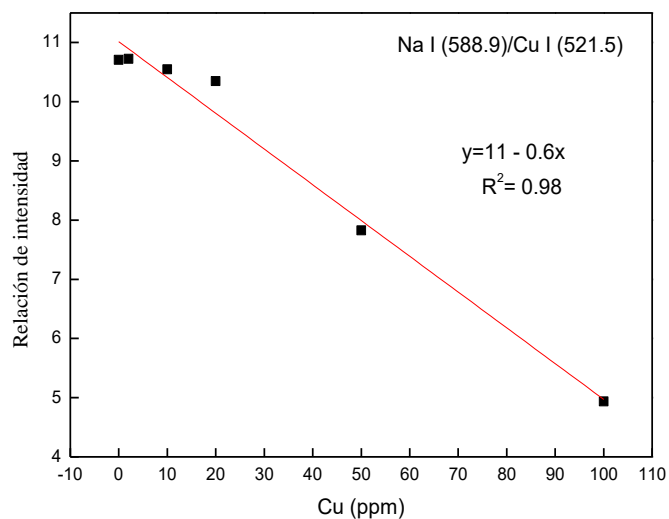


Figura 41. Curva de calibración de la relación de intensidad de Na I (588.9 nm) /Cu I (521.5 nm) para diferentes concentraciones de Cu en el tejido del ostión.

Se realizó el ajuste lineal de la concentración del analito con respecto a la relación de intensidades de la línea del Na con respecto a la del Cu, obteniéndose un coeficiente de R^2 de 0.98.

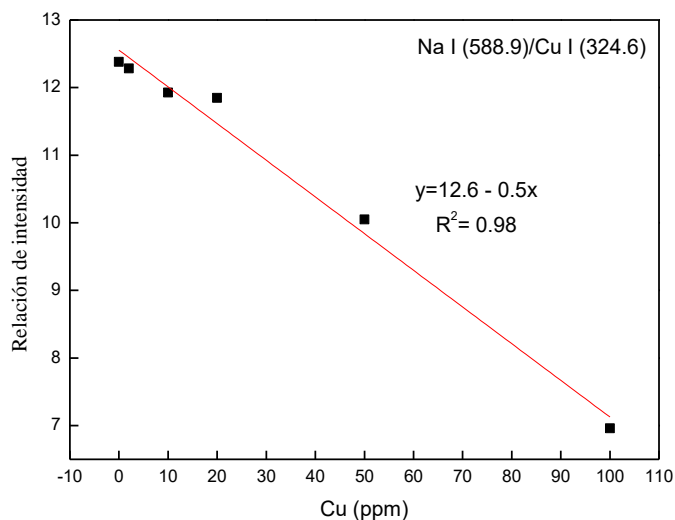


Figura 42. Curva de calibración de la relación de intensidad de Na I (588.9 nm) /Cu I (324.6 nm) para diferentes concentraciones de Cu en el ostión *C. virginica*.

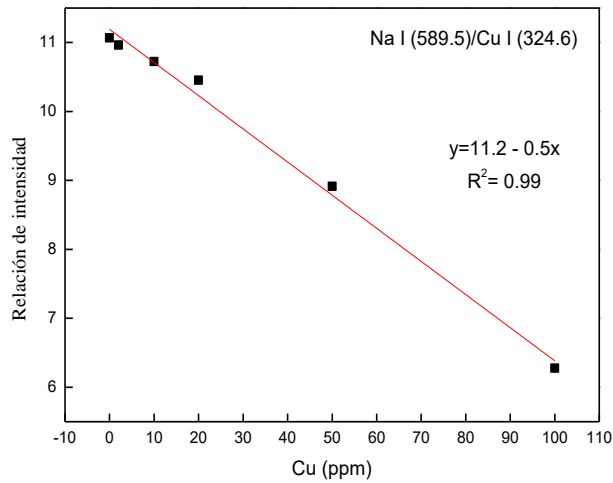


Figura 43. Curva de calibración de la relación de intensidad de Na I (589.5 nm) /Cu I (324.6 nm) para diferentes concentraciones de Cu en el tejido del ostión *C. virginica*.

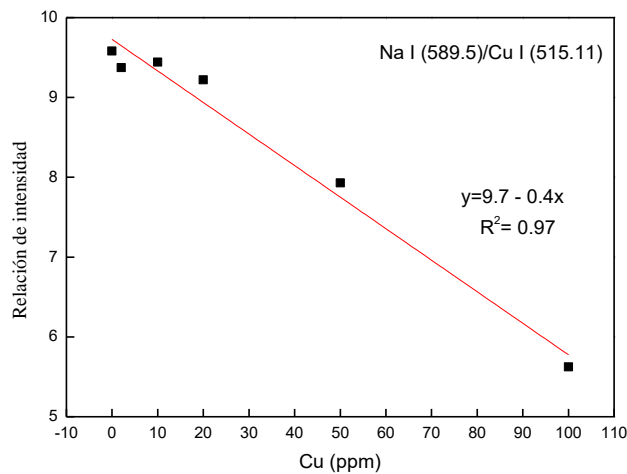


Figura 44. Curva de calibración de la relación de intensidad de Na I (589.5 nm) /Cu I (515.11 nm) para diferentes concentraciones de Cu en el tejido del ostión.

En las curvas de calibración de relación de intensidades se aprecia un índice de correlación mayor a 0.90 lo que indica una correlación aceptable entre ambas variables. Al aumentar la concentración del Cu, aumenta la intensidad de la línea espectral y la razón de intensidad con respecto al Na va disminuyendo, esto es debido a que la concentración de Na no se está modificando, por lo cual su intensidad se mantiene igual.

En la Tabla 13 se registraron las intensidades obtenidas en el análisis LIBS para las líneas del Cu 324.6, 327.1, 510.3, 515.1 y 521.5 nm y se obtuvo el promedio de intensidades para cada concentración.

Tabla 13. Intensidades LIBS de líneas de Cu con diferentes concentraciones.

Concentración Cu (ppm)	Longitud de onda Cu (nm)					Promedio (u. a.)
	324.6	327.1	510.3	515.1	521.5	
0	245.7	278.7	396.3	391.3	415.0	345.4
2	295.3	343.4	480.5	465.0	468.8	410.6
10	305.7	350.8	504.6	496.4	489.8	429.5
20	389.3	429.9	604.2	588.0	605.4	523.4
50	509.2	449.5	696.2	709.0	966.1	666.0
100	1342.7	955.6	1440.9	1625.4	2342.1	1541.3

En la Figura 45 se grafican las intensidades obtenidas en el análisis LIBS para las líneas del Cu con concentraciones de 2, 10, 20, 50 y 100 ppm; y el promedio de las intensidades.

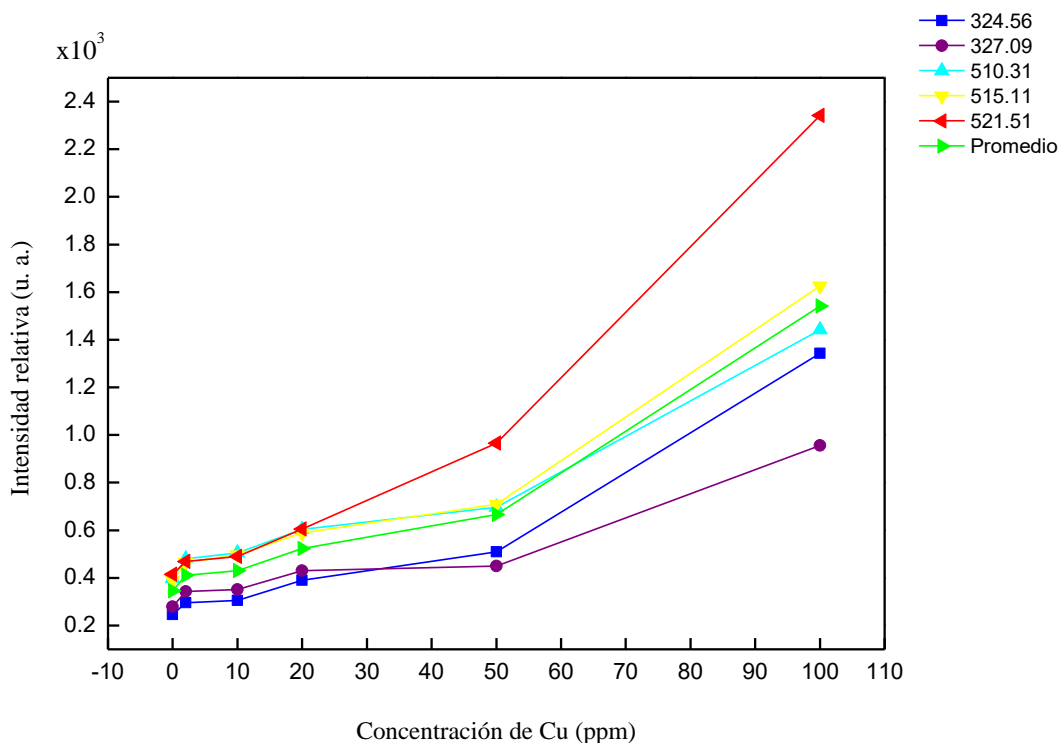


Figura 45. Gráfica de Líneas de Cu con diferentes concentraciones.

En la Figura 46 se observa la curva de calibración en la cual se relaciona la concentración del Cu con el promedio de intensidad LIBS obtenido para cada concentración y se efectuó un ajuste por el método de mínimos cuadrados.

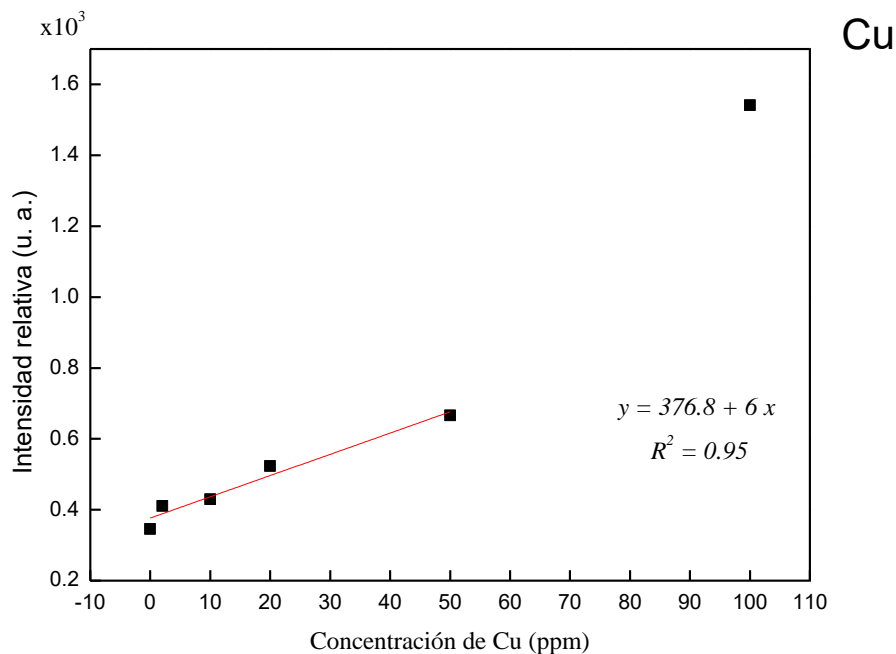


Figura 46. Curva de calibración de intensidades de Cu obtenidas en el análisis LIBS del ostión.

Se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.95, el cual es un valor aceptable, y se obtuvo la ecuación de la recta.

Empleando la ecuación de la recta obtenida se identificó la concentración del analito presente en el tejido del ostión utilizado como blanco. En la Figura 47 se observa la estimación de la concentración del analito mediante extrapolación.

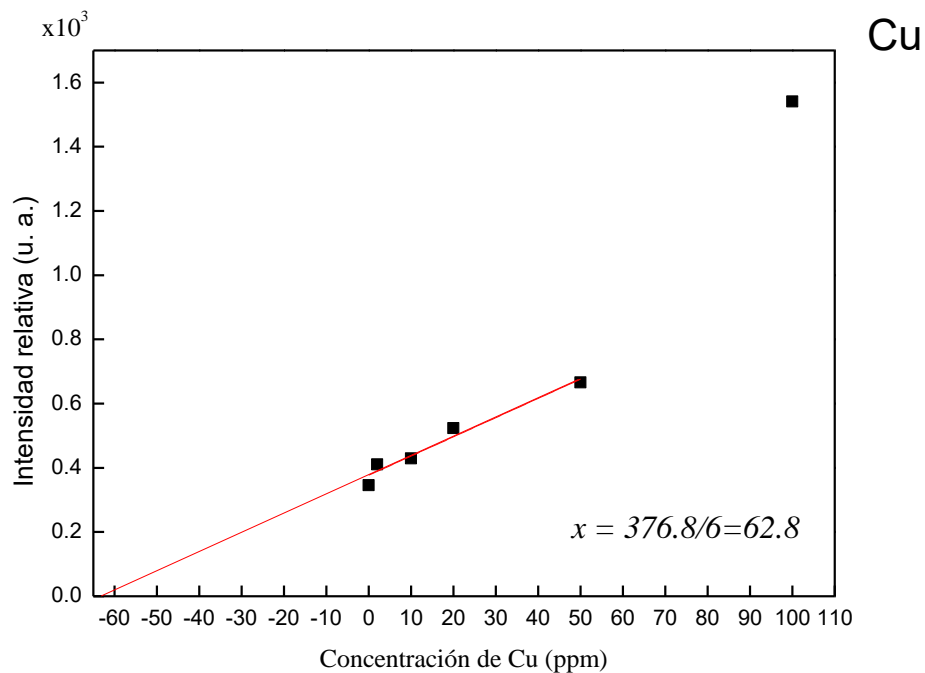


Figura 47. Estimación por extrapolación de la concentración de Cu en el tejido del ostión empleado como blanco.

Mediante la ecuación de la recta y la extrapolación se obtuvo una concentración de 62.8 ppm de Cu en el blanco

4.3.2. Análisis mediante la técnica Espectroscopia de Absorción Atómica del tejido del ostión con diferentes concentraciones de Cu

Se determinó el contenido de Cu presente en la pastilla del tejido del ostión *C. virginica* empleado como blanco con la técnica Espectroscopia de Absorción Atómica en el laboratorio de Análisis y Monitoreo Ambiental del Centro Interdisciplinario de Investigación y Estudios sobre Medio Ambiente y Desarrollo (CIEMAD – IPN) mediante el método de análisis IPN AA 06 00 para corroborar los resultados obtenidos por el análisis LIBS. El resultado obtenido por la técnica de espectroscopia de absorción atómica indica una concentración de Cu en el blanco de ostión de 62 ppm, lo que corrobora la cantidad estimada por la técnica LIBS del contenido de Cu en el ostión.

Capítulo 5. CONCLUSIONES

En ambos muestreos se registraron condiciones ideales de temperatura y salinidad correspondientes al hábitat del ostión *Crassostrea virginica*.

La salinidad se incrementó en la época seca ya que por ser menor el nivel del río existe un ingreso de mayor volumen de agua de mar.

El ICF reflejó una calidad media del ostión, ocasionado porque la valva tuvo medidas de talla comercial pero el ostión era pequeño en relación con ella, lo anterior puede ser debido a depredadores, enfermedades y contaminación.

En la caracterización con la técnica LIBS del ostión de ambos muestreos se identificaron líneas espectrales de metales como el Cr, Al y Cu. La variación en las intensidades de las líneas se atribuye a que el agua que filtra el ostión difiere en la cantidad de nutrientes y contaminantes por ser dos épocas diferentes.

La bioacumulación es una característica del ostión por lo cual es empleado como organismo biomonitor, de allí la importancia de una técnica alternativa que permita un análisis multielemental y oportuno ante los cambios del ecosistema.

La técnica LIBS se complementa con la curva de calibración para estimar la concentración del analito en una muestra.

El proceso de secado del tejido de ostión permitió la obtención de un límite de detección del Cu por la técnica LIBS menor a los reportados en otros estudios de muestras biológicas

TRABAJOS FUTUROS

Se sugiere una caracterización frecuente del ostión *Crassostrea virginica* para identificar oportunamente cambios en los componentes de la matriz lo cual reflejaría un cambio en las condiciones de su hábitat.

Se propone realizar mediante la técnica LIBS curvas de calibración para otros metales con la finalidad de identificar la sensibilidad de la técnica ante la variación de las concentraciones.

GLOSARIO

Estuario: del latín aestuarium, que quiere decir un área bajo las influencias de las mareas, es la desembocadura, en el mar, de un río amplio y profundo, e intercambia con esta agua salada y agua dulce, debido a las mareas. La desembocadura del estuario está formada por un solo brazo ancho en forma de embudo ensanchado.

Eutrofización: es el enriquecimiento de nutrientes en un ecosistema acuático

Hermafrodita protándrico: Organismos cuyo sexo masculino madura antes que el femenino.

Toxico cinética: Estudio cuantitativo de los procesos que experimenta, en función del tiempo, un xenobiótico en un organismo vivo.

Toxicología: Parte de la medicina que se ocupa del estudio y los efectos de los productos tóxicos o venenosos sobre el organismo

Xenobiótico: es una sustancia química que se encuentra dentro de un organismo que no lo produce naturalmente.

PRODUCTIVIDAD

Coloquio Interno de Ciencia y Tecnología. *Desarrollo de técnicas LIBS de alta resolución para identificación de muestras biológicas*. Póster. IPN – CICATA, Unidad Altamira, Tamaulipas. Junio 2017.

Coloquio Interno de Ciencia y Tecnología. *Desarrollo de técnicas LIBS de alta resolución para identificación de muestras biológicas*. Póster. IPN – CICATA, Unidad Altamira, Tamaulipas. Diciembre 2017.

Coloquio Interno de Ciencia y Tecnología. *Desarrollo de técnicas LIBS de alta resolución para identificación de muestras biológicas*. Póster. IPN – CICATA, Unidad Altamira, Tamaulipas. Junio 2018.

XXX Encuentro Nacional de Investigación Científica y Tecnológica del Golfo de México. *Desarrollo de técnicas LIBS de alta resolución para identificación de muestras biológicas*. Ponencia. Academia Tamaulipeca de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. IPN – CICATA, Unidad Altamira, Tamaulipas. Mayo 2018.

XIII FORO PIFI. *Determinación de metales pesados en el tejido del ostión Crassostrea virginica mediante la técnica LIBS*. Póster. Instituto Politécnico Nacional. México, D. F. Agosto 2018.

6° Encuentro de jóvenes investigadores de Tamaulipas 2018. *Determinación de metales pesados en el tejido del ostión Crassostrea virginica mediante la técnica LIBS*. Consejo Tamaulipeco de Ciencia y Tecnología. Cd. Victoria, Tamaulipas. Noviembre 2018.

Coloquio Interno de Ciencia y Tecnología. *Desarrollo de técnicas LIBS de alta resolución para identificación de muestras biológicas*. Póster. IPN – CICATA, Unidad Altamira, Tamaulipas. Diciembre 2018.

Segundo Encuentro de Materiales y Dispositivos Altamira 2019 EMDA 2. *Determinación de metales pesados en el tejido del ostión Crassostrea virginica mediante la técnica LIBS*. Póster. IPN – CICATA, Unidad Altamira, Tamaulipas. Mayo 2019.

Colloquium Spectroscopicum Internationale XLI. Latin American Meeting on LIBS. Analysis of heavy metals in *Crassostrea virginica* oysters using the technique of Laser Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS). *Póster*. Universidad Autónoma de México. Junio 2019.

REFERENCIAS

- [1] R. George, G. D. Martin, S. M. Nair, and N. Chandramohanakumar, "Biomonitoring of trace metal pollution using the bivalve molluscs, *Villorita cyprinoides*, from the Cochin backwaters," *Environ. Monit. Assess.*, vol. 185, no. 12, pp. 10317–10331, Dec. 2013.
- [2] L. Marín-Mézquita, L. Baeza, O. Zapata-Pérez, and G. Gold-Bouchot, "Trace metals in the American oyster, *Crassostrea virginica*, and sediments from the coastal lagoons Mecoacan, Carmen and Machona, Tabasco, Mexico," *Chemosphere*, vol. 34, no. 11, pp. 2437–2450, 1997.
- [3] E. R. Baqueiro-cárdenas, L. Borabe, and C. G. Goldaracena-islas, "Mollusks and pollution . A review," *Rev. Mex. Biodivers.*, pp. 1–7, 2007.
- [4] A. Valenzuela B, C. G. Yáñez, and C. Golusda V, "EL OSTIÓN DEL NORTE CHILENO (*Argopecten Purpuratus*), UN ALIMENTO DE ALTO VALOR NUTRICIONAL," *Rev. Chil. Nutr.*, vol. 38, no. 2, pp. 148–155, Jun. 2011.
- [5] FAO, "FAO yearbook. Fisheries and Aquaculture Statistics 2016/FAO annuaire. Statistiques des pêches et de l'aquaculture 2016/ FAO anuario. Estadísticas de pesca y acuicultura 2016.," 2018.
- [6] "ANUARIO_ESTADISTICO_2017.pdf.crdownload." .
- [7] *Environmental monitoring and assessment*. Kluwer Academic Publishers.
- [8] C. Wang *et al.*, "Determination of heavy metal chromium in pork by laser-induced breakdown spectroscopy," *Appl. Opt.*, 2016.
- [9] M. Sosa-Saldaña, G. M. Bilmes, L. V. Ponce, F. C. Alvira, and T. Flores, "Laser-induced breakdown spectroscopy determination of toxic metals in fresh fish," *Appl. Opt.*, 2016.
- [10] X. Wan and P. Wang, "Analysis of heavy metals in organisms based on an optimized quantitative LIBS," *Opt. - Int. J. Light Electron Opt.*, vol. 126, no. 19, pp. 1930–1934, Oct. 2015.
- [11] L. Johnson *et al.*, "Regional discrimination of oysters using laser-induced breakdown spectroscopy," *Anal. Methods*, 2013.
- [12] F. Vazquez, G. Aguilera, D. Delgado, and A. Marquez, "Trace and heavy metals in the oyster *Crassostrea virginica*, San Andres Lagoon, Tamaulipas, Mexico," *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 45, no. 6, pp. 907–914, Dec. 1990.
- [13] S.E.(Sría. Economía), "Secretaría de Economía," 2018. [Online]. Available: <http://www.economia-nmx.gob.mx/normas/nmx/2010/nmx-aa-051-scfi-2016.pdf>. [Accessed: 06-Mar-2019].
- [14] M. De La Luz Vázquez-Sauceda, G. Aguirre-Guzmán, J. G. Sánchez-Martínez, and R. Pérez-Castañeda, "Cadmium, lead and zinc concentrations in water, sediment and oyster (*Crassostrea virginica*) of San Andres Lagoon, Mexico," *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 86, no. 4, pp. 410–414, 2011.
- [15] Anónimo, "NOM-242-SSA1-2009 Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba," *D. Of. la Fed.*, 2011.
- [16] "FAO Fisheries & Aquaculture - Programa de información de especies acuáticas - *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791)." [Online]. Available:

http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_virginica/es. [Accessed: 07-Mar-2019].

- [17] C. Arias de León, "LA PESQUERÍA MEXICANA DEL OSTIÓN *Crassostrea virginica* (GMELIN, 1791) DEL GOLFO DE MÉXICO: LIMITANTES DE SU DESARROLLO," 2014.
- [18] "Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=80539213>," 2007.
- [19] M. M. Helm, N. Bourne, and A. Lovatelli, "Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico," *FAO Doc. Técnico Pesca*, vol. 471, p. 184, 2006.
- [20] K. Rossi-Snook, G. Ozbay, and F. Marenghi, "Oyster (*Crassostrea virginica*) gardening program for restoration in Delaware's Inland Bays, USA," *Aquac. Int.*, vol. 18, no. 1, pp. 61–67, Feb. 2010.
- [21] J. Chávez-Villalba, A. Hernández-Ibarra, M. R. López-Tapia, and J. M. Mazón-Suástegui, "Prospective Culture of the Cortez Oyster *Crassostrea corteziensis* from Northwestern Mexico: Growth, Gametogenic Activity, and Condition Index," *J. Shellfish Res.*, vol. 27, no. 4, pp. 711–720, 2008.
- [22] A. M. Mora, D. Jumbo-Flores, M. González-Merizalde, and S. A. Bermeo-Flores, "NIVELES DE METALES PESADOS EN SEDIMENTOS DE LA CUENCA DEL RÍO PUYANGO, ECUADOR," *Rev. Int. Contam. Ambient.*, vol. 32, no. 4, pp. 385–397, Oct. 2016.
- [23] A. Ferrer Dufol, "Intoxicación por metales," *An. Sist. Sanit. Navar.*, vol. 26, no. Suplemento 1, pp. 141–153, 2003.
- [24] I. Tecnológico, D. Boca, C. V. C. P, and B. Río, "Bioaccumulation of cadmium (cd), lead (pb) and arsenic (as) in," vol. 26, no. 3, pp. 201–210, 2010.
- [25] E. Madrigal A. L, "Determinación de Metales Pesados (Pb, Hg, Cd y As), en Agua de Mar y Ostión (*Crassostrea iridiscens*) en la Costa del Estado de Colima," pp. 1–9, 2012.
- [26] C. Stan, P. En, and L. O. S. A. Y. Piensos, "CODEX STAN 193-1995 Página 1 de 48," 2009.
- [27] K. Chang, Raymond, Goldsby, *Química (11a. ed.) - Chang, Raymond, Goldsby, Ken - Google Libros*. 2013.
- [28] I. De Secretaría, P. La, P. D. E. La, and S. Humana, "Enfoque Estratégico Para La Gestión De Los Productos Químicos a Nivel Internacional (Saicm)," pp. 1–5, 2009.
- [29] A. Rubio, C.; Gutiérrez, A.J.; Martín Izquierdo, R.E; Revert, C.; Lozano, G.; Hardisson, *Revista de toxicología organo oficial de la Asociacion Española de Toxicología.*, vol. 21, no. 2–3. Asociación Española de Toxicología, 2004.
- [30] L. R. G. Robert S. Hoffman, Mary Ann Howland, Neal A. Lewin, Lewis S. Nelson, *Goldfranks Toxicologic Emergencies Tenth edición*. 2015.
- [31] E. Sabath and M. L. Robles-Osorio, "Medio ambiente y riñón: Nefrotoxicidad por metales pesados," *Nefrología*. 2012.
- [32] L. Hellström *et al.*, "Cadmium exposure and end-stage renal disease.," *Am. J. Kidney Dis.*, vol. 38, no. 5, pp. 1001–8, Nov. 2001.
- [33] D. Skoog, F. Holler, and T. Nieman, "Principios de análisis instrumental. Ed.," *MG Hill*, 2001.
- [34] D. W. Hahn and N. Omenetto, "Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS), Part I: Review of Basic Diagnostics and Plasma—Particle Interactions: Still-Challenging

- Issues within the Analytical Plasma Community,” *Appl. Spectrosc.*, vol. 64, no. 12, p. 335A–336A, Dec. 2010.
- [35] J. D. Winefordner, I. B. Gornushkin, T. Correll, E. Gibb, B. W. Smith, and N. Omenetto, “Comparing several atomic spectrometric methods to the super stars: special emphasis on laser induced breakdown spectrometry, LIBS, a future super star,” *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 19, no. 9, p. 1061, Sep. 2004.
- [36] D. A. Cremers and L. J. Radziemski, *Handbook of Laser-induced Breakdown Spectroscopy*. 2006.
- [37] J. M. Vadiillo and J. J. Laserna, “Laser-induced plasma spectrometry: Truly a surface analytical tool,” *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*. 2004.
- [38] R. J. Lasheras, “Espectroscopía de descomposición inducida por láser (LIBS): una técnica emergente en la química analítica (LIBS): una técnica emergente en la química analítica Laser Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS): an emergence technique in the analytical che,” no. February, 2016.
- [39] D. Skoog, F. Holler, and T. Nieman, “Principios de análisis instrumental. Ed,” 2001.
- [40] H. Gutiérrez Pulido and R. De la Vara Salazar, *Análisis y diseño de experimentos*. 2008.
- [41] D. C. Harris, “Calibracion De Material Volumetrico,” *Análisis químico cuantitativo*, pp. 179–218, 2007.
- [42] D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch, S. Cervantes González, and M. B. Anzures, *Principios de análisis instrumental*. Cengage Learning, 2008.
- [43] F. Vazquez, G. Aguilera, D. Delgado, and A. Marquez, “Trace and heavy metals in the oyster *Crassostrea virginica*, San Andres Lagoon, Tamaulipas, Mexico,” *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 45, no. 6, pp. 907–914, 1990.
- [44] F. G. Vazquez, L. G. Aguilera, and V. K. Sharma, “Metals in sediments of San Andres lagoon, Tamaulipas, Mexico,” *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 52, no. 3, pp. 382–387, 1994.
- [45] D. R. Lawrence and G. I. Scott, “The Determination and Use of Condition Index of Oysters,” *Estuaries*, vol. 5, no. 1, p. 23, 2006.
- [46] “NIST LIBS Database.” [Online]. Available: <https://physics.nist.gov/PhysRefData/ASD/LIBS/lib-form.html>. [Accessed: 07-Apr-2019].
- [47] “Especies relevantes de la Industria Pesquera Mexicana 2. Ostión Global Biotech Consulting Group 13-001.”
- [48] J. Chávez-Villalba, A. Hernández-Ibarra, M. R. López-Tapia, and J. M. Mazón-Suástegui, “Prospective Culture of the Cortez Oyster *Crassostrea corteziensis* from Northwestern Mexico: Growth, Gametogenic Activity, and Condition Index,” [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2008\)27\[711:PCOTCO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2008)27[711:PCOTCO]2.0.CO;2), vol. 27, no. 4, pp. 711–720, Aug. 2008.
- [49] D. Wright and E. Hetzel, “Use of RNA: DNA ratios as an indicator of nutritional stress in the American oyster *Crassostrea virginica*,” *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, vol. 25, pp. 199–206, 2007.