



Universidad de Oviedo

MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

Trabajo Fin de Máster

“Evaluación de diferentes diseños de una celda de ablación criogénica para estudios de bio-imaging empleando la técnica de ablación láser ICP-MS”

Sara María Rodríguez Menéndez

Julio 2014, Oviedo



BEATRIZ FERNANDEZ GARCIA, Investigadora Postdoctoral del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICA:

Que el presente Trabajo, titulado “**Evaluación de diferentes diseños de una celda de ablación criogénica para estudios de bio-imaging empleando la técnica de ablación láser ICP-MS**” ha sido realizado por el licenciado **SARA MARIA RODRIGUEZ MENENDEZ**, en el Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo bajo su dirección, constituyendo el Trabajo de Fin de Máster del interesado en el curso académico 2013-14, y cuya presentación autorizo.

Oviedo, 23 de Junio de 2014

Fdo: Beatriz Fernández García

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a las Dras. Beatriz Fernández García, Investigadora postdoctoral del Departamento de Química-Física y Analítica por su continuo apoyo en el desarrollo del trabajo y tratamiento de datos así como de la corrección de la memoria, a Rosario Pereiro García, Catedrática de Química Analítica en el Departamento de Química-Física y Analítica, por haberme guiado también a lo largo de la parte experimental del proyecto y haberme permitido realizar este proyecto dentro de su grupo de investigación.

Finalmente, agradecer al Dr. Jorge Ruiz Encinar, coordinador del Máster en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas, por brindarme la oportunidad de realizar este máster y la realización del presente proyecto.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Importancia del hierro en las plantas	1
1.2. Técnicas empleadas para el estudio de tejidos vegetales	2
1.3. Técnica de ablación láser con plasma de acoplamiento inductivo- espectrometría de masas (LA-ICP-MS)	4
1.3.1. Ablación láser.....	5
1.3.1.1. Producción de la radiación láser.....	7
1.3.2. Plasma de acoplamiento inductivo con detección por espectrometría de masas (ICP-MS).....	8
1.3.2.1. Sistema de inyección de la muestra.....	8
1.3.2.2. Sistema de ionización (ICP).....	9
1.3.2.3. Interfase.....	10
1.3.2.4. Lentes iónicas.....	11
1.3.2.5. Analizador: sector magnético de doble enfoque.....	11
1.3.2.6. Detector: multiplicador de electrones.....	12
1.3.3. Limitaciones de la técnica LA-ICP-MS.....	13
1.4. Celdas de ablación empleadas en los sistemas de ablación láser	14
2. OBJETIVOS	17
3. EXPERIMENTAL	18
3.1. Muestras	18
3.2. Instrumentación LA-ICP-MS	18
3.2.1. ICP-MS.....	18
3.2.2. Láser.....	20
3.2.3. Cámara de ablación criogénica.....	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
4.1. Optimización de las condiciones experimentales de análisis	27
4.2. Evaluación de las diferentes tapas para la celda de ablación	31
4.2.1. Evaluación de la tapa 1.....	32

4.2.2. Evaluación de la tapa 2.....	36
4.2.3. Evaluación de la tapa 3.....	39
4.2.4. Estudio comparativo de las tres tapas.....	45
4.3. Bio-imaging de metales en secciones de tejidos vegetales empleando LA-ICP-MS.....	47
5. CONCLUSIONES.....	49
6. BIBLIOGRAFÍA.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1: Planta con clorosis férrica</i>	1
<i>Figura 2: Diferencias de producción en un melocotonero afectado por clorosis. Las ramas de la izquierda no han sido tratadas mientras que a las de la derecha se les ha realizado un implante de hierro en el tronco</i>	2
<i>Figura 3: Diagrama esquemático de un equipo LA-ICP-MS con un analizador de sector magnético (analizador utilizado en este trabajo)</i>	5
<i>Figura 4: Ilustración esquemática de los pasos que llevan a la acción láser</i>	7
<i>Figura 5: Cámara de nebulización y nebulizador de un sistema</i>	8
<i>Figura 6: Antorcha de ICP</i>	9
<i>Figura 7: Esquema de los procesos que sufre la muestra en el ICP</i>	10
<i>Figura 8: Interfase de un sistema ICP-MS</i>	11
<i>Figura 9: Esquema de funcionamiento de un analizador de sector magnético</i>	12
<i>Figura 10: Dibujo esquemático de un multiplicador de electrones²⁷</i>	13
<i>Figura 11: Dibujo esquemático de la celda de Feldmann y col.</i>	15
<i>Figura 12: Dibujo esquemático de la cámara criogénica desarrollada por Becker y col.³⁰</i>	16
<i>Figura 13: Equipo ICP-MS “Thermo Scientific Element 2”</i>	18
<i>Figura 14: Nebulizador (1); bomba peristáltica (2)</i>	19
<i>Figura 15: Sistema de ablación láser LSX-213 (Cetac Technologies)</i>	20
<i>Figura 16: Interfase de conexión láser-ICP-MS</i>	20
<i>Figura 17: Conexión salida de He- sistema de ablación láser</i>	21
<i>Figura 18: Conexión salida Ar (ICP-MS)- sistema de ablación láser</i>	21
<i>Figura 19: Vista de la muestra dentro de la cámara de ablación</i>	22

<i>Figura 20: Ablación láser modo ‘single line’ y ‘single point’</i>	22
<i>Figura 21: Celda de ablación criogénica con control de la temperatura de la muestra</i>	23
<i>Figura 22: Vista de la muestra dentro de la celda donde se ve el termopar sensible que controla la temperatura de la superficie de la muestra</i>	24
<i>Figura 23: Celda de ablación con el sistema de refrigeración externo y el circuito que sigue el líquido refrigerante</i>	24
<i>Figura 24: Vista global de todo el equipo empleado; celda criogénica, sistema de ablación láser (LSX-213) e ICP-MS de alta resolución (Element II)</i>	25
<i>Figura 25: Perfil de ⁵⁶Fe obtenido empleando los flujos 900 mL/min Helio y 500 mL/min Argón</i>	27
<i>Figura 26: Señales (a) y tiempos de evacuación (b) para ⁵⁶Fe a diferentes flujos de Helio y 500 ml/min de Argón</i>	28
<i>Figura 27: Señales (a) y tiempos de evacuación (b) para ⁵⁶Fe a diferentes flujos de Argón y 1000 mL/min de Helio</i>	29
<i>Figura 28: Vista de la muestra dentro de la cámara de ablación indicando como se llama cada posición</i>	29
<i>Figura 29: dibujo esquemático de la muestra dentro de la cámara de ablación. Las flechas indican la dirección que sigue el Helio dentro de la cámara de ablación y su salida al ICP-MS</i>	30
<i>Figura 30: Esquemas de los tres tipos de tapas a evaluar</i>	31
<i>Figura 31: Esquema de la entrada y salida de Helio en la celda de ablación con la tapa 1</i>	31
<i>Figura 32: Perfiles LA-ICP-MS para ⁵⁶Fe en las posiciones de incidencia del láser ‘arriba’ (a) y ‘abajo’ (b)</i>	32
<i>Figura 33: Estudio de ⁵⁶Fe, posición ‘abajo’: perfil del segundo pico (disparo)</i> ...33	

<i>Figura 34: Representación de las señales (a) y los tiempos de evacuación (b) obtenidos para ⁵⁶Fe, mediante LA-ICP-MS en las diferentes posiciones de incidencia del haz láser.</i>	33
.....	
<i>Figura 35: Perfil LA-ICP-MS para ⁵⁶Fe en la posición de incidencia del láser ‘abajo’ (a). Imagen ampliada del tercero de los picos (b)</i>	34
.....	
<i>Figura 36: Representación de las señales(a) y los tiempos de evacuación (b) obtenidos para ⁵⁶Fe, mediante LA-ICP-MS en las diferentes posiciones de incidencia del haz láser.</i>	35
.....	
<i>Figura 37: Esquema de la entrada y salida de Helio en la celda de ablación con la tapa 2.</i>	35
.....	
<i>Figura 38: Perfil LA-ICP-MS para ⁵⁶Fe en la posición de incidencia del láser ‘centro’ (a). Imagen ampliada del primero de los picos (b)</i>	36
.....	
<i>Figura 39: Perfil LA-ICP-MS para ⁵⁶Fe en la posición de incidencia del láser de abajo.</i>	37
.....	
<i>Figura 40: Representación de las señales (a) y los tiempos de evacuación (b) obtenidos para ⁵⁶Fe, mediante LA-ICP-MS en las diferentes posiciones de incidencia del haz láser.</i>	37
.....	
<i>Figura 41: Perfil LA-ICP-MS para ⁵⁶Fe en la posición de incidencia del láser ‘centro’</i>	38
.....	
<i>Figura 42: Perfil para ⁵⁶Fe en la posición de incidencia del láser ‘centro’, la temperatura aumenta con el tiempo</i>	38
.....	
<i>Figura 43: Esquema de la entrada y salida de helio en la celda de ablación con la tapa 3</i>	39
.....	
<i>Figura 44: Perfil LA-ICP-MS para ⁵⁶Fe en la posición de ‘arriba’ (a). Imagen ampliada del tercer pico (b)</i>	40
.....	
<i>Figura 45: Perfil LA-ICP-MS para ⁵⁶Fe en la posición de la ‘derecha’</i>	40

<i>Figura 46: Representación de las señales (a) y los tiempos de evacuación (b) obtenidos para ^{56}Fe, mediante LA-ICP-MS en las diferentes posiciones de incidencia del haz láser (temperatura ambiente).</i>	41
<i>Figura 47: Perfil LA-ICP-MS para ^{56}Fe a 2 alturas en la posición de 'arriba'.</i>	42
<i>Figura 48: Perfil LA-ICP-MS para ^{56}Fe a 2 alturas en la posición de 'derecha'.</i>	42
<i>Figura 49: Representación de las señales (a) y los tiempos de evacuación (b) obtenidos para ^{56}Fe en las diferentes posiciones de incidencia del haz láser a 2 alturas, T^a ambiente, 50 micras.</i>	43
<i>Figura 50: Perfiles LA-ICP-MS obtenidos para ^{56}Fe a 1 altura, 50 micras y $-20\text{ }^\circ\text{C}$ en las posiciones 'derecha' (a) y 'arriba' (b).</i>	44
<i>Figura 51: Representación de las señales (a) y los tiempos de evacuación (b) obtenidos para ^{56}Fe, en las diferentes posiciones de incidencia del haz láser (1 altura y $-20\text{ }^\circ\text{C}$).</i>	44
<i>Figura 52: Vista de los diferentes cortes de la muestra en la cámara de ablación (a). Imagen ampliada del corte de hoja a analizar (b).</i>	46
<i>Figura 53: Líneas dibujadas sobre la superficie de la muestra (s). Muestra tras la ablación láser (b).</i>	47
<i>Figura 54: Imágenes obtenidas mediante LA-ICP-MS de una sección de hoja de melocotonero para ^{56}Fe (a), ^{66}Zn (b), ^{44}Ca (c) y ^{55}Mn (d).</i>	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: <i>Condiciones de medida para los estudios de optimización de flujos</i>	27
Tabla 2: <i>Condiciones de medida, tapa 1 de la celda de ablación en LA-ICP-MS.</i>	32
Tabla 3: <i>Condiciones de medida para la imagen de la muestra</i>	46

1. INTRODUCCIÓN

A lo largo de este trabajo Fin de Máster se evaluó como muestra modelo una hoja de planta para hacer estudios de “imaging” o mapeo mediante la técnica de ablación láser con plasma de acoplamiento inductivo - espectrometría de masas (LA-ICP-MS). Para ello se llevó a cabo la evaluación de una celda de ablación, desarrollada recientemente, que permita obtener imágenes con una buena resolución espacial.

1.1 IMPORTANCIA DEL HIERRO EN LAS PLANTAS

Las plantas requieren de aproximadamente 16 elementos para mantenerse sanas y funcionar correctamente. Entre los más importantes se encuentra el hierro cuya principal función es la producción de enzimas y clorofila, que es lo que le da el color verde a las hojas y hace posible la fotosíntesis. Cuando hay una deficiencia de este elemento, se disminuye la producción de clorofila, causando también una disminución de la fijación de nitrógeno, esto afecta a la capacidad de la planta para producir alimento. Su desarrollo y metabolismo también se ven afectados, lo que puede llevar a su muerte.

Esta deficiencia de hierro recibe el nombre de *Clorosis férrica*, el síntoma más importante es el cambio visual de la planta perdiendo el color verde y apareciendo un color amarillento. Este color amarillo comienza a aparecer en las puntas y progresa hacia el interior dejando vetas verdes (*figura 1*).



Figura 1: Planta con clorosis férrica

La clorosis férrica es una de las alteraciones nutricionales más importantes que se pueden encontrar en plantaciones frutales. Este desarreglo es muy frecuente en suelos

cálcicos, por ello es muy común en toda el área mediterránea donde abundan este tipo de suelos. Sin embargo, no se debe a un bajo contenido de hierro en el suelo sino a diversos factores que afectan a la disponibilidad del elemento y a su absorción y utilización por la planta. Los suelos calizos tienen un pH alto, siempre mayor de 7,5 por lo que el hierro está bastante insoluble, en forma de mineral por ello es difícil su absorción. El riego con aguas duras termina alcalinizando el sustrato y bloqueando el hierro y otros micronutrientes^{1, 2, 3}.

Uno de los principales problemas de la clorosis férrica es que afecta a un gran número de árboles frutales, disminuyendo el desarrollo de biomasa, la producción y la calidad de la fruta. Una vez que los daños se aprecian en las hojas ya es tarde para que su corrección tenga efecto sobre la producción, aunque se consigue un aumento de biomasa que mejora la cosecha de la siguiente campaña^{4, 5}.

Los cultivos más afectados son manzano, albaricoquero, peral, melocotonero, ciruelo, cerezo, viña, almendro, olivo y cítricos, y también se empieza a encontrar clorosis en plantaciones de olivo cultivado con sistemas de fertirrigación⁴.

Existen tratamientos para evitar esta enfermedad en los árboles frutales que permiten aumentos de la producción. En la *figura 2* se muestra un árbol clorótico en producción, parte de cuyas ramas han sido tratadas con productos correctores⁴.



Figura 2: Diferencias de producción en un melocotonero afectado por clorosis. Las ramas de la izquierda no han sido tratadas mientras que a las de la derecha se les ha realizado un implante de hierro en el tronco.

1.2 TÉCNICAS EMPLEADAS PARA EL ESTUDIO DE TEJIDOS VEGETALES

Los elementos esenciales juegan un papel muy importante en el desarrollo y metabolismo de las plantas. Tanto deficiencias como excesos pueden inhibir su

crecimiento, así como sus procesos metabólicos. Hoy en día los estudios de distribución de los elementos en las plantas han alcanzado un gran interés con el fin de explorar mecanismos implicados en la tolerancia y en la desintoxicación.

Las técnicas de espectrometría de masas tales como SIMS (Secondary ion mass spectrometry), MALDI-MS (Matrix-assited laser desorption/ionization mass spectrometry) y LA-ICP-MS (Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry) se han utilizado para el estudio de la distribución de elementos, especies elementales o biomoléculas en tejidos vegetales.⁶

Desde los primeros estudios en los que se aplicó la técnica MALDI-MS se han conseguido importantes mejoras en la instrumentación, lo que ha permitido aumentar la resolución espacial y la sensibilidad de análisis. Los avances en la preparación de muestras han permitido a esta tecnología su aplicación en un conjunto diverso de sistemas biológicos. Sin embargo se han introducido nuevos retos con los tiempos de adquisición de datos así como su almacenamiento y procesamiento⁷.

Por otro lado la técnica SIMS es muy útil para el análisis de superficies de células y tejidos con una alta resolución espacial. Sin embargo debido a la complejidad de los datos obtenidos, se necesita el uso de una técnica multivariante para reducir el ruido e identificar regiones de similitud espectral⁸.

La técnica LA-ICP-MS se ha establecido durante los últimos años como una técnica de imaging multielemental muy importante. Su gran ventaja es que permite el análisis directo de la muestra sólida mediante la irradiación de un haz láser sobre su superficie, además de su capacidad para proporcionar información resuelta espacialmente con una alta sensibilidad, exactitud y precisión. Tiene un menor número de efectos de matriz que las técnicas SIMS y MALDI por lo que es posible una cuantificación relativamente sencilla de los datos analíticos, empleando materiales de referencia certificados o estándares sintéticos de laboratorio con una matriz similar a la de la muestra. Es la técnica idónea para cuantificar elementos traza e isótopos dentro de secciones de un tejido ya que combina el gran poder de detección de la espectrometría de masas con fuente de plasma con la resolución espacial de un láser (10-100 μm resolución lateral y 0,1 μm resolución en profundidad)^{6, 9-12}.

Además de la gran importancia de esta técnica en el análisis de la distribución de metales y no metales en tejidos vegetales, tiene importantes aplicaciones como por ejemplo en el campo de la investigación biomédica para el estudio de tejidos de cerebro, en la investigación del cáncer, desarrollo de fármacos, y además permite estudios de bioacumulación y biodisponibilidad para la evaluación de riesgos ecológicos y toxicológicos en los seres humanos, animales y plantas^{6,13}.

En los últimos avances, se han mejorado los sistemas de ablación, operación y diseño de celdas consiguiendo progresivamente mejores resoluciones espaciales⁶.

1.3 TÉCNICA DE ABLACIÓN LÁSER CON PLASMA DE ACOPLAMIENTO INDUCTIVO-ESPECTROMETRÍA DE MASAS (LA-ICP-MS)

El proceso de análisis mediante LA-ICP-MS se divide en varias etapas. Tras la interacción entre la radiación láser focalizada sobre la muestra sólida transfiriéndola a estado gaseoso en forma de aerosol, se transporta mediante una corriente de gas portador (He o Ar) hacia la fuente de ionización ICP del instrumento ICP-MS. El aerosol generado por el láser es después vaporizado, atomizado e ionizado. Finalmente los iones cargados positivamente son analizados usando diferentes tipos de analizadores de masas, en nuestro caso se trata de un analizador de sector magnético o doble enfoque.

Las características analíticas en los análisis de LA-ICP-MS están dadas por la cantidad y estequiometría del aerosol generado por el láser, su grado de vaporización, atomización e ionización en el ICP, la transmisión de los iones a través de la interfase de vacío y las ópticas de iones en el espectrómetro de masas. Todos estos factores junto con las propiedades químicas y físicas de las muestras, son las consideraciones a tener en cuenta para un uso exitoso de la técnica^{12,13,15}.

A continuación se muestra el dibujo esquemático de todo el proceso (figura 3):

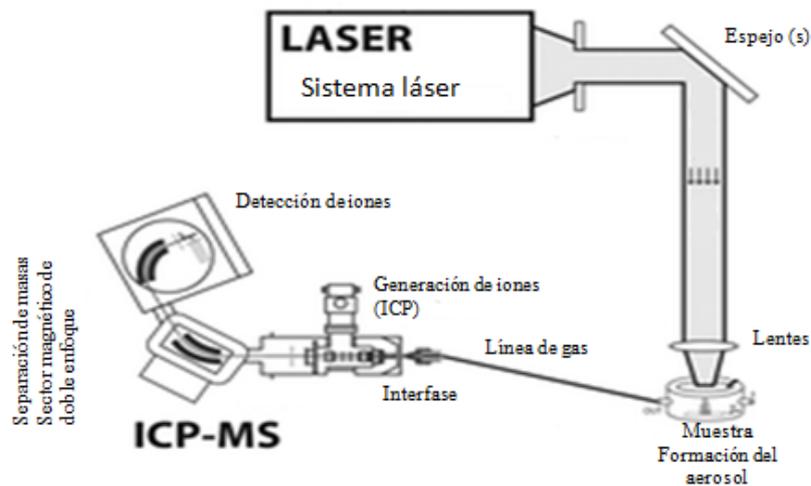


Figura 3: Diagrama esquemático de un equipo LA-ICP-MS con un analizador de sector magnético (analizador utilizado en este trabajo)¹⁵

1.3.1. ABLACIÓN LÁSER

Las principales características de la técnica de ablación láser son la simple introducción y la fácil preparación de la muestra sólida con un alto rendimiento, reduciendo así el riesgo de contaminación y pérdida, lo cual la hace una técnica importante para medidas rutinarias de materiales sólidos.

Conceptualmente, la ablación láser es un proceso simple y directo. Un haz láser de alta potencia y pulso corto se focaliza sobre la superficie de la muestra en una atmósfera de gas inerte bajo presión normal. El haz láser convierte instantáneamente un limitado volumen del sólido en un aerosol en fase gaseosa formado por los constituyentes de dicho sólido.

En general, el proceso de ablación láser comprende¹²:

- Un láser que genera un haz unidireccional de fotones de alta energía.
- Un sistema suministro del haz láser que modifica la energía del láser, la forma y diámetro del haz.
- Una celda de ablación láser donde el haz láser interactúa con la muestra sólida.

- Un sistema de transporte por transferencia del aerosol generado al espectrómetro de masas.

La palabra “laser” viene de “Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation”¹⁶. La luz es amplificada mediante la interacción con átomos o moléculas cuyo estado de activación en el medio de acción del láser es mantenido por un aporte de luz externo¹⁶.

Las principales características de la radiación láser son:

- Monocromaticidad: todos los fotones tienen la misma longitud de onda.
- Direccionalidad: el haz de radiación presenta escasa divergencia proporcionada por la disposición de una cavidad resonante.
- Coherencia: todos los fotones se encuentran en fase temporal y espacial. En la coherencia espacial las ondas están en fase en la dirección de la sección transversal del haz que emerge desde la cavidad. En la coherencia temporal, las ondas permanecen en fase a lo largo del haz. Al coincidir en una misma dirección de propagación, los estados vibracionales se suman. El resultado es la amplificación en la intensidad luminosa emitida. Su gran utilidad se debe a que es capaz de concentrar un gran número de fotones por unidad de superficie.

Para que se produzca una emisión coherente es necesario que los electrones del material emisor se desactiven al mismo tiempo y siempre entre los mismos niveles. El fenómeno por el que puede alcanzarse esta situación fue descrito por Einstein en 1917, denominado “*emisión estimulada de la radiación*”. En este experimento ocurren tres procesos: absorción, emisión espontánea y emisión estimulada. La emisión estimulada es un proceso en el cual, un fotón interacciona con un átomo excitado cuya energía es la misma que la que se desprende al desactivarse dicho átomo. Por lo tanto se produce la desactivación de este y con ello la emisión de un fotón idéntico al primero en frecuencia, fase y dirección.

1.3.1.1 PRODUCCIÓN DE LA RADIACIÓN LÁSER

Las partes de un sistema de emisión láser son: un medio activo, un sistema de bombeo y una cavidad resonante. Cuando los átomos de dicho medio se desactivan, se

genera una radiación monocromática, esto se estimula en presencia de otra radiación con la misma longitud de onda. El sistema de bombeo se encarga de aportar la energía suficiente para la excitación de los átomos, y por último, la cavidad resonante, la cual está constituida por dos paredes reflectantes paralelas, consigue un gran flujo de fotones en la misma dirección. Uno de los espejos de la cavidad resonante, parcialmente reflectante, permite la emisión de un haz de radiación con escasa divergencia. Además, los fotones que se encuentran en resonancia, a su paso por el medio activo, estimulan la emisión de más radiación. Sólo los fotones que se desplazan en forma estrictamente paralela al eje de la cavidad experimentan más de un par de reflexiones por lo que sólo ellos son amplificados; todos los demás simplemente se desvanecen en el entorno.^{17, 18}

En la siguiente figura se muestran los procesos que ocurren en la generación de una radiación láser (*figura 4*):

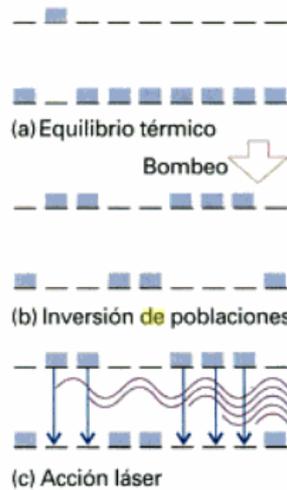


Figura 4: Ilustración esquemática de los pasos que llevan a la acción láser¹⁸. (a) La población, tiene más átomos en el estado fundamental. (b) Cuando el estado inicial absorbe, la población se invierte (los átomos son bombeados al estado excitado). (c) Cuando un fotón es emitido, estimula a otro y así sucesivamente.

1.3.2. PLASMA DE ACOPLAMIENTO INDUCTIVO CON DETECCIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS (ICP-MS)

La espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) es descrita como una técnica sensible y poderosa en el análisis multielemental²⁰. Es una herramienta muy potente para la determinación cuantitativa de metales y no metales en una amplia variedad de muestras a niveles de concentración de traza (ppm-ppb) y ultra-traza (ppb-ppq). El ICP-MS es capaz de, mediante el análisis de numerosos elementos

de la muestra, proporcionar una huella de esta, por ejemplo en el análisis de productos alimenticios permite saber el origen geográfico de estos, del mismo modo se ha aplicado a otros muchos tipos de muestras²¹.

A continuación se describen brevemente los diferentes componentes de un equipo ICP-MS:

1.3.2.1. Sistema de inyección de la muestra

La muestra es introducida en el equipo mediante una bomba peristáltica, una vez absorbida, se introduce mediante un nebulizador en la cámara de nebulización. El nebulizador forma pequeñas gotas de muestra mediante el efecto Venturi.

El efecto Venturi se explica de la siguiente forma: la muestra, al desplazarse por el tubo interno del nebulizador hace disminuir la presión sobre las paredes de este. Un tubo externo se conecta a la salida de gas portador, argón, de modo que este entra por la disminución de presión y arrastra la muestra originándose en la salida una nube formada por pequeñas gotas de muestra y gas portador. La cámara de nebulización, de cuarzo, está rodeada de una celda enfriada mediante un sistema Peltier a 3 °C para favorecer la formación de las gotas^{22, 23}. A continuación en la *figura 5* se muestra una fotografía de la cámara de nebulización y un esquema del nebulizador:

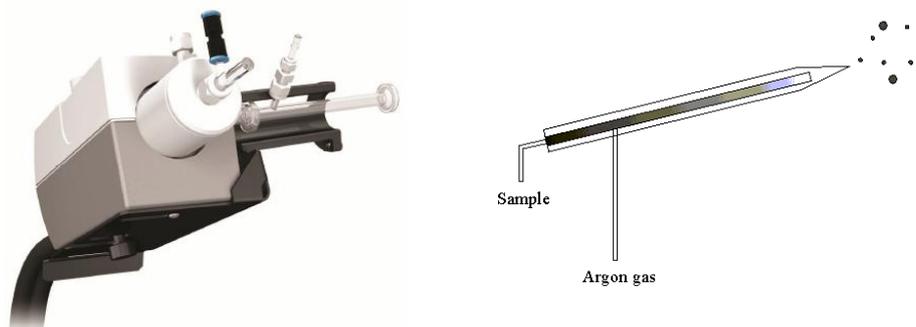


Figura 5: Cámara de nebulización y nebulizador de un sistema^{24,25}

1.3.2.2. Sistema de ionización: Plasma de acoplamiento inductivo (ICP)

La muestra, en forma de un fino aerosol creado en la cámara de nebulización, se introduce a través del canal central del plasma a una temperatura de 6000-8000 K, donde inmediatamente el aerosol de la muestra es desolvatado, vaporizado, atomizado e ionizado²⁴.

La antorcha del plasma está formada por tres tubos concéntricos de cuarzo a través de los cuales fluyen corrientes de Argón y está rodeada por una espiral de 2-4 vueltas que genera una radiofrecuencia. En ella se genera el plasma y se ioniza la muestra. El plasma se produce porque una chispa de alto voltaje provoca la formación de iones Ar^+ y e^- en las paredes del tubo más externo creando el plasma. La radiofrecuencia origina colisiones no elásticas entre ambos dando lugar a más iones del gas portador. La resistencia al movimiento genera calentamiento por lo tanto en el núcleo del plasma se alcanzan temperaturas de 10000 K. Entonces el plasma de Argón excita los iones positivos de los átomos de la muestra y los ioniza²⁶. A continuación, en la *figura 6* se muestra la antorcha de ICP:

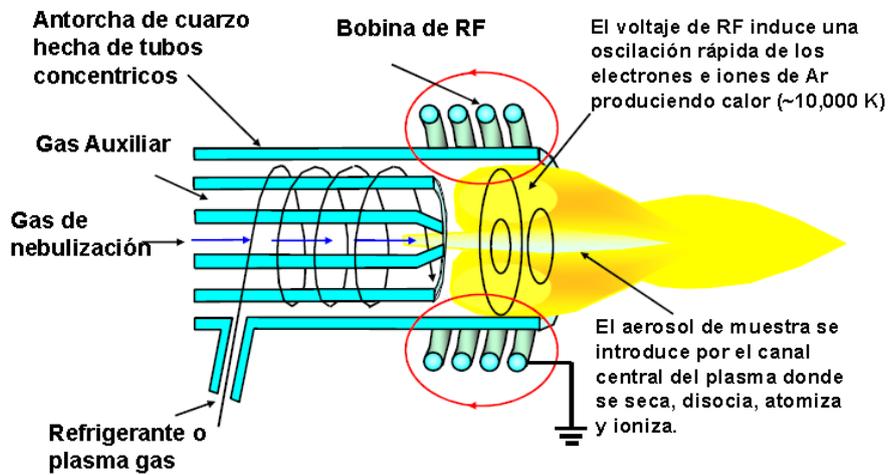


Figura 6: Antorcha de ICP²⁵

En la siguiente figura se puede ver como se desolvata el aerosol de la muestra, se vaporiza, atomiza y por último se ioniza (*figura 7*):

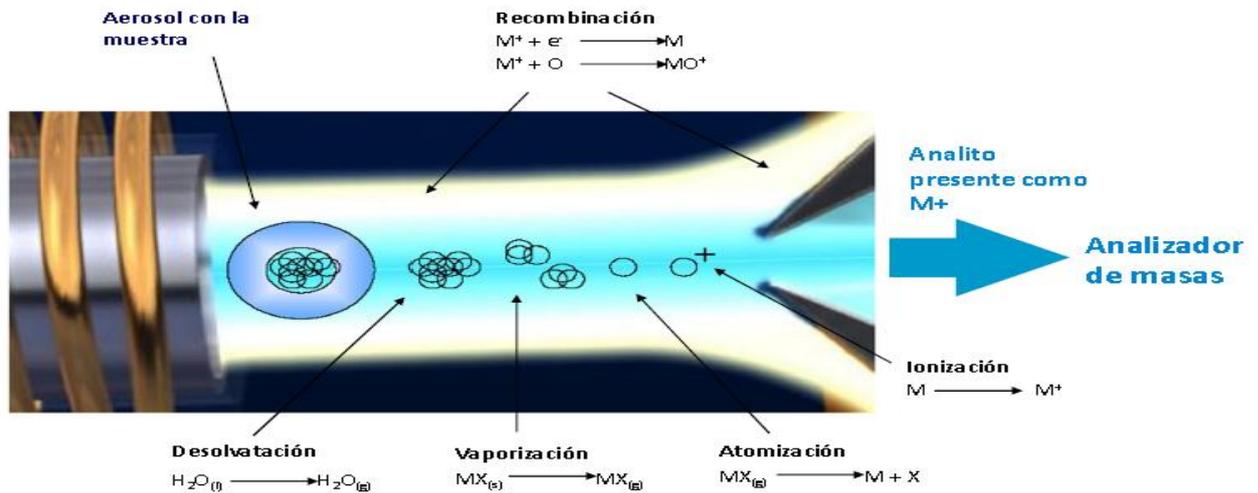


Figura 7: Esquema de los procesos que sufre la muestra en el ICP²⁵

1.3.2.3. Interfase

La introducción de los iones, generados en el plasma, dentro del sistema de detección tiene una gran dificultad debido a que el plasma opera a presión atmosférica mientras que el analizador de masas y el detector están a alto vacío. Como solución a este problema se requiere de una interfase que permita el acoplamiento de estas dos partes del sistema.

Esta región de vacío intermedio se crea mediante dos conos metálicos, el cono de muestreo (*sampler*) y el cono separador (*skimmer*). Estos conos son discos de metal, con un pequeño agujero en el centro. La parte central del haz de iones procedente de la antorcha pasa por el centro del cono de muestreo a una cámara a menor presión donde se produce una expansión rápida del gas lo que provoca su enfriamiento. A continuación, una fracción de este gas pasa por el cono de separación hasta una cámara mantenida a la presión del espectrómetro de masas. En esta cámara el gas es separado de los iones positivos y bombeado hacia afuera. Los cationes son enfocados al espectrómetro de masas^{22,26-28}. En la figura 8 se puede ver la disposición de la interfase en un esquema del ICP-MS:

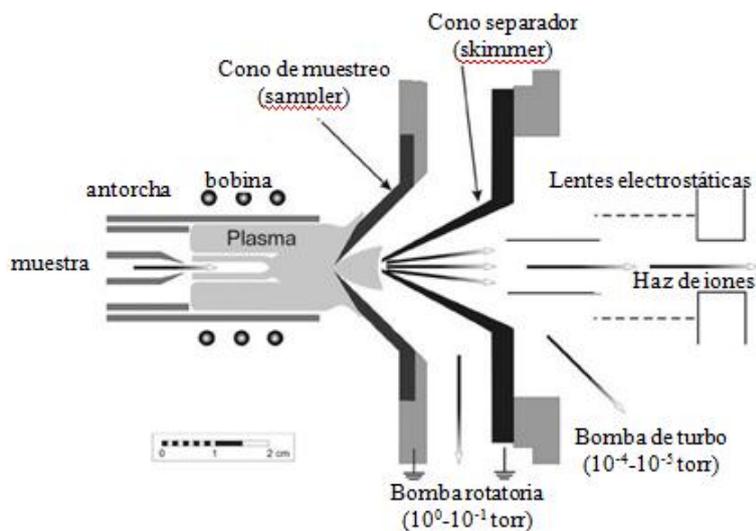


Figura 8: Interfase de un sistema ICP-MS²⁷

1.3.2.4. Lentes iónicas

Las lentes iónicas son placas electrostáticas situadas en la zona intermedia, que enfocan el haz de iones que proviene del cono *skimmer*. Se lleva a cabo mediante un voltaje que hace que se atraigan los iones positivos del plasma y así poder manipular su trayectoria. Además separa los iones de las especies neutras y de los fotones gracias a los campos electrostáticos creados²⁶.

1.3.2.5. Analizador de masas:

Existen varios tipos de analizadores de masas en los sistemas de ICP-MS como por ejemplo el de tipo cuadrupolo, tiempo de vuelo etc. En el presente Trabajo Fin de Máster únicamente se explicará el analizador de masas de **sector magnético o doble enfoque** ya que es el que se utiliza.

Este tipo de analizador de masas consiste en aplicar un campo eléctrico y un campo magnético al haz de iones que viene del plasma. El campo eléctrico se encarga de acelerar los iones adquiriendo energía cinética, y por lo tanto actúa como filtro energético. Por otro lado el campo magnético ejerce una fuerza lateral que desvía a los iones de su trayectoria según su cantidad de movimiento y el radio de curvatura que describan.

Variando el campo magnético en función del tiempo los iones de distinta masa en orden creciente o decreciente se detectarán secuencialmente. Aquellos iones que posean el mismo radio de curvatura que el valor del campo magnético aplicado irán al detector.

Este método se caracteriza por su elevada sensibilidad, elevada resolución y un amplio rango de masas²⁹.

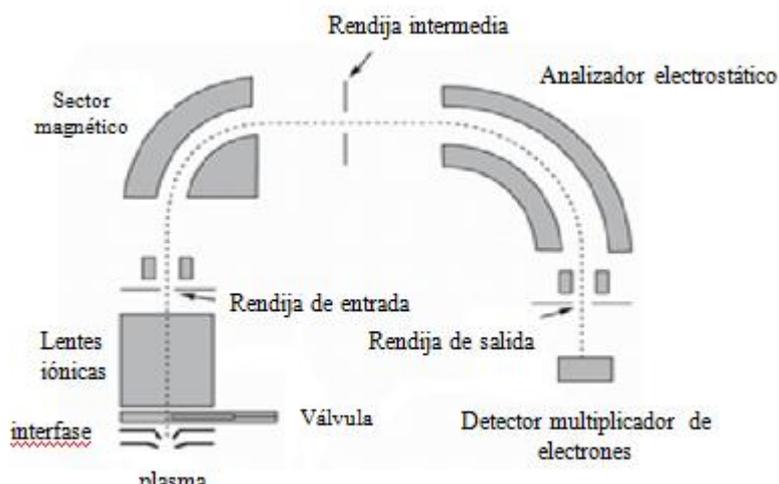


Figura 9: Esquema de funcionamiento de un analizador de masas de sector magnético.²⁴

1.3.2.6. Detector: multiplicador de electrones

Este detector está constituido por una serie de dínodos conectados a potenciales cada vez mayores conforme se va recorriendo su interior. Una vez que los iones salen del analizador, son atraídos por el alto voltaje aplicado al interior del detector; cuando un ión entra y colisiona con la superficie del primer dínodo, se emiten electrones secundarios que son atraídos por la siguiente diferencia de potencial y así sucesivamente. Se van generando cada vez más electrones secundarios ya que se produce un efecto en cascada. La amplificación que logra este tipo de detectores llega hasta 10^8 por cada ión de entrada, esto se traduce en altos niveles de sensibilidad²².

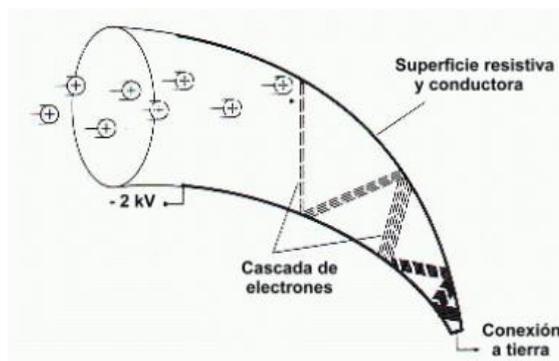


Figura 10: Dibujo esquemático de un multiplicador de electrones²⁹

1.3.3. LIMITACIONES DE LA TÉCNICA LA-ICP-MS.

A pesar de la gran cantidad de aplicaciones exitosas de LA-ICP-MS, el fraccionamiento elemental e isotópico son las principales limitaciones de esta técnica en numerosas aplicaciones³⁰. El fraccionamiento se define como los efectos no estequiométricos en las señales transitorias¹⁰. La ablación láser tradicionalmente emplea sistemas tales como Nd:YAG con un rango de longitudes de onda desde el infrarrojo (IR) hasta UV. Este tipo de láseres producen pulsos con una anchura de pulso que típicamente va entre 3 y 20 nanosegundos. En este tipo de sistemas se pueden producir tres tipos de fraccionamiento inducido por el láser:

- Fraccionamiento debido a la evaporación de elementos volátiles en el gas portador. Este tipo de fraccionamiento afecta principalmente a los elementos que se encuentran en forma metálica como el Au, Ag, Zn etc. mientras que los elementos refractarios, es decir, los elementos con altas temperaturas de condensación están menos afectados^{19, 30}.

- Fraccionamiento elemental relacionado con el tamaño de las partículas. Se caracteriza por la relación $^{232}\text{Th}/^{238}\text{U}$, que aunque ambos elementos tienen potenciales de ionización parecidos, se observa un fraccionamiento significativo que se correlaciona con la distribución del tamaño de partícula del aerosol.

- Fraccionamiento isotópico inducido por el láser durante la ablación. Este tipo afecta a los isótopos pesados estables de Fe, Cu y Mg³⁰.

Otra limitación importante en la técnica LA-ICP-MS está relacionada con la etapa de cuantificación debido a los efectos de matriz. Para minimizar los efectos de matriz, es necesario utilizar patrones para la calibración con la misma matriz que la muestra¹². Cabe destacar que los estudios llevados a cabo durante los últimos años con el fin de minimizar los efectos de fraccionamiento así como los efectos de matriz se basan principalmente en el uso de láseres con longitudes de onda más cortas (UV vs IR) y pulsos más cortos (fs vs ns).

El uso de pulsos de láser ultracortos (p.e. en el régimen de los fs) permite un mejor confinamiento de energía del pulso garantizando mejores resultados en la resolución espacial. Por un lado el uso de pulsos más cortos, en el rango de los femtosegundos, hace que la ablación láser sea predominantemente no térmica causando de este modo menos daños colaterales eliminando los efectos de fraccionamiento y la gran dependencia de la matriz de la muestra. Además, el uso de pulsos cortos proporciona tamaños de partícula más pequeños en el aerosol y no hay interacciones láser-plasma, de modo que garantiza una mejor resolución espacial y mejora el análisis¹².

En cuanto a la longitud de onda, existen investigaciones que demuestran que el uso de longitudes de onda más cortas, UV, mejora significativamente las características de ablación especialmente para materiales transparentes³¹.

1.4 CELDAS DE ABLACIÓN EMPLEADAS EN LOS SISTEMAS DE ABLACIÓN LÁSER

Como se comentó anteriormente, una de las aplicaciones más novedosas y con mayor auge en los últimos años de la técnica LA-ICP-MS son los estudios de imaging o de mapeo para estudiar la distribución elemental de elementos esenciales y traza en diferentes tipos de muestras (p.e. secciones de tejidos biológicos o bio-médicos). En este tipo de muestras es muy importante tener en cuenta su preparación, así como la posible pérdida de metales de los tejidos durante el proceso. Actualmente hay dos tipos de procedimientos estándar empleados para la preparación de secciones de tejidos biomédicos:

- Fijación del tejido en formalina y posteriormente embebido del mismo en parafina.

- Congelación de la muestra en el estado nativo a temperaturas inferiores a -40°C .

Se ha demostrado que las concentraciones de algunos metales en muestras tratadas del primer modo, es menor a las concentraciones detectadas en muestras criogénicas preparadas de forma nativa³². Esto puede deberse a la lixiviación de los metales de los tejidos en la disolución de formalina o durante el proceso de inclusión en parafina. El método de congelación del tejido protege el estado nativo de la muestra, por lo que es el método ideal para la preparación de muestras. Este hecho ha llevado a diseñar celdas de ablación que permitan trabajar a baja temperatura para asegurar tanto la integridad de las muestras como la exactitud de los análisis.

A continuación se enumeran tres cámaras criogénicas disponibles comercialmente:

- Cyocell System 10 de GeoMed Analytical, LLC (Boston, USA).
- CryoLAC de W.Ludolph GmbH (Alemania).
- Cryocell de New Wave Research, Electro Scientific Industries Europe Ltd.

Además se han propuesto otros tres diseños por Feldmann y col.²⁸, Becker y col.³⁰ y Müller y col.²⁹. Todas ellas tienen el control de temperatura en la superficie de la celda o en el soporte de la muestra pero no en la muestra directamente como sería lo ideal.

- Celda criogénica de Feldmann y col.³³: En la parte inferior dispone de un sensor y un serpentín de cobre. De este modo se controla la temperatura. El rango de temperatura disponible está entre -20 y -100°C . A continuación se muestra la imagen de dicha celda en la *figura 11*:

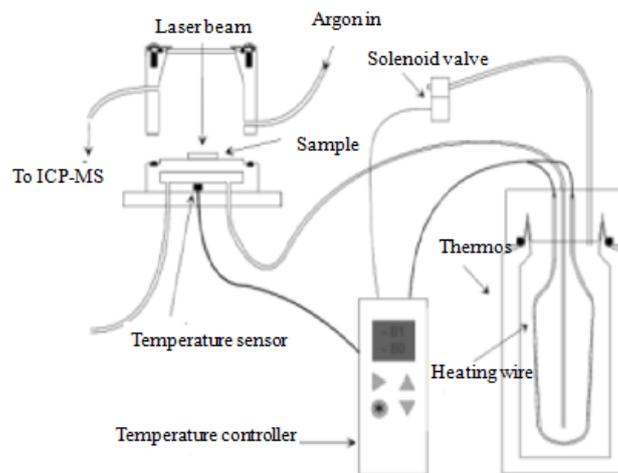


Figura 11: Dibujo esquemático de la celda de Feldmann y col.³³

- Celda criogénica de Becker y col³⁴: El sistema de enfriamiento de esta cámara se lleva a cabo usando dos elementos Peltier conectados bajo el soporte de aluminio. El esquema de la celda se muestra en la *figura 12*:

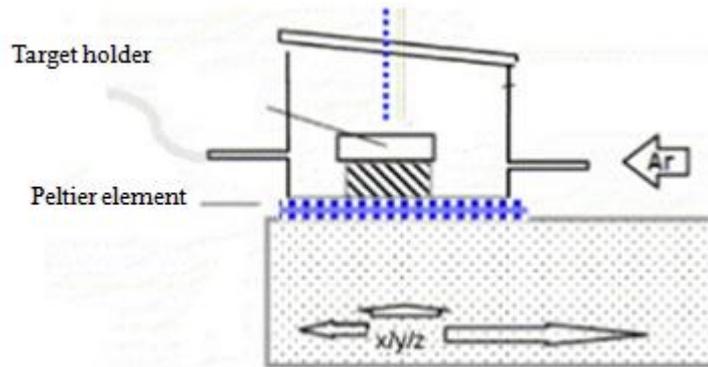


Figura 12: dibujo esquemático de la cámara criogénica desarrollada por Becker y col.³⁴

2. OBJETIVOS

El objetivo del presente proyecto Fin de máster es la evaluación de una celda de ablación criogénica desarrollada recientemente en el grupo de investigación de Espectrometría Analítica de la Universidad de Oviedo^{35, 36} para realizar estudios de imaging con una alta resolución espacial en tejidos biológicos y biomédicos empleando la técnica LA-ICP-MS. Este objetivo principal se abordó a través de los siguientes objetivos específicos:

- Evaluación de tres tapas posibles para la celda criogénica mencionada anteriormente. Para ello se evalúa el efecto que tienen la posición de incidencia del haz láser sobre la muestra, la Temperatura, la altura de la muestra y el diámetro del haz láser sobre la señal, tiempo de evacuación y reproducibilidad. Para estos estudios se empleó un vidrio homogéneo como muestra modelo.

- Tras seleccionar el diseño más adecuado para llevar a cabo estudios de imaging con la celda de ablación, se llevó a cabo el análisis de una muestra de interés biológico: secciones transversales de corte de hoja de melocotonero para el estudio de la distribución de hierro y otros metales esenciales en la hoja.

Además de estos objetivos, podríamos destacar como objetivos del Trabajo Fin de Máster:

- La familiarización con la técnica de imaging mediante LA-ICP-MS.
- El tratamiento de datos correspondiente.
- La búsqueda bibliográfica de estudios anteriores para desarrollar el presente trabajo.

3. EXPERIMENTAL

3.1 MUESTRAS

Se van a emplear dos tipos de muestras en el presente trabajo:

En primer lugar con el fin de optimizar las condiciones y evaluar las diferentes tapas posibles para la celda de ablación se utiliza un vidrio homogéneo, en concreto se trata de un portamuestras.

En segundo lugar, para realizar la imagen mediante LA-ICP-MS de un tejido vegetal se va emplear una hoja de melocotonero proporcionada por el Departamento de Nutrición Vegetal, estación Experimental de Aula Dei, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de Zaragoza con el fin de estudiar su contenido y distribución de hierro. Dichas muestras proceden de un estudio en que se están evaluando diferentes tipos de tratamientos con fertilizantes para estudiar la incorporación de hierro en las hojas y, por lo tanto, minimizar la clorosis férrica en las mismas.

3.2 INSTRUMENTACIÓN LA-ICP-MS

3.2.1 ICP-MS

El modelo del equipo utilizado es *Thermo Scientific Element 2*. En la *figura 13* se puede ver una fotografía del ICP-MS empleado durante el Trabajo Fin de Máster.



Figura 13: Equipo ICP-MS “Thermo Scientific Element 2”

A continuación se enumeran las diferentes partes del equipo:

- Sistema de inyección (figura 14): Nebulizador (1); bomba peristáltica (2)

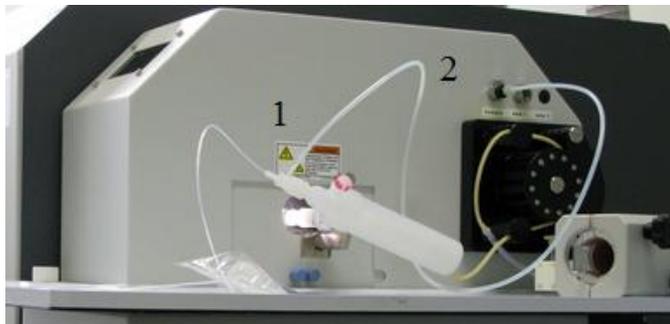


Figura 14: Nebulizador (1); bomba peristáltica (2)

- Sistema de ionización: antorcha de cuarzo y bobina de inducción.
- Interfase: Cono de muestreo (*sampler*) y cono separador (*skimmer*) de Ni.
- Analizador: sector magnético o doble enfoque.
- Detector: multiplicador de electrones.

Diariamente, antes de acoplar el láser y empezar a medir, es necesario llevar a cabo una serie de pasos para preparar el equipo. A continuación se describe el protocolo seguido para la optimización de sistema.

- Se colocan los tubos para la aspiración de la muestra y evacuación de la cámara de nebulización alrededor de la bomba peristáltica (se tiene en cuenta que gira en el sentido de las agujas del reloj), de tal manera que la muestra sea adsorbida hacia el inyector. Se hace pasar una disolución de HNO_3 para la limpieza del equipo.

- Se enciende el equipo mediante el software *Instrument* mientras se hace pasar una disolución de ácido nítrico.

- **Tuning del ICP-MS**: se trata de comprobar el buen funcionamiento del equipo. Para ello se introduce una disolución de concentración 1 ppb de varios elementos (^7Li , ^{49}In , ^{238}U), se realiza la medida y se comparan las señales con las obtenidas en días anteriores. El software para realizar esta operación es *tune*, este equipo permite medir a alta, media o baja resolución lo cual ayuda a eliminar interferencias aunque se pierde un orden de magnitud en la señal. Para cada resolución se obtienen las señales para los elementos de la disolución citados anteriormente y se optimiza la posición de la

antorcha y el flujo de Ar para obtener la mayor sensibilidad. Para nuestros estudios seleccionaremos ^{56}Fe como analito modelo por lo cual trabajaremos a media resolución. El isótopo mayoritario del hierro (^{56}Fe) presenta interferencias poliatómicas con p.e. $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$ por lo que es necesario trabajar a media resolución (4000) para poder medir nuestro analitos sin la presencia de posibles interferencias.

3.2.2. LÁSER

El sistema de ablación láser utilizado es el equipo comercial *LSX-213* (Cetac Technologies).



Figura 15: Sistema de ablación láser LSX-213 (Cetac Technologies)

Tras haber realizado el tuning en el equipo ICP-MS, ya se puede acoplar el sistema de ablación láser. Con el plasma apagado, son tres las conexiones que deben hacerse:

- Conexión entre el láser y el ICP-MS: Antes de ello se desconectan las conexiones del flujo quitando la cámara de nebulización. Se conecta la salida del aerosol creado en el láser con la entrada de muestra en el equipo ICP-MS. *Figura 16:*



Figura 16: Interfase de conexión láser-ICP-MS

- Conexión de la salida de Helio con el equipo de ablación láser, para que este actúe como gas portador arrastrando el aerosol creado en la celda de ablación. *Figura 17:*



Figura 17: conexión salida de Helio- sistema de ablación láser

- Conexión entre la salida de Argón (previamente desconectada del nebulizador) del equipo de ICP-MS con el sistema de ablación láser. *Figura 18:*



Figura 18: Conexión salida Argón (ICP-MS)- sistema de ablación

Una vez hechas todas las conexiones ya se empieza a comprobar el funcionamiento del equipo de ablación láser conectado al equipo de ICP-MS:

- **Tuning del láser:** se lleva a cabo la ablación láser y posterior medida del material de referencia NIST-612. Se lleva a cabo la medida de los elementos ^{139}La , ^{59}Co , ^{238}U y ^{232}Th ajustando las condiciones óptimas de calibración del equipo. Se observan las señales y se ajusta la posición de la antorcha de modo que la relación

$^{238}\text{U}/^{232}\text{Th}$ esté en torno a 1 para evitar el fraccionamiento elemental. La concentración de ambos elementos en la muestra es similar y su masa también por lo tanto la relación debe ser aproximadamente 1.

- Introducción y medida de la muestra: En la imagen de la *figura 19* se muestra la vista de la muestra dentro de la celda de ablación:

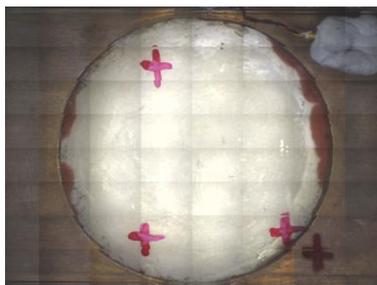


Figura 19: Vista de la muestra dentro de la cámara de ablación (nuestra muestra modelo es un vidrio transparente al que se le hacen unas marcas en rojo para poder focalizar bien la posición de la superficie)

Hay diferentes formas de llevar a cabo la ablación de la muestra, en línea (“single line”) o en punto (“single point”). En la imagen de la *figura 20* se muestran ambos tipos de análisis:

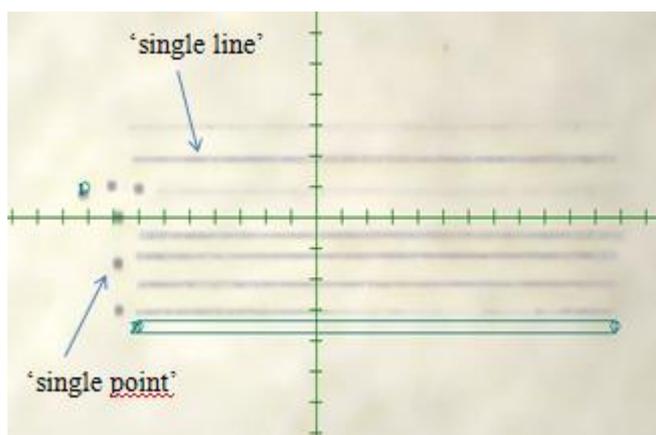
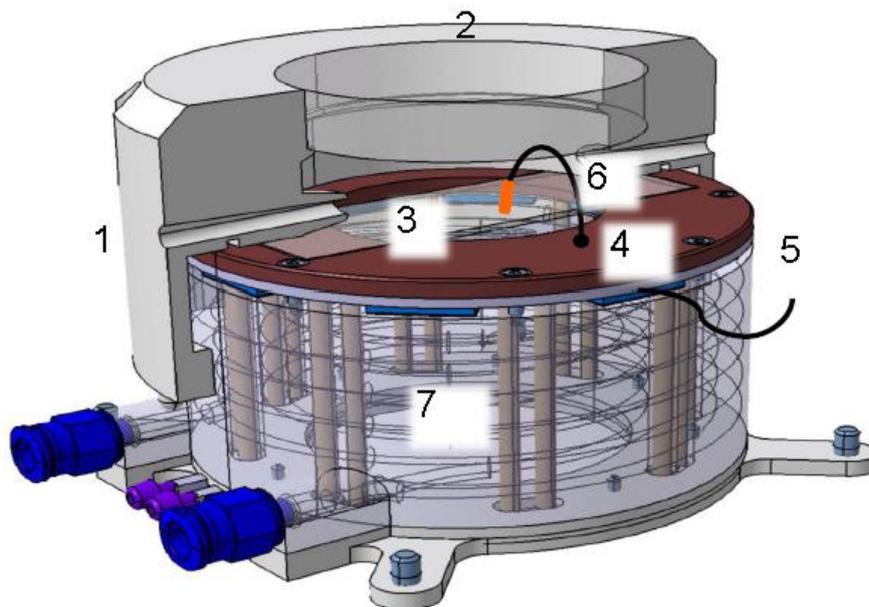


Figura 20: Ablación láser modo 'single line' y 'single point'

3.2.3. CÁMARA DE ABLACIÓN CRIOGÉNICA

En el presente trabajo se utiliza una celda criogénica^{35,36} desarrollada recientemente en el grupo de investigación de Espectrometría Analítica que dispone de un control de temperatura de la propia muestra a diferencia de las celdas descritas en la bibliografía. En la *figura 21* se muestra el diseño de la celda de ablación (1), la cual está fabricada con poliamida porque es un excelente aislante térmico y eléctrico. La muestra a analizar se coloca en una platina microscópica (3) que se encuentra sobre una plataforma de un plato de cobre (4). Este plato es refrigerado por un sistema de refrigeración interno circular que incluye ocho peltiers (5) situados debajo del plato y que se controla mediante un termopar flexible (6). Esta celda dispone además de un sistema intercambiador de calor externo (7) para extraer el calor generado que se localiza debajo del sistema de refrigeración interno.



*Figura 21: Celda de ablación criogénica con control de la temperatura de la muestra*³⁵

Tal sensor de temperatura es un alambre fino y flexible que permite ser puesto en cualquier posición deseada, por ejemplo, sobre la superficie de la muestra (*figura 22*). El termopar está cubierto por “blu tack” para que se mida únicamente la temperatura de la muestra pero que no se caliente con el Helio que circula por el interior de la cámara y

que está a temperatura ambiente. De esta forma se puede asegurar un riguroso control de la superficie de la muestra hasta los $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

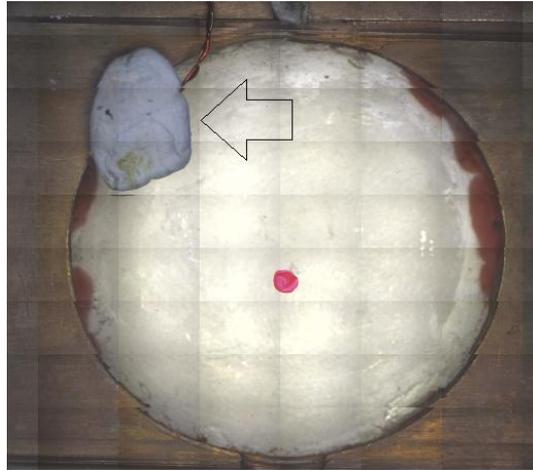


Figura 22: Vista de la muestra dentro de la celda donde se ve el termopar sensible que controla la temperatura de la superficie de la muestra.

En esta celda el refrigerador es un serpentín de refrigeración por el cual circula el líquido refrigerante que es enfriado por un sistema de refrigeración externo, todo ello se muestra en la *figura 23*:

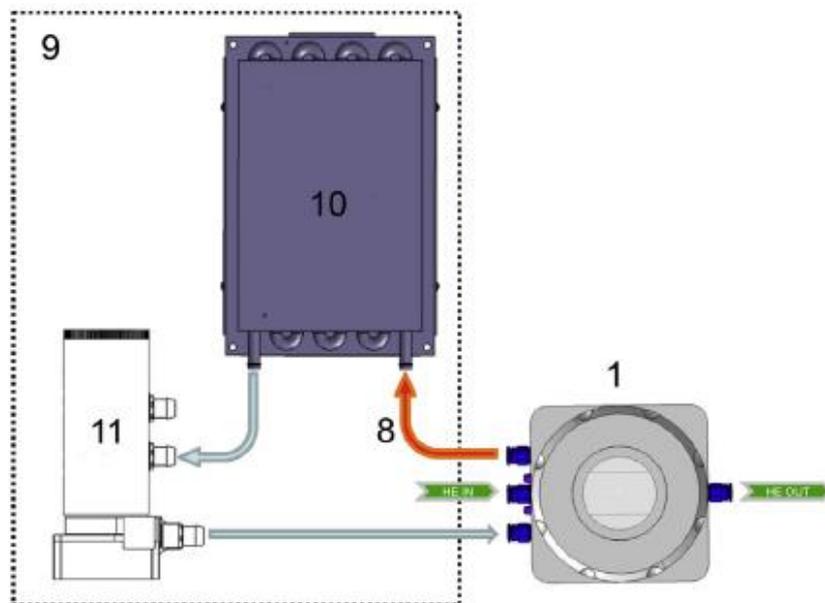


Figura 23: Celda de ablación con el sistema de refrigeración externo y el circuito que sigue el líquido refrigerante.

El fluido refrigerante (polypropylene glycol) (8) es bombeado a través de la bobina de enfriamiento que está debajo de 8 elementos Peltier del sistema de refrigeración

interno que se encarga de extraer el calor generado. El líquido refrigerante es enfriado por un sistema de refrigeración externo (9) que incluye un sistema Peltier externo (10) que utiliza aire como medio para enfriar y un motor eléctrico (11) que bombea el fluido por el sistema. El líquido refrigerante circula por el interior de unos conductos aislantes que se conectan con la base de la celda mediante un sistema de conexión. De esta forma el fluido refrigerante es enfriado por el intercambiador externo después de que este haya extraído el calor del sistema de refrigeración interno, asegurando así que la temperatura de la muestra permanece siempre constante.

A continuación en la *figura 24* se muestra la vista global de todo el equipo utilizado:



Figura 24: Vista global de todo el equipo empleado; celda criogénica, sistema de ablación láser (LSX-213) e ICP-MS de alta resolución (Element II)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES DE ANÁLISIS

A la hora de llevar a cabo un análisis por LA-ICP-MS hay que hacer una optimización detallada tanto de las condiciones de ablación (p.e. energía del haz, frecuencia de repetición, diámetro del haz láser, etc.) como de los flujos de gas portador. En nuestro sistema de ablación láser hay que optimizar tanto el flujo de He (gas de arrastre que pasa por el interior de la celda de ablación) como del Ar (se une al flujo de He que transporta el aerosol con partículas procedente de la muestra a la salida de la celda de ablación, antes de entrar en el ICP-MS).

- Optimización de los flujos de Helio y Argón

Se va a llevar a cabo la optimización de los flujos de Helio y Argón y para ello se van a utilizar diferentes flujos de cada uno de ellos y se evaluará la señal de ^{56}Fe en el análisis de un vidrio homogéneo (portamuestras).

Los parámetros que se van a tener en cuenta son:

- Sensibilidad de la medida: a mayor intensidad de la señal va a ser mejor, así para concentraciones bajas del elemento en la muestra se va a detectar.
- Tiempo de evacuación: es el tiempo que tarda la señal en decaer desde su señal máxima hasta el 10%. A menor tiempo de evacuación más rápida será la evacuación del aerosol de la celda de ablación por lo que se obtendrán mejores resoluciones laterales en estudios de imaging. Habrá menor mezcla de información procedente de diferentes disparos del haz láser.

Los elementos que se monitorizan de la muestra son ^{23}Na , ^{24}Mg , ^{27}Al , ^{28}Si , ^{39}K , ^{44}Ca y ^{56}Fe . Sin embargo, a modo de ejemplo se muestran los perfiles, señales y tiempos de evacuación para ^{56}Fe ya que es el elemento que se va a medir posteriormente en la muestra de hoja en los estudios de imaging.

Como se comentó anteriormente, se puede trabajar con el láser en modo ‘single point’ y ‘single line’. Sin embargo, como nuestro objetivo es evaluar tanto sensibilidad como tiempos de evacuación con las diferentes tapas se trabajará con el modo single point ya que es más significativo para ver señales individuales del láser. En estos

primeros estudios de optimización de las condiciones se dará un cierto número de disparos con el objetivo de tener una señal significativa para el ^{56}Fe .

Las condiciones de medida utilizadas se encuentran recogidas en la *tabla 1*:

Tabla 1: Condiciones de medida para los estudios de optimización de flujos

<i>Elemento a medir</i>	^{56}Fe
<i>Diámetro del haz láser</i>	50 micras
<i>Energía del láser</i>	70 % (3,9 mJ)
<i>Frecuencia</i>	10 Hz
<i>Nº disparos (mismo punto)</i>	100

A continuación se muestra el perfil de ^{56}Fe obtenido para el análisis del vidrio por LA-ICP-MS con unas condiciones de flujo de 900 mL/min de Helio y 500 mL/min de Argón (*figura 25*):

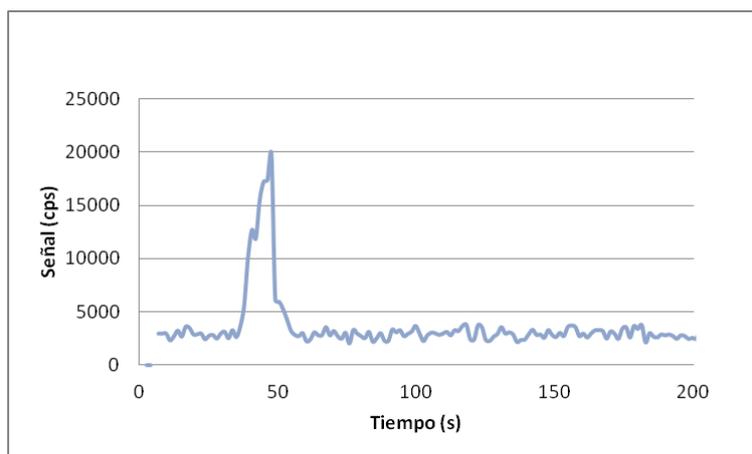


Figura 25: Perfil de ^{56}Fe obtenido empleando los flujos 900 mL/min He y 500 mL/min Ar.

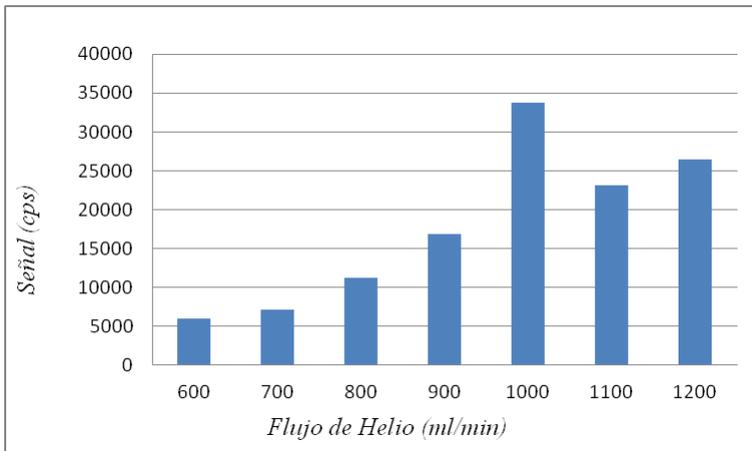
A continuación se llevan a cabo las optimizaciones de los flujos de Helio y Argón, con la posición de incidencia del láser sobre la muestra en el centro de la cámara de ablación:

- **Optimización del flujo de Helio**

Se fija un valor fijo para el flujo de Argón, en este caso se usa un flujo de 500 mL/min, y se varían los valores del flujo de Helio entre 600-1300 mL/min.

En cada medida se toman como datos a evaluar la señal neta (cps) y el tiempo de evacuación (s). A continuación en la *figura 26* se muestra el resumen de resultados para todos los flujos de Helio evaluados.

(a)



(b)

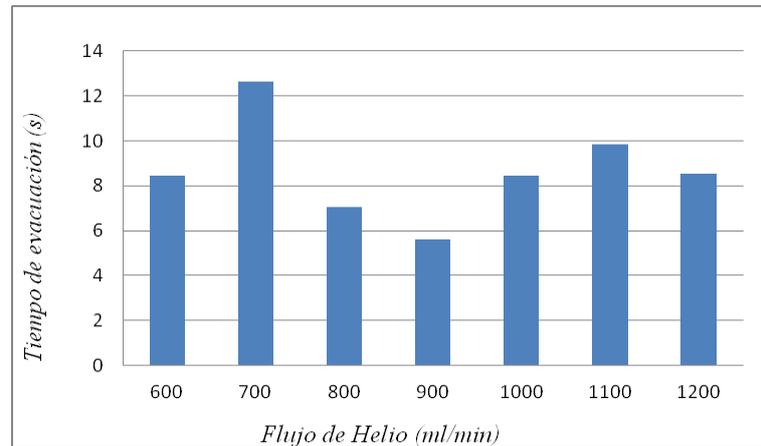


Figura 26: Señales (a) y tiempos de evacuación (b) para ^{56}Fe a diferentes flujos de Helio y 500 ml/min de Argón

Como se puede observar en la *figura 28*, la señal más alta se consigue a un flujo de Helio de 1000 mL/min. Respecto al tiempo de evacuación todos ellos muestran valores similares alrededor de 8 segundos. Se seleccionó un flujo óptimo de Helio es 1000 mL/min.

- **Optimización del flujo de Argón**

Tras haber elegido un flujo óptimo de Helio a 1000 mL/min, se fija este valor y se varían los flujos de Argón: 300, 400, 500, 600, 700 mL/min. Se han obtenido los siguientes valores de señal (cps) y de tiempos de evacuación (s) (*Figura 27*).

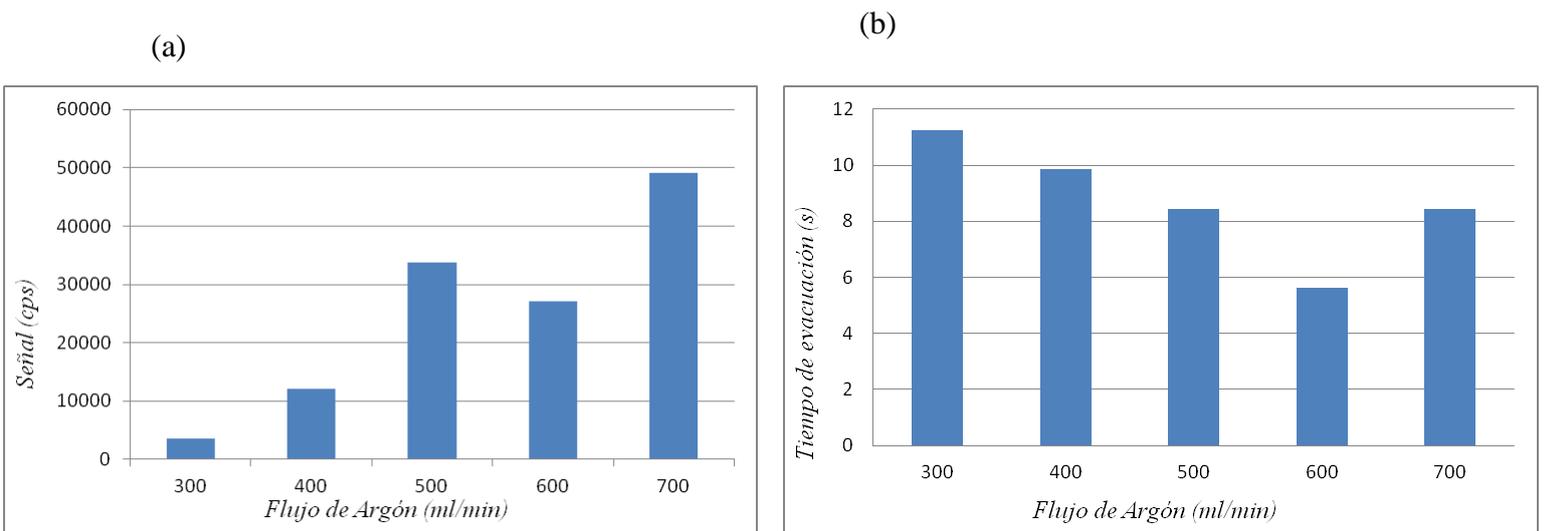


Figura 27: Señales (a) y tiempos de evacuación (b) para ^{56}Fe a diferentes flujos de argón y 1000 mL/min de helio

Tras observar los resultados se puede ver que la señal obtenida para un flujo de Argón de 700 mL/min es significativamente más alta y el tiempo de evacuación está alrededor de los 8 s. Por lo tanto es el flujo óptimo elegido de Argón es 700 ml/min.

Aunque la optimización de los flujos de gas se hizo colocando la muestra en la posición central de la celda de ablación, uno de los parámetros a evaluar con las diferentes tapas es la posición de la muestra. En la figura 28 se muestra una imagen donde se describen las diferentes posiciones de la muestra dentro de la celda.



Figura 28: Vista de la muestra dentro de la cámara de ablación indicando como se llama cada posición.

Cabe destacar que aunque esta sea la imagen que proporciona la cámara del sistema láser, la imagen está invertida por lo que en la *figura 29* se muestra dónde está la entrada de He y la salida del aerosol de la celda de ablación.



Figura 29: Dibujo esquemático de la muestra dentro de la cámara de ablación. Las flechas indican la dirección que sigue el Helio dentro de la cámara de ablación y su salida al ICP-

4.2. EVALUACIÓN DE DIFERENTES TAPAS PARA LA CELDA DE ABLACIÓN

A continuación se va a llevar a cabo la evaluación de diferentes tapas para la celda de ablación láser las cuales se diferencian en la forma que tiene la entrada y salida del gas portador Helio. En la *figura 30* se muestran unos esquemas para los tres tipos de tapas evaluadas. Dichos esquemas corresponden a unas simulaciones para conocer cómo se distribuye el flujo de gas dentro de la celda de ablación. La primera de las tapas tiene una entrada y salida de gas con forma circular (*Figura 30a*), la segunda tapa tiene una entrada de gas formada por 4 conductos y una salida con forma de embudo recolector (*Figura 30b*). Finalmente, la tercera tapa tiene una entrada única y circular de gas y una salida en forma de embudo recolector (*Figura 30c*). El objetivo de estos diferentes diseños es evaluar cuál de ellas produce un flujo más laminar con un menor tiempo de residencia dentro de la celda para así obtener una buena resolución lateral en estudios de imaging.

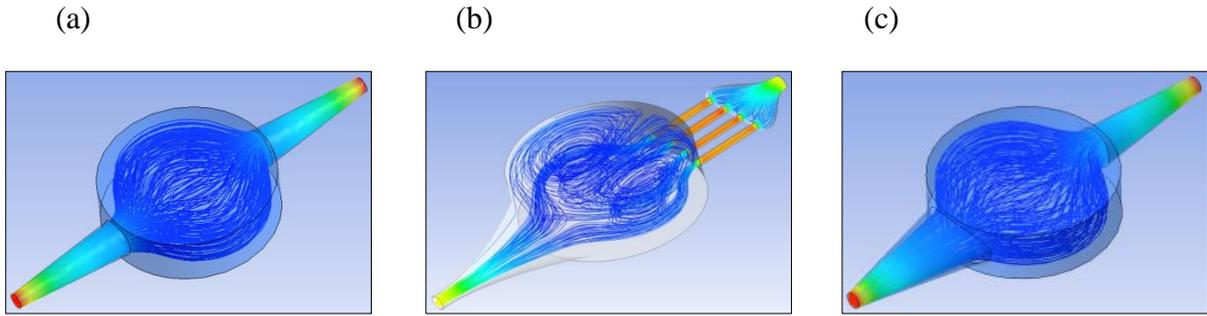


Figura 30: Esquemas de los tres tipos de tapas a evaluar

Además de evaluar los tres diseños para las tapas de la celda de ablación, se estudió la influencia de la posición de la muestra dentro de la celda de ablación (se evaluaron las 5 posiciones descritas en la figura 25), la influencia de la altura de la muestra (poniendo un único portamuestras o 2 portamuestras) y la influencia de la temperatura (se realizaron medidas a temperatura ambiente y a -20°C).

4.2.1. EVALUACIÓN DE LA TAPA 1

En la figura 31 se muestra un esquema con la forma que tienen la entrada y la salida de Helio en la primera tapa.



Figura 31: Esquema de la entrada y salida de Helio en la celda de ablación con la tapa 1.

Utilizando esta tapa para la celda de ablación se llevan a cabo diferentes estudios. Se mide la muestra (vidrio) a 1 y 2 alturas y se evalúan diferentes posiciones de incidencia del haz láser sobre la muestra.

Las condiciones se encuentran recogidas en la *tabla 2*:

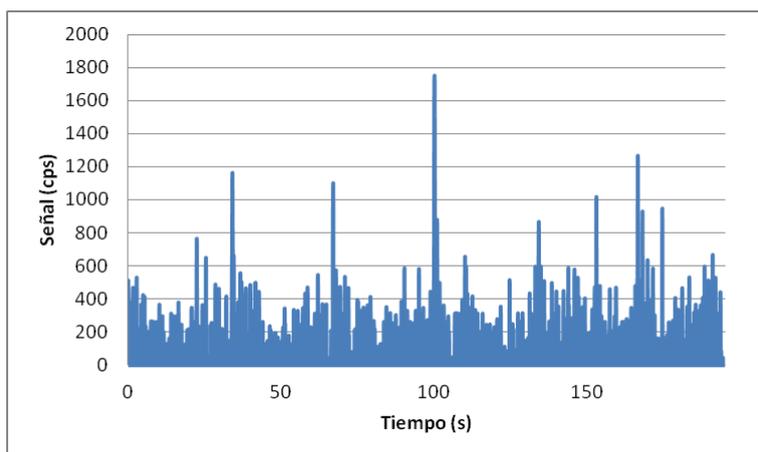
Tabla 2: Condiciones de medida, tapa 1 de la celda de ablación en LA-ICP-MS

<i>Elemento a medir</i>	^{56}Fe
<i>Diámetro del haz láser</i>	200 micras
<i>Energía del láser</i>	100%
<i>Frecuencia</i>	1 Hz
<i>Nº disparos (distintos puntos)</i>	5
<i>Tiempo entre disparos</i>	30 s
<i>Flujo de argón</i>	700 mL/min
<i>Flujo de helio</i>	1000 mL/min

- **Evaluación de la posición de la muestra a 1 altura**

A continuación se muestran como ejemplo los perfiles obtenidos para el ^{56}Fe en el análisis del vidrio en las posiciones ‘arriba’ (figura 32a) y ‘abajo’ (figura 32b):

(a)



(b)

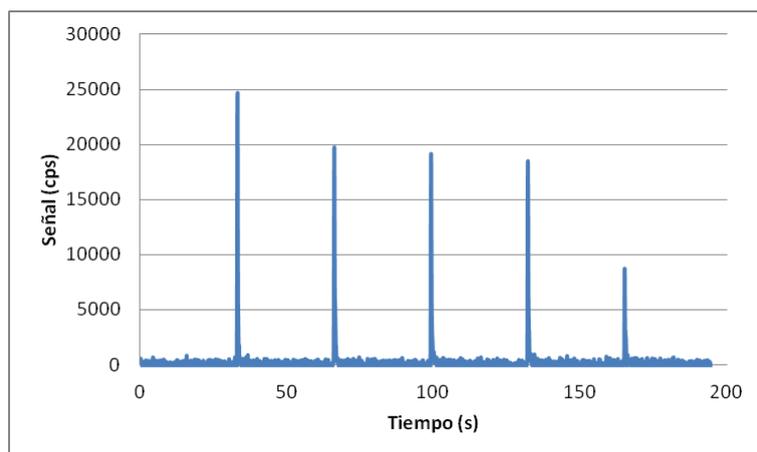


Figura 32: Perfiles LA-ICP-MS para ^{56}Fe en las posiciones de incidencia del láser ‘arriba’ (a) y ‘abajo’ (b)

Tras observar ambos perfiles se pueden ver claras diferencias. Indiscutiblemente en la posición de ‘abajo’ hay mayor sensibilidad y mayor reproducibilidad entre los cinco picos (a excepción del último). En la figura 33 se muestra la imagen ampliada del segundo de los picos del perfil obtenido de la posición de abajo.

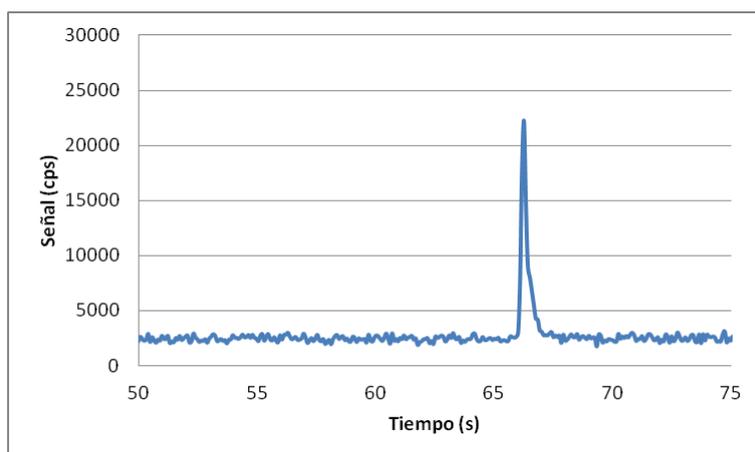
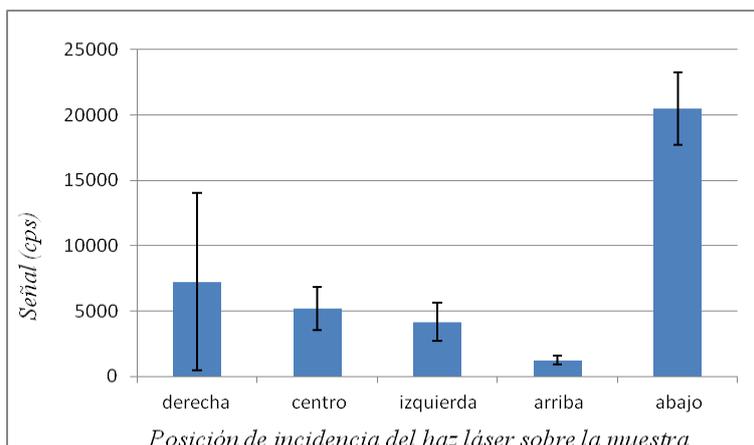


Figura 33: Estudio de ^{56}Fe , posición abajo: perfil del segundo pico (disparo).

Para facilitar la comparación entre las diferentes posiciones de incidencia del haz láser sobre la muestra, en la figura 34 se representan sus señales y tiempos de evacuación con sus respectivos valores de desviaciones estándar empleando las señales netas para las 5 réplicas (para los 5 disparos independientes del haz láser).

(a)



(b)

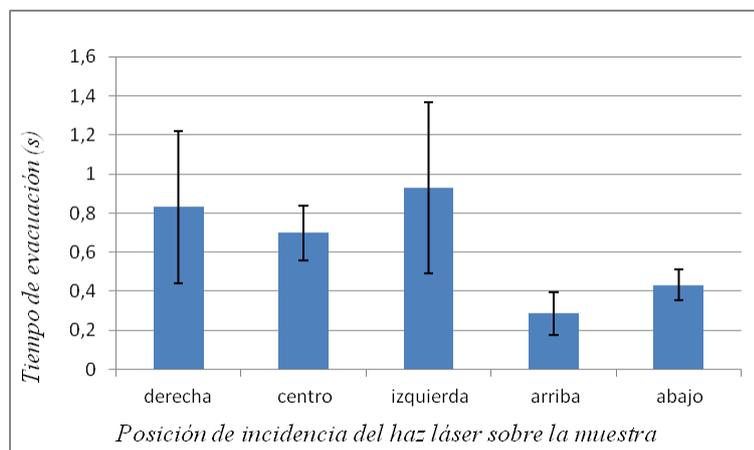


Figura 34: Representación de las señales (a) y los tiempos de evacuación (b) obtenidos para ^{56}Fe , mediante LA-ICP-MS en las diferentes posiciones de incidencia del haz láser.

La mejor posición en cuanto a señal y tiempo de evacuación es la posición de 'abajo', ya que tiene una señal mucho mayor que el resto y uno de los tiempos de evacuación más pequeños. Además, la precisión de las medidas es menor que la

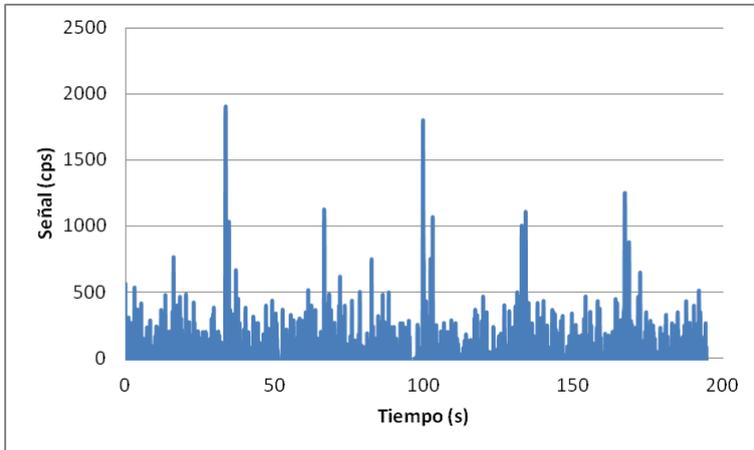
encontrada para las otras posiciones, particularmente al hablar de las posiciones derecha e izquierda.

- ***Evaluación de la altura de la muestra a 2 alturas:***

Como se explicó anteriormente se llevan a cabo las medidas en las mismas condiciones que en el caso anterior y en las cinco posiciones diferentes pero a dos alturas (se coloca un segundo portamuestras encima del primero).

Como ejemplo en la *figura 35* se muestra el perfil obtenido para la señal del ^{56}Fe en la posición de ‘abajo’ de la muestra y el tercero de sus picos individualmente. Destacar que esta posición era la que mostraba mejor sensibilidad y tiempos de evacuación a 1.

(a)



(b)

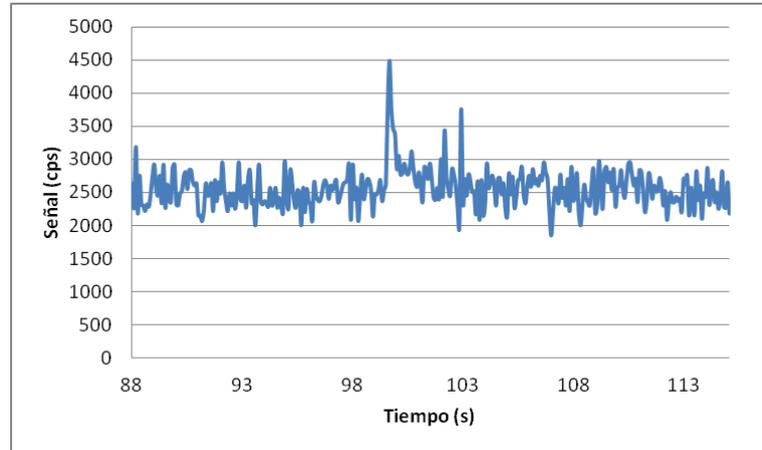
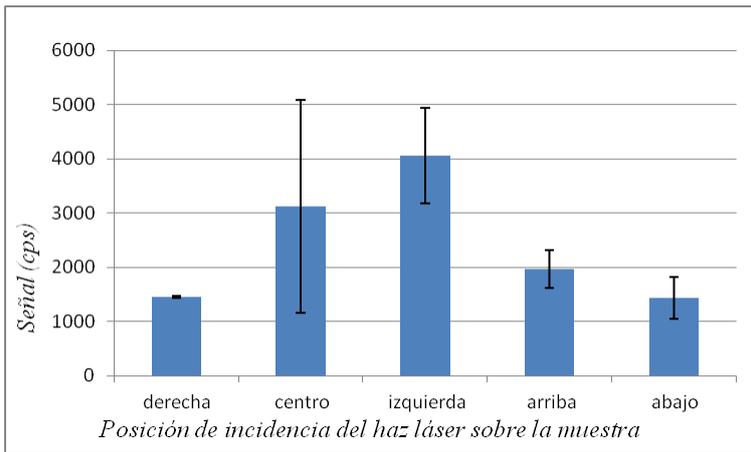


Figura 35: Perfil LA-ICP-MS para ^{56}Fe en la posición de incidencia del láser “abajo” (a). Imagen ampliada del tercero de los picos (b)

Se puede ver que se ha perdido mucha sensibilidad, y además los picos no están bien definidos. A continuación se muestran las señales y los tiempos de evacuación para todas las posiciones evaluadas (*figura 36*):

(a)



(b)

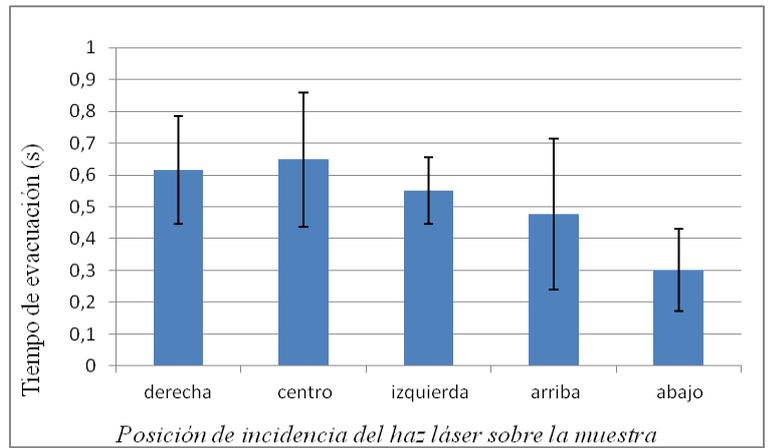


Figura 36: Representación de las señales(a) y los tiempos de evacuación (b) obtenidos para ^{56}Fe , mediante LA-ICP-MS en las diferentes posiciones de incidencia del haz láser.

Comparando las señales con las obtenidas a 1 altura se puede ver una disminución notable de la señal en todas las posiciones así como una reducción también de los tiempos de evacuación. De esta manera parece que la altura de la muestra tiene influencia directa en los análisis y es mejor medir a 1 altura. Con 2 alturas se pierde sensibilidad, hay menor reproducibilidad entre los picos y estos están peor definidos.

4.2.2. EVALUACIÓN DE LA TAPA 2

En la figura 37 se muestra un dibujo esquemático de la entrada y la salida de gas en la tapa 2:

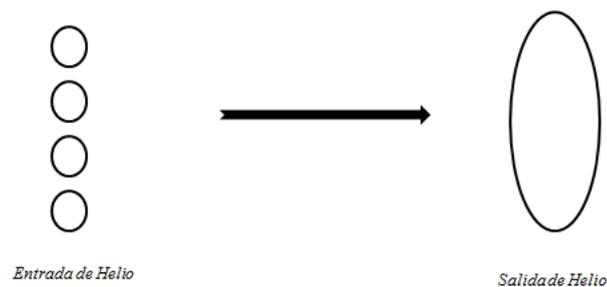


Figura 37: Esquema de la entrada y salida de Helio en la celda de ablación con la tapa 2.

Con la utilización de esta tapa se lleva a cabo el estudio a temperatura ambiente como en las anteriores medidas y a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Como se comentó en la introducción, el

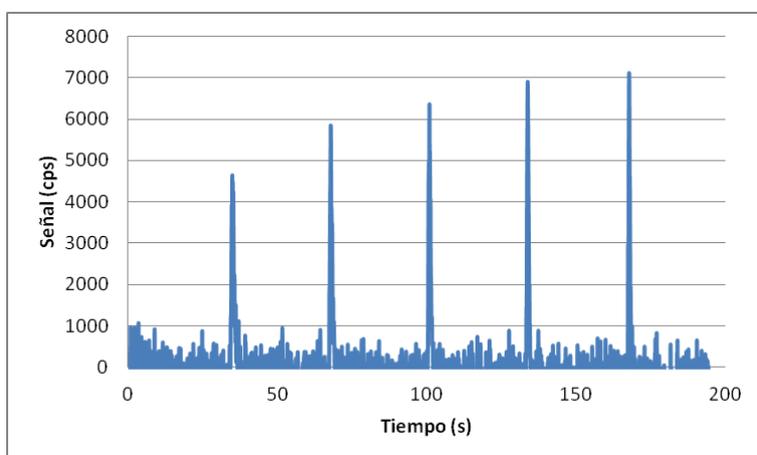
análisis de secciones de tejidos biológicos y bio-médicos a baja temperatura presenta numerosas ventajas a los estudios hechos a temperatura ambiente. De este modo se evaluó si la sensibilidad y los tiempos de evacuación están influenciados por una disminución de la temperatura.

Las condiciones de medida son las mismas que para la tapa 1 (*tabla 2*).

- ***Evaluación de la temperatura de análisis: Temperatura ambiente***

A continuación se puede ver el perfil de la medida realizada en la posición central (*figura 38*):

(a)



(b)

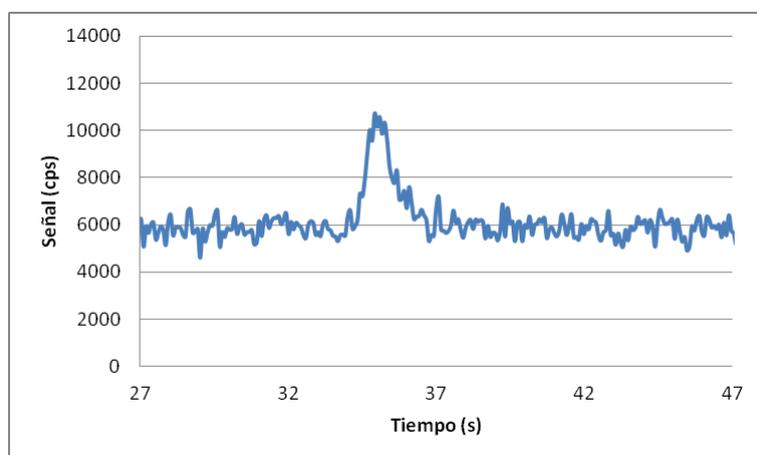


Figura 38: Perfil LA-ICP-MS para ^{56}Fe en la posición de incidencia del láser ‘centro’ (a). Imagen ampliada del primero de los picos (b)

En esta posición se observa una gran reproducibilidad entre los picos, y además cada pico individual está bien definido. Sin embargo, al igual que ocurriría para la tapa 1, hay una gran diferencia entre las diferentes posiciones de la muestra dentro de la cámara de ablación. Como ejemplo se muestra a continuación en la *figura 39* el perfil obtenido en la posición ‘abajo’:

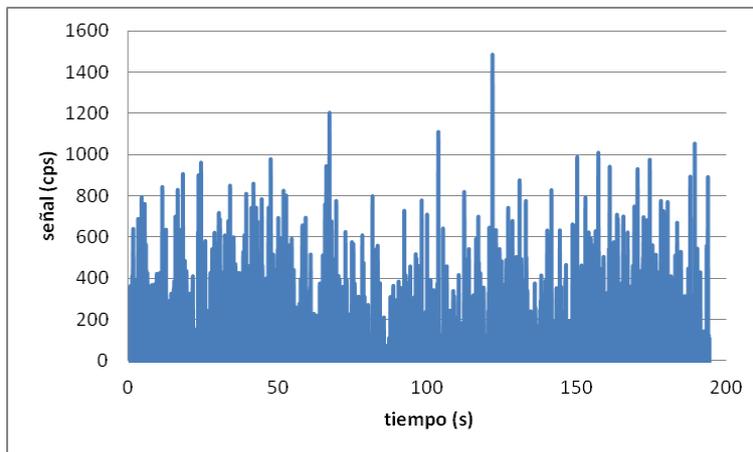
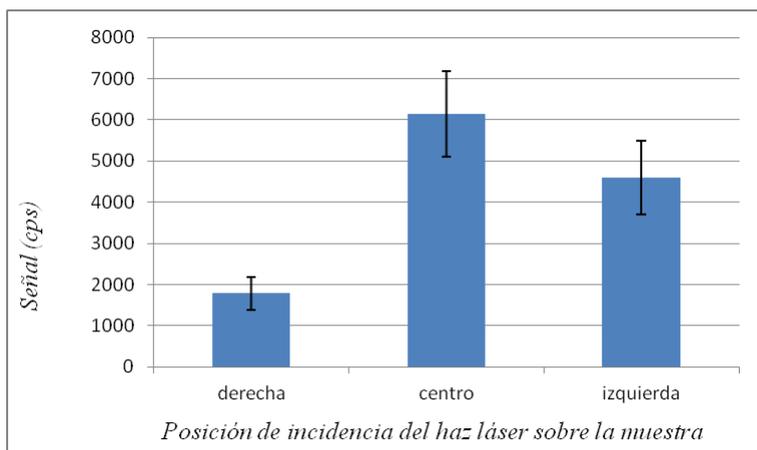


Figura 39: Perfil LA-ICP-MS para ^{56}Fe en la posición de incidencia del láser de abajo.

El resumen de señales y tiempos de evacuación se muestra a continuación (figura 40). Cabe destacar que solo se muestran señales para las posiciones derecha, centro e izquierda ya que las posiciones abajo y arriba no proporcionaban picos significativos para el ^{56}Fe .

(a)



(b)

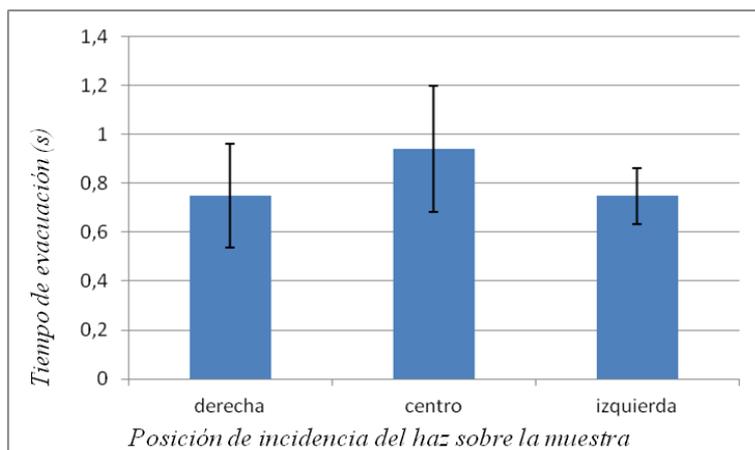


Figura 40: Representación de las señales (a) y los tiempos de evacuación (b) obtenidos para ^{56}Fe , mediante LA-ICP-MS en las diferentes posiciones de incidencia del haz láser.

Si comparamos estos resultados con los obtenidos para la tapa 1, se puede decir que la sensibilidad obtenida para el ^{56}Fe es similar en ambos casos para algunas de las posiciones (alrededor de 5000-6000 cps), a excepción de la posición "abajo" en la Tapa 1 que mostraba una gran sensibilidad. Respecto a los tiempos de evacuación, también son similares. Estando todos ellos cercanos o menores a 1 s.

- ***Evaluación de la temperatura de análisis: -20 °C***

Tras llevar a cabo diferentes medidas a -20 °C se observó que no había picos distinguibles de la señal de fondo para el ^{56}Fe en ninguna de las cinco posiciones medidas. A continuación se muestra el perfil obtenido para ^{56}Fe en la posición centro (figura 41):

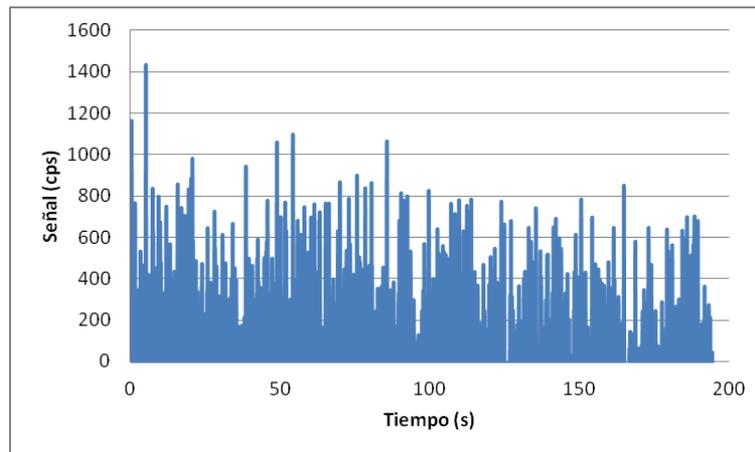


Figura 41: Perfil LA-ICP-MS para ^{56}Fe en la posición de incidencia del láser 'centro'.

Para comprobar que la ausencia de señales se debe al efecto de la temperatura y no a otro tipo de problema en el acoplamiento LA-ICP-MS, se aumentó la temperatura de la celda de -20 °C a temperatura ambiente. Como se puede observar en la *figura 42*, a medida que se aumenta la temperatura la señal de ^{56}Fe aumenta, llegando a obtenerse una señal para el ^{56}Fe similar a la obtenida en la *Figura 39a* (alrededor de 6000 cps). De este modo se puede decir, que parece haber un efecto de la temperatura de la celda de ablación sobre las señales.

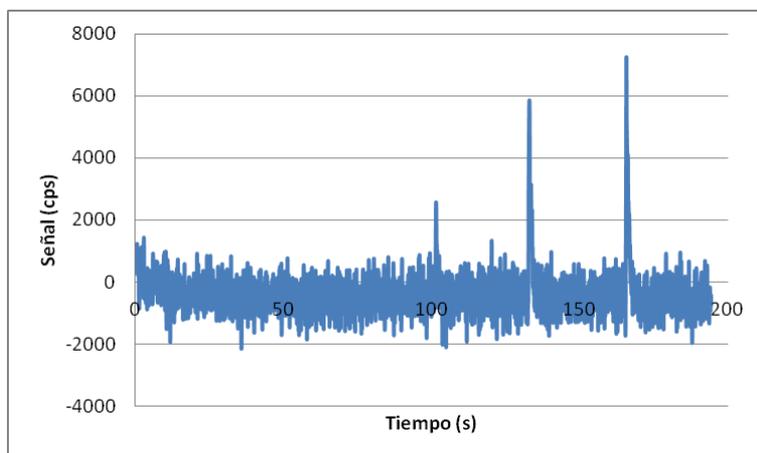


Figura 42: Perfil para ^{56}Fe en la posición de incidencia del láser 'centro', la temperatura aumenta con el tiempo.

4.2.3. EVALUACIÓN DE LA TAPA 3

A continuación se procede a la evaluación de la última tapa disponible. El dibujo esquemático se muestra a continuación en la figura 43:

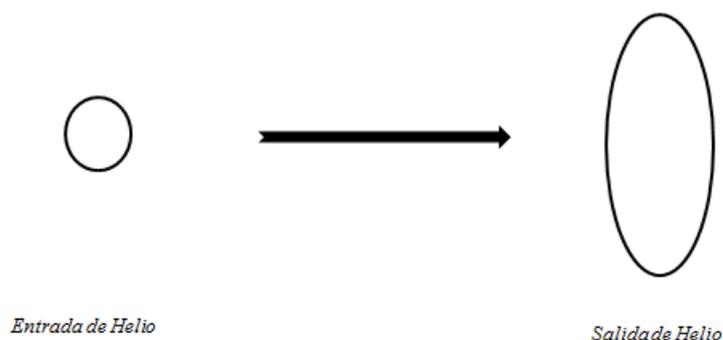


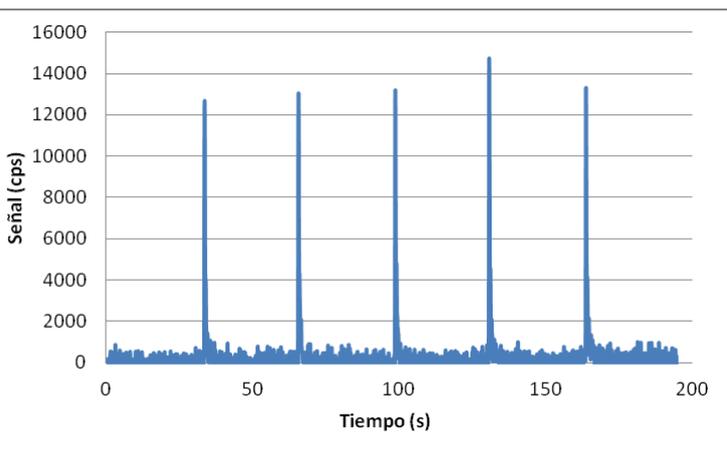
Figura 43: Esquema de la entrada y salida de Helio en la celda de ablación con la tapa 3.

Hasta ahora, con la tapa 1 y la tapa 2 se ha evaluado el efecto de la altura de la muestra y la temperatura, respectivamente. Con la tapa 3 se va a hacer un estudio completo evaluando de nuevo la influencia de la altura y la temperatura en los perfiles de ^{56}Fe para el análisis de un vidrio. Además, y teniendo en cuenta que en los estudios de imaging es necesario obtener una buena resolución lateral y se emplea un diámetro de haz láser muy pequeño, se han hecho estudios reduciendo el diámetro del haz de 200 micras a 50 micras.

- ***Evaluación de la posición de la muestra y la temperatura de análisis: 1 altura y temperatura ambiente.***

A continuación se muestran como ejemplo los perfiles obtenidos en la posición ‘arriba’ (figura 44a) y la imagen ampliada del tercero de los cinco picos (fig.44b). Además en la figura 45 se muestra el perfil del ^{56}Fe en la posición ‘derecha’. Como se puede observar, y al igual que ocurría en las Tapas 1 y 2, existe una gran influencia de la posición de análisis sobre la sensibilidad. En la posición arriba se obtiene una señal de ^{56}Fe alrededor de 12.000 cps mientras que solo se observan 2000 cps en la posición derecha.

(a)



(b)

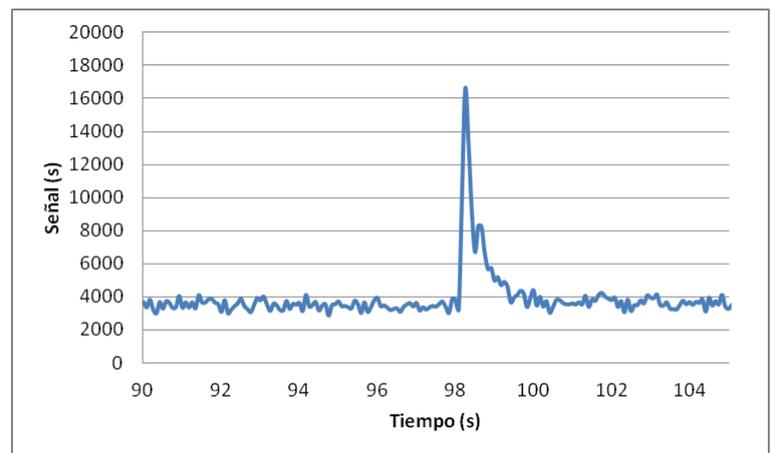


Figura 44: Perfil LA-ICP-MS para ^{56}Fe en la posición de arriba (a). Imagen ampliada del tercer pico (b)

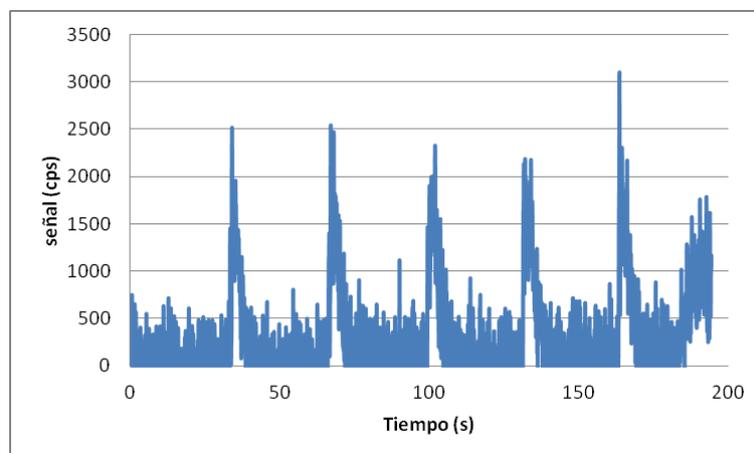


Figura 45: Perfil LA-ICP-MS para ^{56}Fe en la posición de la derecha

A continuación se muestran los resultados obtenidos de señales y tiempos de evacuación en las diferentes posiciones de incidencia del haz láser sobre la muestra (figura 46).

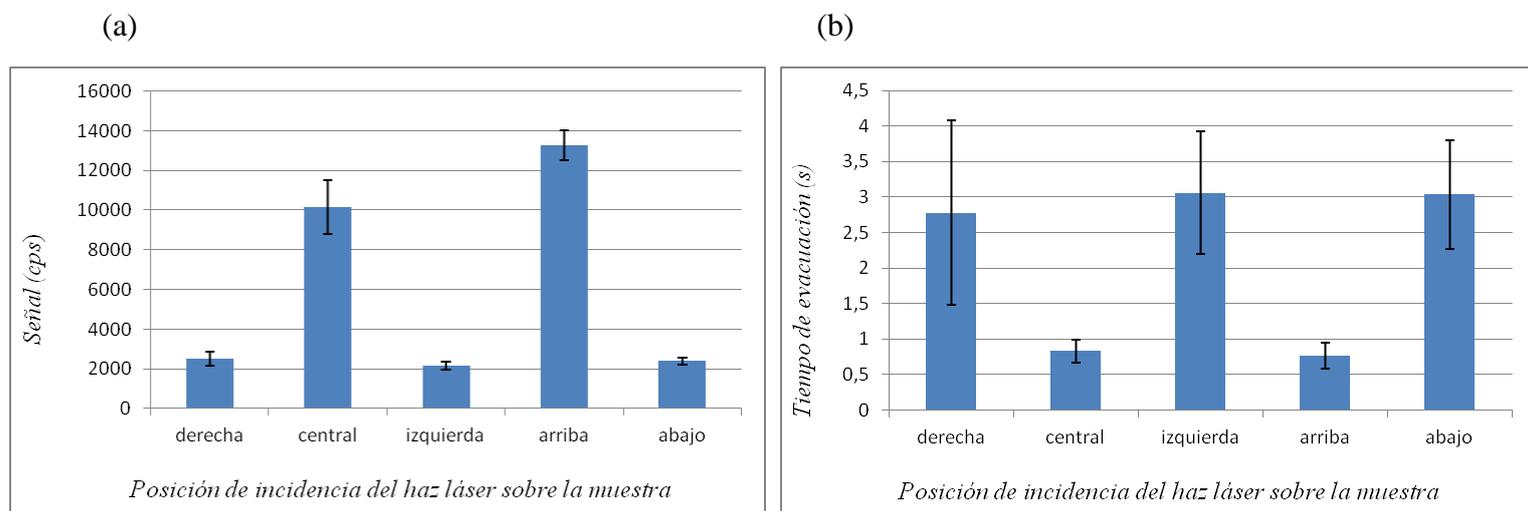


Figura 46: Representación de las señales (a) y los tiempos de evacuación (b) obtenidos para ^{56}Fe , mediante LA-ICP-MS en las diferentes posiciones de incidencia del haz láser (temperatura ambiente).

Con estas condiciones de medida las mejores posiciones son arriba o centro ya que tienen unos valores de señal mucho más altos que el resto de las posiciones y unos valores de tiempo de evacuación bajos (por debajo de 1 s).

- **Evaluación de la posición de la muestra y la temperatura de análisis: 2 alturas y temperatura ambiente**

Tras colocar otro portamuestras en la cámara de ablación se lleva a cabo la medida en las mismas condiciones que en el caso anterior para evaluar el efecto de la segunda altura en esta tapa. A continuación en la figura 47 se muestra el perfil obtenido en la posición de arriba.

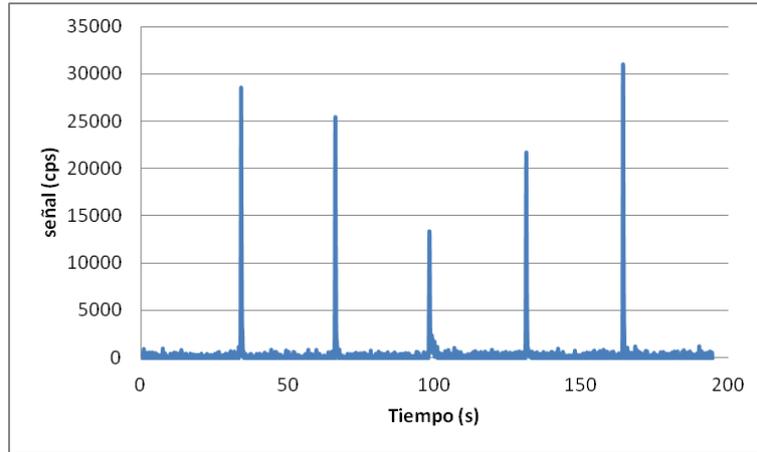


Figura 47: Perfil LA-ICP-MS para ^{56}Fe a 2 alturas en la posición de arriba.

Comparando los resultados obtenidos para 1 y 2 alturas en la posición “arriba” (figura 44a y figura 47) se puede decir que la reproducibilidad entre disparos es menor a doble altura, aunque se ha observado un aumento de la sensibilidad: a excepción del tercer pico se observa un cambio de la señal de ^{56}Fe de 12000 cps a 20000. Por otro lado la Figura 48 muestra el perfil obtenido para el análisis del vidrio en la posición derecha. Al igual que se pudo ver para la posición de arriba, se observa un aumento de la sensibilidad frente a las señales obtenidas para 1 altura (figura 45). En este caso la reproducibilidad de los cinco análisis es muy buena, alcanzando todos ellos una señal aproximadamente de 8000 cps.

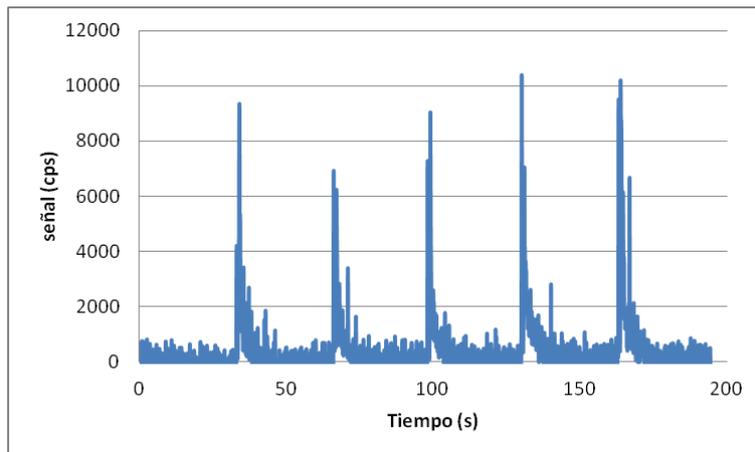
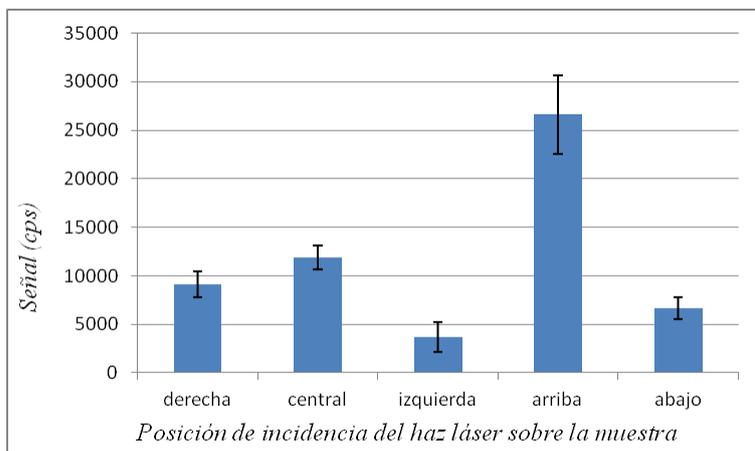


Figura 48: Perfil LA-ICP-MS para ^{56}Fe a 2 alturas en la posición de derecha

A continuación, en la *figura 49* se recoge un resumen de los resultados experimentales obtenidos para las señales y tiempos de evacuación del ^{56}Fe en las diferentes posiciones de la muestra.

(a)



(b)

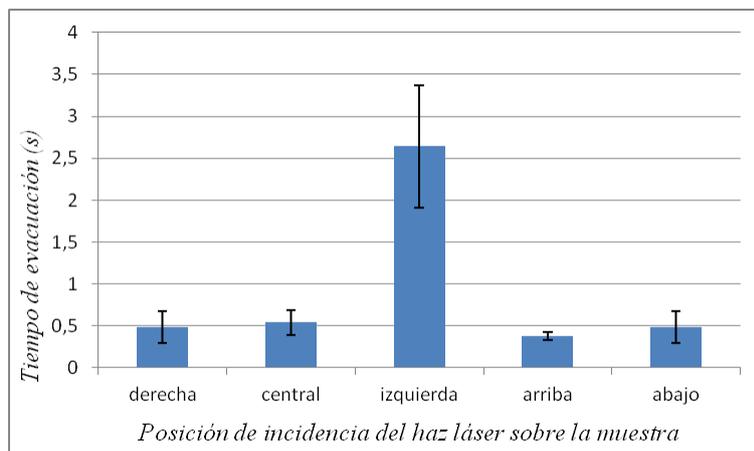


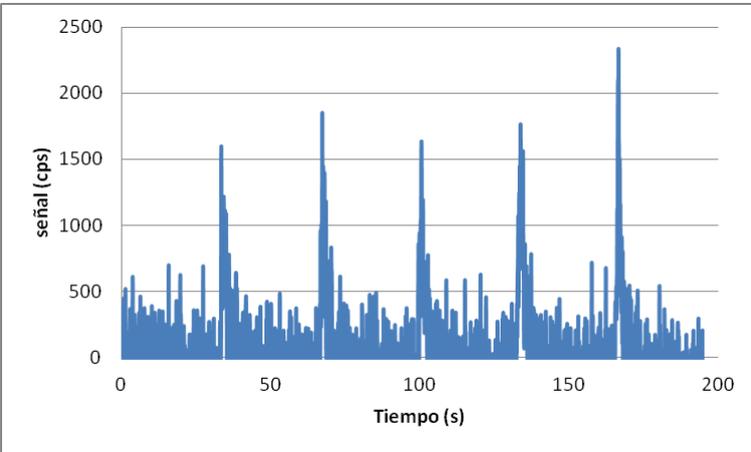
Figura 49: Representación de las señales (a) y los tiempos de evacuación (b) obtenidos para ^{56}Fe en las diferentes posiciones de incidencia del haz láser a 2 alturas, T^a ambiente, 50 micras.

En este caso parece que la posición ‘arriba’ muestra una mayor sensibilidad con unos tiempos de evacuación por debajo de 0.5 s. Además, destacar que, a excepción de la posición izquierda, los tiempos de evacuación están en todos los casos por debajo de 0.5 s. Para continuar con el estudio de la Tapa 3 se procede a evaluar el efecto de la temperatura. Para este estudio se realizan las medidas a una altura.

- ***Evaluación de la posición de la muestra y la temperatura de análisis: 1 altura y baja temperatura (-20 °C).***

Como ejemplo de los resultados experimentales obtenidos, en la *figura 50* se muestran los perfiles del ^{56}Fe en las posiciones derecha y arriba.

(a)



(b)

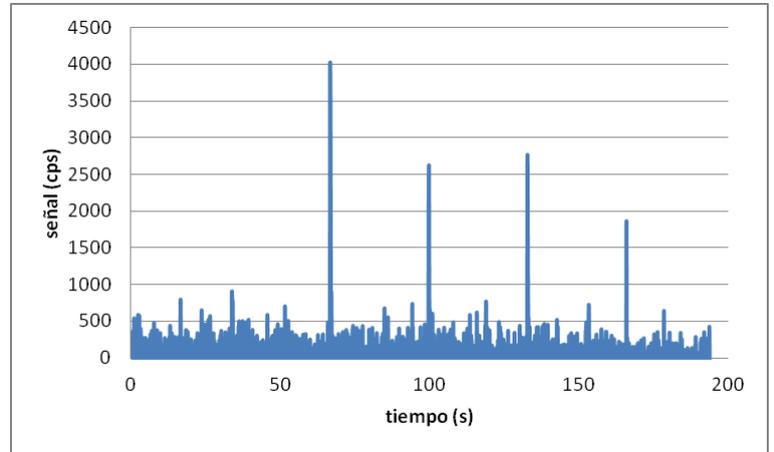
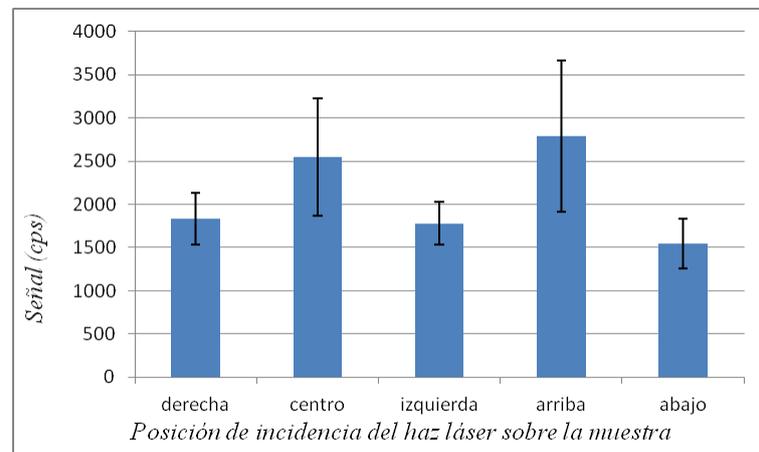


Figura 50: perfiles LA-ICP-MS obtenidos para ^{56}Fe (1 altura y $-20\text{ }^\circ\text{C}$) en las posiciones derecha (a) y arriba (b)

A continuación se muestran todos los valores para las diferentes posiciones ensayadas (figura 51)

(a)



(b)

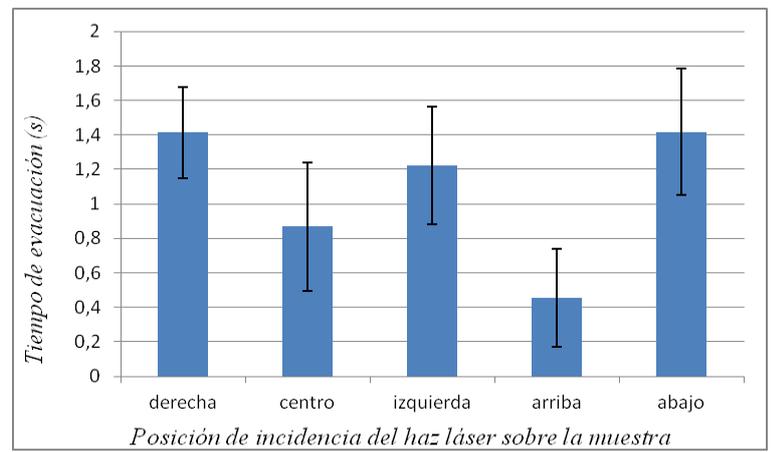


Figura 51: Representación de las señales (a) y los tiempos de evacuación (b) obtenidos para ^{56}Fe , en las diferentes posiciones de incidencia del haz láser (1 altura y $-20\text{ }^\circ\text{C}$).

En este caso no hay diferencias muy notables entre las distintas posiciones en cuanto a la señal pero sí que se puede ver que la posición 'arriba' es la que presenta una mayor señal y un menor tiempo de evacuación. Comparando estos resultados con los

obtenidos a temperatura ambiente (*figura 46*), cabe destacar de nuevo que una disminución de la temperatura de análisis produce una disminución en la sensibilidad. De todos modos, aunque con la tapa 1 no se observaban señales a baja temperatura, como la sensibilidad con la tapa 3 es mayor que con la 1, en este caso es posible tener señales significativas para el ^{56}Fe incluso a baja temperatura.

4.2.4. ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS TRES TAPAS

Tras haber evaluado las tres tapas se han podido ver una serie de tendencias:

Tapa 1: en la evaluación de la primera tapa se ha estudiado el efecto que tiene realizar las medidas a una segunda altura de la muestra. Se observó una pérdida notable de sensibilidad pasando de una señal máxima a 1 altura de 20000 cps a tener una señal de 4000 cps a 2 alturas. En cuanto a los tiempos de evacuación se ha visto cierta mejora en algunas posiciones como ‘derecha’, ‘izquierda’ y ‘arriba’. Por último, en la evaluación de la reproducibilidad de los perfiles para el ^{56}Fe , se ha visto que no existe mucha diferencia. Debido a esta baja reproducibilidad entre los picos se ha descartado el uso de esta tapa en los estudios de *imaging*.

Tapa 2: en la evaluación de esta tapa se lleva a cabo el estudio del efecto que tiene en las medidas la baja temperatura ya que es importante en el estudio de *imaging* de tejidos vegetales, por ello se llevaron a cabo medidas a temperatura ambiente y a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tras observar los perfiles a baja temperatura no se obtuvo ninguna señal para el ^{56}Fe , por lo tanto esta tapa queda descartada.

Tapa 3: en esta tapa se vuelve a estudiar el efecto de la doble altura y se observó, al revés que en la tapa 1, un aumento notable de la sensibilidad aunque al mismo tiempo empeora mucho la reproducibilidad entre disparos y por lo tanto no se utilizará la doble altura. Por otro lado se llevó a cabo el estudio de la temperatura y se observó, como era de esperar, que en frío disminuye mucho la señal. Sin embargo, aunque las señales en frío son más bajas sí se puede emplear la celda y obtener perfiles con una señal significativa de ^{56}Fe . Destacar que en este caso las condiciones de ablación eran similares a las que se van a emplear en los estudios de *imaging*, se redujo el diámetro del haz láser de 200 micras a 50 micras.

Por todo lo expuesto anteriormente se seleccionó la Tapa 3 para analizar un corte transversal de hoja de melocotonero para hacer estudios de imaging.

4.3. BIO-IMAGING DE METALES EN SECCIONES DE TEJIDOS VEGETALES EMPLEANDO LA-ICP-MS

Para obtener la imagen de dicha muestra mediante LA-ICP-MS se dibujan líneas (modo 'single line' en el láser) por toda la superficie de la hoja, en total 23 líneas con un diámetro de 25 micras y con una separación de 10 micras entre cada línea. Las medidas se llevan a cabo con la Tapa 3 de la cámara criogénica en estudio y a una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las condiciones elegidas para el análisis se pueden ver en la *tabla 3*.

Tabla 3: Condiciones de medida para la imagen de la muestra

<i>Energía</i>	<i>70%</i>
<i>Frecuencia</i>	<i>20 Hz</i>
<i>Diámetro</i>	<i>25 micras</i>
<i>Distancia entre líneas</i>	<i>10 micras</i>
<i>Velocidad</i>	<i>20 micras/s</i>
<i>Nº líneas</i>	<i>23 líneas</i>

En la imagen siguiente (*figura 52*) se muestra la disposición de los diferentes cortes transversales de la hoja en la cámara de ablación. La muestra analizada es la que se encuentra en la posición central ya que en los estudios realizados no se observó una tendencia importante para elegir una u otra posición.

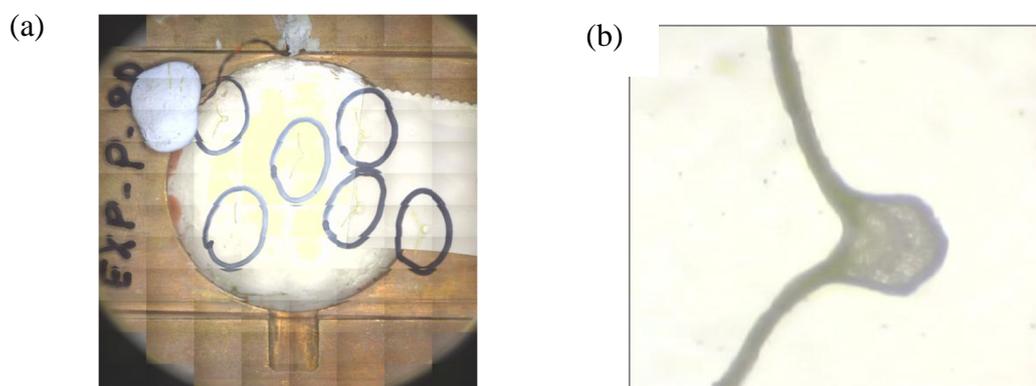


Figura 52: vista de los diferentes cortes de la muestra en la cámara de ablación (a). Imagen ampliada del corte de hoja a analizar (b)

Tras dibujar las líneas sobre la superficie de la muestra (*figura 53 a*) y llevar a cabo la ablación láser (*figura 53 b*) se obtienen los datos para cada línea y para cada elemento, por lo tanto para cada elemento hay 23 series de datos.

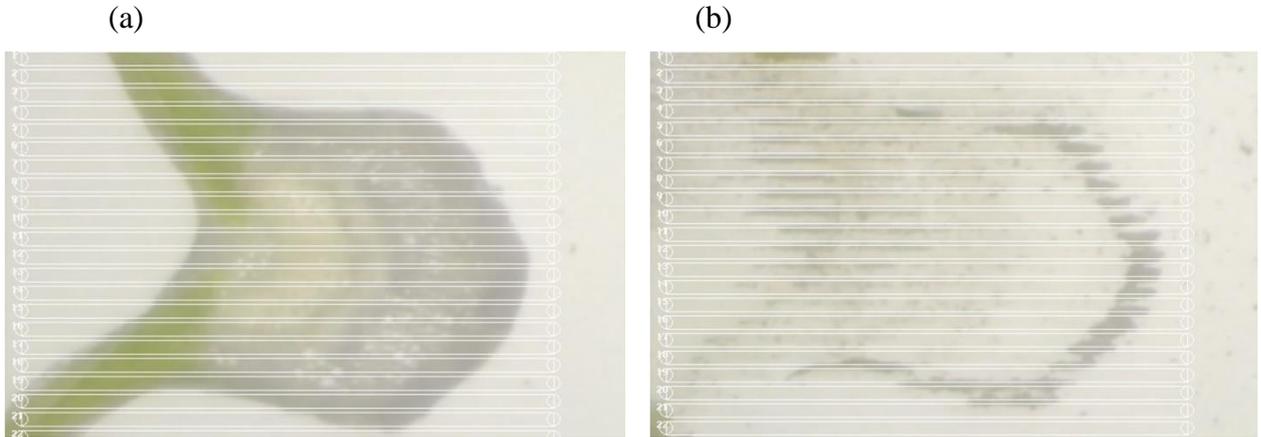
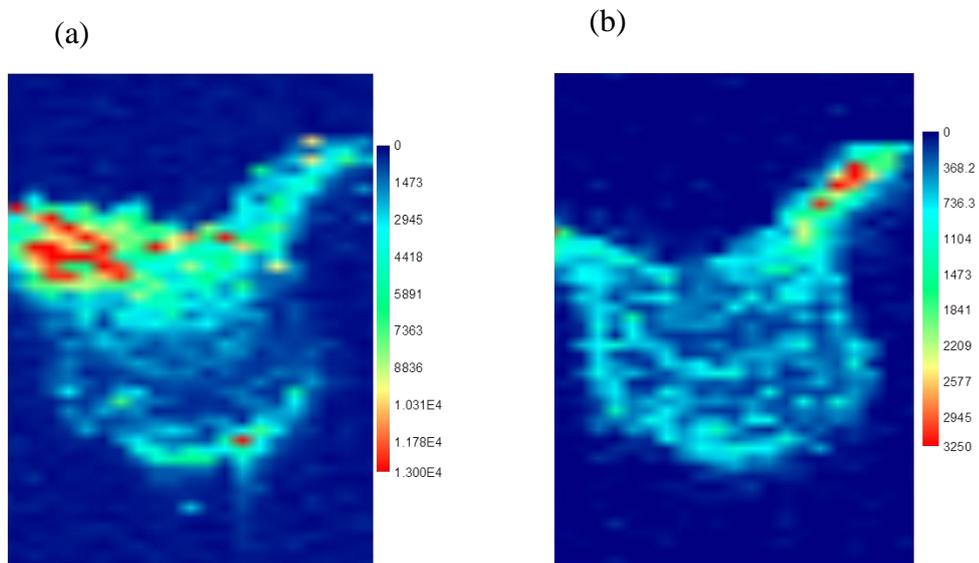


Figura 53: líneas dibujadas sobre la superficie de la muestra (a). Muestra tras la ablación láser (b)

Tras el tratamiento de datos mediante el programa informático ‘Origin’ se obtienen las imágenes para cada elemento, en nuestro caso nos interesa principalmente el hierro aunque se miden también otros elementos esenciales para la planta como son el ^{66}Zn , ^{44}Ca y ^{55}Mn .

En la *figura 54* se muestran las imágenes obtenidas para ^{56}Fe , ^{66}Zn , ^{44}Ca y ^{55}Mn :



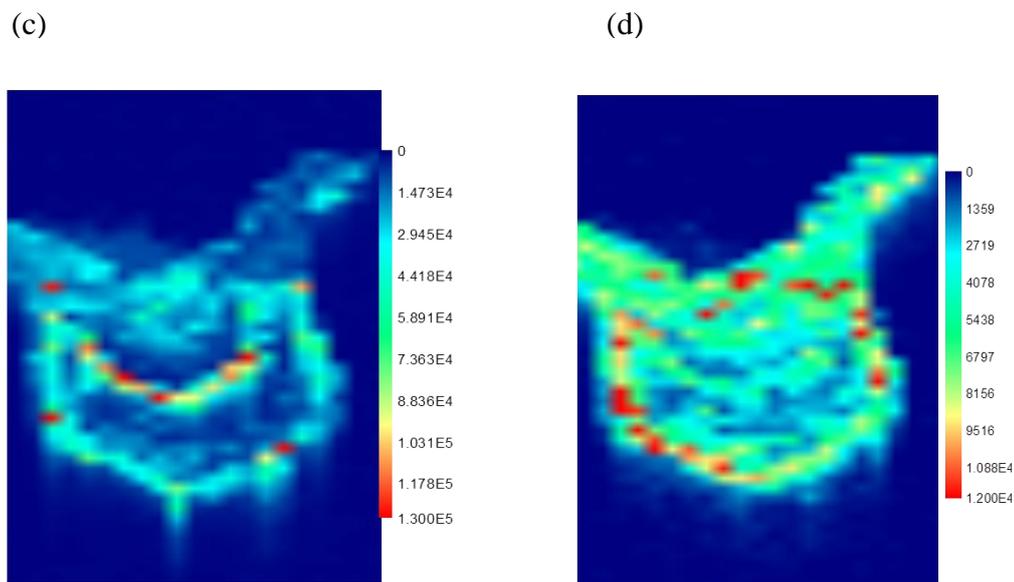


Figura 54: Imágenes obtenidas mediante LA-ICP-MS de una sección de hoja de melocotonero para ^{56}Fe (a), ^{66}Zn (b), ^{44}Ca (c) y ^{55}Mn (d).

Como se puede observar en las imágenes obtenidas para el corte de hoja transversal, la distribución de ^{44}Ca , ^{55}Mn , ^{56}Fe y ^{66}Zn no es homogénea a lo largo de las diferentes estructuras de la hoja y los elementos tienen una diferente distribución. El ^{56}Fe y el ^{66}Zn se distribuyen mayoritariamente por el borde la hoja mientras que el ^{44}Ca y el ^{55}Mn tienen una distribución más homogénea en todas las estructuras.

Cabe destacar que la celda criogénica empleada (Tapa 3) ha permitido obtener imágenes del corte de hoja con una buena resolución lateral, distinguiéndose pequeñas estructuras en el centro del corte. Los resultados experimentales obtenidos indican que los posibles efectos térmicos que hacen disminuir la resolución lateral se han minimizado al trabajar a baja temperatura y que el tiempo de evacuación de la celda es bajo.

5. CONCLUSIONES

Como conclusiones a este Trabajo Fin de Máster encaminado a evaluar una celda de ablación criogénica para estudios de imaging, se puede decir:

- El diseño de las entradas y salidas de gas en la tapa de la celda de ablación es un factor crítico a tener en cuenta en el diseño de la celda ya que tiene una influencia directa tanto en la sensibilidad obtenida como en los tiempos de evacuación.
- Se han evaluado 3 tapas para la celda de ablación con un diseño diferente para la entrada y salida de gas. En todos los casos se ha observado que la posición de la muestra, zona ablacionada, dentro de la cámara es un aspecto importante porque tiene un efecto directo en la sensibilidad y los tiempos de evacuación.
- La altura de la muestra y la temperatura de análisis tienen una influencia directa en los análisis pero se ha observado que su efecto depende de la tapa evaluada. Temperaturas bajas producen una reducción de las señales pero la altura de la muestra presenta un efecto diferente dependiendo del diseño de la tapa (tapas 1 y 3).
- En todos los casos, la celda de ablación muestra unos tiempos de evacuación bajos, en la mayoría de los casos alrededor o por debajo de 1 s lo que hace que su diseño sea adecuado para estudios de imaging elemental con alta resolución lateral.
- Se ha analizado un corte transversal de hoja de melocotonero como muestra modelo para hacer estudios de imaging empleando la tapa 3 de la celda criogénica y trabajando a -20°C . Se han obtenido imágenes con una buena resolución lateral para el ^{56}Fe , ^{55}Mn , ^{44}Ca y ^{66}Zn en las que se muestra una distribución no homogénea de los diferentes elementos a lo largo de las diferentes estructuras de la hoja.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. <http://articulos.infojardin.com/articulos/carencias-hierro-manganeso-zinc.htm> (13/06/2014).
2. http://urbanext.illinois.edu/focus_sp/chlorosis.cfm (13/06/2014).
3. http://www.ehowenespanol.com/signos-sintomas-deficiencia-hierro-plantas-info_396106/ (13/06/2014).
4. J.Abadía, M.Sanz, A.Abadía, *Causas y efectos de la clorosis férrica en frutales*, 2004. Departamento de Nutrición Vegetal. Estación Experimental de Aula Del (CSIC) Zaragoza.
5. H.Xiong, X.Guo, T.Kobayashi, Y.Takei, H.Nakanishi, T.Nozye, L.Zhang, H.Shen, W.Qiu, K.Nishizawa, Y.Zuo. *Expression of peanut iron regulated transporter 1 in tobacco and rice plants confers improves iron nutrition*. 2014, 80, 89-89, *Plant Physiology and Biochemistry*.
6. B.Wu, Y.Chen, J.S.Becker. *Study of essential element accumulation in the leaves of a Cu-tolerant plant *Elsholtzia splendens* after Cu treatment by imaging laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS)*. 2009, 633, 165-172. *Analytical Chimica Acta*.
7. M.Gessel, J.L.Norris, R.M Caprioli, *Maldi imaging mass spectrometry: Spatial molecular analysis to enable a new age of discovery*. 2014. *Journal of proteomics*.
8. J.W. Park, K.Shon, C.Yoo, H.Kim, W.Moon, G.Lee. *Differentiation between human normal colon mucosa and colon cancer tissue using TOF-SIMS imaging technique and principal components analysis*. 2008, 255, 1119-1122. *Applied Surface Science*
9. J.S.Becker, A.Matusch, B.Wu. *Bioimaging mass spectrometry of trece element-recent advance an applications of LA-ICP-MS*. 2014. *Analytical Chimica Acta*.
10. I.Konz, B.Fernández, M.L.Fernández, R.Pereiro, A.Sanz Medel. *Laser ablation ICP-MS for quantitative biomedical applications*. 2012. 406, 2113-2125. *Anal.Bioanal.Chem*.
11. A.G.Coedo, M.T.Dorado. *Spatial resolution in laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry*. 2010, 46, 52-68. *Revista de metalurgia*.
12. B.Fernández, F.Claverie, C.Pécheyan, F.X.Donard. *Direct analysis of solid samples by fs-LA-ICP-MS*. 2007, 26,10. *Trends in Analytical Chemistry*.

13. B.Wu, M.Zoriy, Y.Chen, J.S.Becker. *Imaging of nutrient elements in the leaves of Elsholtzia splendens by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS)*. 2008, 78, 132-137. Talanta.
14. M.Gäckle, D.Merten. *Study of plasma parameters influencing fractionation in laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry*. 2010, 65, 991-1001. Spectrochimica Acta Part B.
15. C.Latkoczy y T.Ghislain. *Simultaneous LIBS and LA-ICP-MS analysis of industrial samples*.2006, 21, 1152-1160. Journal of Analytical Atomic Spectrometry.
16. <http://en.dogeno.us/2009/11/use-the-fundamental-principle-for-laser-amplification-to-ultra-sensitivebiological-imaging/> (11/06/2014).
17. http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/rehabilitacion-fis/laser_morrillo.pdf (11/06/2014).
18. P.Atkins, J.De Paula.2006, 8th edición, 147. Atkin´s Physical Chemistry.
19. I.Horn, F.von Blanckenburg. *Investigation on elemental and isotopic fractionation during 196 nm femtosecond laser ablation multiple collector inductively coupled plasma mass spectrometry*.2007, 62, 410-422. Spectrochimica Acta Part B.
20. M.Frena, D.P.C.Quadros, N.B.Castilho, S.de Gois, L.G.Borges, B.Welz, A.S.Madureira. *A novel extraction-based procedure for the determination of trace elements in estuarine sediment samples by ICP-MS*.2014, 117, 1-6. Microchemical Journal.
21. Y-K.Kwon, Y-S.Bong, K-S.Lee, G-S.Hwang. *An integrated analysis for determining the geographical origin of medicinal herbs using ICP-AES/ICP-MS and ¹H NMR analysis*. 2014, 161, 168-175. Food Chemistry.
22. Barros, C.de Esparza, Wong, Mori. Capítulo 7, pág.114. Espectrometría de masas con plasma inductivamente acoplado.
23. <http://es.scribd.com/doc/48910008/CAPACITACION-NEBULIZADOR> (12/06/2014).
24. http://www.uam.es/personal_pas/txrf/icpms.html (12/06/2014).
25. http://www.chem.agilent.com/Library/slidepresentation/Public/1.Principios_B%C3%A1sicos_de_la_t%C3%A9cnica_ICP-MS.pdf (12/06/2014).

26. www.upct.es/~minaees/practica_icpms.doc (13/06/2014).
27. <http://www.gomensoro.net/geoquimica/13-spectro-ms-primer-icp-ms-totalmente-simultaneo#interfaz> (13/06/2014).
28. <http://crystal.usgs.gov/laboratories/icpms/intro.html> (13/06/2014).
29. A.Requena, R.Quintanilla, J.M.Bolarín, A.Vázquez, A.Bastida, J.Zúñiga y L.M.Tomás. 2-15,. Nuevas Tecnologías y Contaminación de Atmósferas. Universidad de Murcia. (<http://www.um.es/LEQ/Atmosferas/Ch-V-2/F52s15p1.htm>). (14/06/2014).
30. http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/097/htm/sec_9.htm (11/06/2014)
31. I.Horn, D.Günther, M.Guillong, *Evaluation and design of a solid-state 193 nm OPO-Nd:YAG laser ablation system*. 2003, 58, 1838-1846. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy
32. Z.Qin, FA.Caruso, B.Lai, A.Matusch, JS.Becker. *Trace metal imaging with high spatial resolution: Applications in biomedicine*. 2011, 3, 28-37. Metallomics.
33. J.Feldmann, A.Kindness, P.Ek. *Laser ablation of soft tissue using a cryogenically cooled ablation cell*.2002, 17, 813-818. Journal of Analytical Atomic Spectrometry.
34. V.Zoriy, M.Kayser, A.Izmer, C.Pickhardt, J.S.Becker. *Determination of uranium isotopic ratios in biological samples using laser ablation inductively coupled plasma double focusing sector field mass spectrometry with cooled ablation chamber*. 2005, 242, 297-302. International Journal of Mass Spectrometry
35. I.Konz, B.Fernández, M.L.Fernández, R.Pereiro, A.Sanz Medel. *Design and evaluation of a new Peltier-cooled laser ablation cell with on-sample temperature control*.2014, 809, 88-96. Analytical Chimica Acta.
36. B.Fernández, I.Konz, A.Castañeda, M.L.Fernández, R.Pereiro, A.Sanz Medel. Patente N° ES2425138. Fecha de concesión: 03/06/2014.