

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento Química Analítica



TESIS DOCTORAL

**Estudios de invariabilidad climática y estacionalidad
mediante espectroscopia láser**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alicia Marín Roldán

Director

Jorge Omar Cáceres Gianni

Madrid, 2018



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

Departamento de Química Analítica

**Estudios de variabilidad climática y
estacionalidad mediante espectroscopía láser**

Alicia Marín Roldán

Tesis Doctoral

Madrid 2017



Director

Jorge Omar Cáceres Gianni

Certificado

Jorge Omar Cáceres Gianni, Director del Grupo de Investigación de Química Laser, Doctor en Ciencias Químicas, Profesor Titular del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado “Estudios de variabilidad climática y estacionalidad mediante espectroscopía láser” ha sido realizado por Alicia Marín Roldán en el laboratorio de Química Láser del Departamento de Química Analítica de la Universidad Complutense de Madrid bajo mi dirección, reuniendo a mi juicio los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid, por lo que autorizo su presentación.

Jorge Omar Cáceres Gianni
Doctor en Ciencias Químicas
Director del Grupo de Química Láser
Universidad Complutense de Madrid

Madrid, 25 de Abril de 2017

Agradecimientos

Al término de esta etapa de mi vida, quiero expresar un profundo agradecimiento a quienes con su ayuda, apoyo y comprensión me alentaron a lograr esta hermosa realidad. Sabiendo que jamás encontraré la forma de agradecer su constante apoyo y confianza, sólo espero que comprendan que mis ideales, esfuerzos y logros han sido también suyos e inspirados en todos ellos.

En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento al director de esta tesis doctoral, Dr. Jorge Cáceres, por permitir el desarrollo de esta tesis, por brindarme su capacidad y experiencia científica y por la dedicación y apoyo durante el desarrollo de esta tesis. También a los profesores miembros del grupo de investigación de Química Láser: Dr. Daniel Rosales y Dr. Roberto Izquierdo, gracias por toda la ayuda que siempre me han proporcionado. Y al Dr. Javier Villena, por su apoyo y consejos desde mis estudios de grado. Quiero también expresar mi agradecimiento especial a todos aquellos profesores que han colaborado en la ejecución de muchos de los trabajos realizados en esta tesis, facilitando sus instalaciones y equipos, y aportando una inestimable ayuda y una valiosa aportación a la discusión de los resultados: Vincent Motto-ros, Joaquín Camacho, Javier Chivelet y José Yravedra. Quisiera agradecer y hacer una mención especial a Javier Chivelet, por su apoyo económico al desarrollo de esta tesis mediante la financiación de un contrato de colaboración mediante el proyecto CGL2013-43257-R. Agradecer también a José Yravedra y Vicente Pérez Arribas, por sus valiosos comentarios y opiniones sobre el contenido de esta tesis y, por supuesto, por prestarse amablemente a realizar la evaluación de la misma en un tiempo récord.

Para mis compañeros del grupo de Química Láser, tengo sólo palabras de agradecimiento, especialmente por aquellos momentos en los que las risas, tan necesarias en los momentos difíciles de esta profesión, allanaban el duro y largo camino. Especialmente al Dr. Samuel Moncayo, generoso y dispuesto como pocos, que compartió conocimientos y experiencias con todos nosotros. A la Dr. Sadia Manzoor, con quien he compartido proyectos e ilusiones durante estos años, y quien, con su compañerismo, amistad y apoyo moral ha aportado en un gran porcentaje a mis ganas de seguir adelante. Y a los que estuvieron con nosotros, aunque fuese por poco tiempo: Juncal Cruz, Carmen Rico Rodríguez, Jesús

Sánchez Flores, Ester Sánchez Tirado, Lydia Ugena García-Consuegra, Elena Anastasiou, Eirini Stamati, entre otros muchos.

Y, por supuesto, el agradecimiento más profundo y sentido va para mi gran y numerosa familia. A mis padres, Mamen y Jose Fernando, quienes con esfuerzo sacrificaron gran parte de su vida para educarme, porque siempre me animaron a seguir estudiando y de los que siempre recibía palabras de aliento. A mis abuelos, Francisco y Carolina, como un testimonio de eterno agradecimiento por el apoyo moral que desde siempre me brindaron y con el cual he logrado llegar hasta donde estoy, por el gran amor y la confianza que siempre me brindaron. A mis primos, Martino y Ana, por aguantar e incluso participar en mis “*frikadas*” científicas de las reuniones familiares, y por compartir conmigo la ilusión de cada avance. Y por supuesto, a mi segunda familia, la karateka, gracias por ayudarme cada día a cruzar con firmeza el camino de la superación, porque con su apoyo y aliento, hoy he logrado uno de mis más grandes deseos. Juan Carlos, Emiliano, Agustín, Frank, Raquel, y un largo etcétera, mi amor y agradecimiento infinito para todos ellos, pues todos forman parte de mi vida.

Y a todas aquellas personas, que de alguna manera han contribuido a alcanzar este objetivo y que comparten conmigo este triunfo. A todos ellos, muchas gracias.

Sólo me queda de ti tu recuerdo,
Ya no eres actual, eres historia.
Yo te quería,
Ahora renaces en mi memoria,
Ahora te quiero
Como se quiere a una idea,
Pero te quiero igual, o más,
Porque el amor
No siempre precisa
Volumen que lo evidencie,
Sombra que lo justifique.

Ojalá estuvieras aquí, Yaya.
Te echamos de menos.

ÍNDICE:

RESUMEN.....XIII
ABSTRACT.....XVI
OBJETIVOS.....XIX
PUBLICACIONES.....XXI

Capítulo 1: Introducción.....25
 1.1 Espectroscopía de ablación láser.....25
 1.2 Proceso de ablación.....27
 1.3 Dinámica del plasma.....29
 1.4 Evolución temporal del plasma.....34
 1.5 Estado del arte actual de LIBS en muestras geológicas y arqueológicas.....36
 1.6 Introducción a la reconstrucción de series paleoclimáticas.....38
 1.7 Introducción al análisis de tejidos con fines arqueológicos.....38

Capítulo 2: Análisis mediante LIBS.....43
 2.1 Análisis cuantitativo.....44
 - Calibración con patrón interno.....45
 - Calibración basada en parámetros físicos del plasma (Calibration Free-LIBS).....46
 2.2 Análisis cualitativo: clasificación de muestras.....54

Capítulo 3: Métodos quimiométricos.....59
 3.1 Introducción a la quimiometría.....59
 3.2 Modelos quimiométricos.....60
 - Clasificación de los modelos.....60
 - Procedimiento de empleo de los métodos quimiométricos.....62
 3.3 Análisis de componentes principales (PCA).....63
 3.4 Redes neuronales artificiales (NN).....68
 - Redes neuronales artificiales.....69
 - Modelo de neurona artificial.....70
 - Arquitecturas.....71

- Fase de entrenamiento.....	73
- Generalización.....	75
- Robustez del modelo.....	76
Capítulo 4: Instrumentación y sistema experimental.....	77
4.1 Instrumentación LIBS.....	77
- Láser.....	78
- Óptica.....	81
- Posicionamiento de la muestra.....	81
- Espectrómetros.....	81
- Detectores.....	84
4.2 Sistemas experimentales empleados.....	85
- Sistema experimental utilizado en la UCM.....	85
- Sistema experimental utilizado en la UAM.....	86
- Sistema experimental utilizado en el ILM (Lyon, Francia).....	87
Capítulo 5: Geoquímica: análisis de espeleotemas mediante LIBS.....	89
5.1 Preparación de las muestras.....	89
5.2 Evaluación de la técnica LIBS para la detección de la variación de elementos traza en espeleotemas.....	92
- Resumen.....	92
- Introducción.....	93
- Procedimiento experimental.....	94
- Resultados.....	94
- Conclusiones.....	97
- Agradecimientos.....	98
5.3 Elementos traza como indicadores del clima.....	98
- Resumen.....	99
- Introducción.....	99
- Procedimiento experimental.....	100
- Análisis mediante LIBS.....	101
- Conclusiones.....	104

- Agradecimientos.....	104
5.4 Análisis de imágenes multielementales para estudios paleoclimáticos.....	105
- Resumen.....	105
- Introducción.....	106
- Sistema de auto-enfoque.....	108
- Procedimiento experimental.....	110
- Construcción de las imágenes.....	110
- Resultados.....	111
- Comparación con otras técnicas analíticas.....	115
- Conclusiones.....	116
- Agradecimientos.....	117
Capítulo 6: Análisis arqueológico mediante LIBS.....	119
6.1 Determinación del intervalo post-mortem en tejido muscular.....	119
- Resumen.....	119
- Introducción al intervalo <i>post-mortem</i> (PMI).....	120
- Materiales y métodos.....	122
- Resultados.....	124
- Conclusiones de la determinación del PMI.....	129
- Agradecimientos.....	130
6.2 Dinámica del plasma producido mediante LIBS en muestras de tejido muscular.....	130
- Resumen.....	131
- Introducción al análisis de plasmas.....	131
- Procedimiento experimental.....	133
- Resultados.....	134
- Conclusiones.....	149
- Agradecimientos.....	150
6.3 Caracterización resuelta en tiempo del plasma producido mediante LIBS.....	150
- Resumen.....	150
- Introducción a la caracterización resuelta en tiempo.....	151
- Procedimiento experimental.....	153

- Resultados.....	154
- Conclusiones.....	167
- Agradecimientos.....	167
6.4 Estudio preliminar de estacionalidad en muestras dentales de fauna mediante LIBS.....	168
- Resumen.....	168
- Introducción a la estacionalidad.....	168
- Procedimiento experimental.....	169
- Muestras.....	169
- Temperatura ambiental.....	170
- Resultados.....	170
- Conclusiones del análisis de piezas dentales.....	174
6.5 Discriminación de restos óseos faunísticos para estudios arqueológicos.....	175
- Resumen.....	175
- Introducción.....	175
- Procedimiento experimental.....	177
- Resultados.....	182
- Conclusiones de la discriminación de restos óseos.....	185
6.6 Implicación del ensamblaje de huesos de fauna mediante LIBS-NN en el comportamiento humano temprano.....	186
- Resumen.....	186
- Introducción al análisis de muestras arqueológicas.....	187
- Procedimiento experimental.....	189
- Resultados preliminares.....	191
- Conclusiones de la discriminación de muestras arqueológicas.....	192
CONCLUSIONES.....	195
CONCLUSIONS.....	199
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	203
ANEXOS.....	215

Resumen

La espectroscopía de ablación láser (LIBS) es una técnica analítica que se basa en la formación de un plasma por efecto de la interacción entre un pulso láser de alta energía y la superficie de la muestra a analizar. El posterior análisis espectroscópico de la luz emitida por el plasma permite la identificación de la muestra y de los elementos mayoritarios y algunos elementos traza. LIBS se ha convertido en una técnica espectroscópica muy utilizada debido al conjunto de ventajas que presenta, siendo las más destacables su simplicidad, su velocidad de análisis y su alta versatilidad en cuanto a tamaño y manipulación de las muestras. Así, se ha demostrado su aplicabilidad a una gran variedad de muestras y campos de estudio: aleaciones metálicas, forense, alimentario, geoquímica, arqueología, medicina, entre otros muchos.

El objetivo principal de esta tesis es el desarrollo de una metodología analítica basada en LIBS para el estudio de muestras geológicas, biológicas y zoo-arqueológicas. El desarrollo de la presente tesis está motivado a dilucidar la variabilidad climática, estrechamente relacionada con la estacionalidad y los procesos arqueológicos. Por ello, durante el desarrollo de esta tesis se han realizado diversos estudios basados en la espectroscopía de ablación láser para la optimización del análisis de muestras de tejido de origen zoo-arqueológico, tanto tejido blando como óseo. De esta manera este objetivo general contiene otros objetivos específicos, como la obtención de relaciones elementales (Mg/Ca, Sr/Ca) mediante la técnica LIBS para la búsqueda de patrones de variabilidad paleoclimática en espeleotemas según la estratigrafía interanual. Se ha realizado la formación de imágenes multielementales de megapíxeles por LIBS para el análisis de espeleotemas y el estudio de la dinámica del plasma por LIBS para la optimización de las medidas y mayor comprensión de las muestras. Por ello, también se han utilizado otras técnicas de análisis, como SEM-EDX (microscopía electrónica de barrido y microanálisis por dispersión de energía rayos-X), para el estudio de la morfología de la superficie de la muestra. Dentro del campo de la arqueología se han realizado estudios de reagrupamientos de huesos de ciervo actuales y fósiles para el estudio de yacimientos mediante LIBS y métodos quimiométricos, como el análisis de componentes principales (PCA) o redes neuronales (NN).

La estructura de la tesis consta principalmente de dos partes:

- La primera (capítulos 1 - 3) desarrolla los fundamentos teóricos tanto de la técnica LIBS como de los métodos quimiométricos utilizados durante la ejecución de esta tesis doctoral.
 - En el capítulo 1 “Introducción” se exponen las características de la técnica LIBS, cómo es el proceso de ablación, la dinámica del plasma, su evolución temporal, el estado del arte actual de LIBS para muestras geológicas y zooarqueológicas, la introducción a la reconstrucción de series paleoclimáticas y la introducción al análisis de tejidos con fines arqueológicos.
 - El capítulo 2 “Análisis mediante LIBS” expone los distintos métodos de cuantificación y los tipos de análisis cualitativos, así como sus principales aspectos analíticos (precisión, exactitud, etc.).
 - El capítulo 3 “Métodos quimiométricos” expone una breve introducción a la quimiometría y a los principales modelos quimiométricos, haciendo hincapié en los dos empleados en esta tesis: el análisis de componentes principales (PCA) y las redes neuronales artificiales (NN).
- En la segunda parte (capítulos 4 - 6) se presentan los resultados experimentales obtenidos:
 - El capítulo 4 “Instrumentación y sistema experimental” muestra toda la instrumentación necesaria, así como los sistemas experimentales e instrumentación utilizados en los distintos centros.
 - El capítulo 5 “Geoquímica: análisis de espeleotemas mediante LIBS” aborda el desarrollo de una metodología LIBS para el análisis de elementos traza presentes en espeleotemas, así como la realización de imágenes elementales, para su utilización como indicadores paleoclimáticos.

- El capítulo 6 “*Análisis arqueológico mediante LIBS*” incluye el análisis de muestras de tejido como estudio preliminar de tejido blando, el estudio de la dinámica y evolución temporal del plasma para la optimización de los parámetros experimentales, un estudio de estacionalidad sobre muestras dentales y la discriminación de restos óseos actuales y arqueológicos. La finalidad de este compendio es la consecución del análisis de muestras de tipo zoo-arqueológico para estudios de estacionalidad y comportamiento humano.
- Tras el capítulo 6 se discuten las principales conclusiones y los retos futuros derivados de este trabajo.
- Por último, se añade un anexo con las diversas publicaciones producidas durante el desarrollo de esta tesis.

Abstract

Laser induced breakdown spectroscopy (LIBS) is an analytical technique based on the formation of a plasma by the interaction between a high-energy laser pulse and the surface of the analysed material. The subsequent spectroscopic analysis of the light emitted by the plasma allows the identification of the material. LIBS has become a widely used spectroscopic technique due to its advantages, such as its simplicity, speed of analysis and high versatility in size and sample handling. Thus, it has been demonstrated its applicability to a great variety of samples and fields of study: metal alloys, forensics, food, geochemistry, zooarchaeology, medicine, among many others.

The main objective of this thesis is the development of an analytical methodology based on LIBS for the study of geological, biological and zooarchaeological samples. The development of this thesis is motivated to elucidate climatic variability, closely related to seasonality and archaeological processes. For this reason, several studies based on laser induced breakdown spectroscopy have been carried out during the development of this thesis to optimize the analysis of tissue samples from zooarchaeological origin, both soft and bone tissue. In this way, this general objective contains other specific objectives, such as obtaining elemental relationships (Mg/Ca, Sr/Ca) using the LIBS technique for the search of paleoclimatic variability patterns in speleothems, according to inter-annual stratigraphy. In addition, the formation of multi-element images of megapixels by LIBS for the analysis of speleothems has been achieved. It has also been studied the dynamics of the plasma by LIBS for the optimization of measurements and greater understanding of the samples. For this reason, other analysis techniques, such as EDX-SEM, have also been used for the study of the surface morphology of the sample. In the field of archaeology, studies have been carried out on collections of present deer bones and fossils, for the study of archaeological sites, using LIBS and chemometric methods (PCA and NN).

The structure of the thesis consists mainly of two parts:

- The first part (chapters 1 - 3) introduce the theory of both the technique and the chemometric methods used during the development of this doctoral thesis.
 - Chapter 1 "Introduction" presents the characteristics of the LIBS technique, how is the ablation process, the plasma dynamics, its temporal evolution, the current state of the art of LIBS for geological and archaeological samples, the introduction to the Reconstruction of paleoclimatic series and the introduction of tissue analysis for archaeological purposes.
 - Chapter 2 "Analysis using LIBS" expose the different quantification methods and types of qualitative analyses, as well as their main analytical aspects (precision, accuracy, etc.).
 - Chapter 3 "Chemometric Methods" presents a brief introduction to chemometrics and the main chemometric models, emphasizing the two employed in this thesis: Principal Component Analysis (PCA) and Artificial Neural Networks (NN).
- The second part (chapters 4 - 6) presents the experimental results obtained:
 - Chapter 4 "Instrumentation and experimental system" shows all the necessary instrumentation as well as the experimental systems and instrumentation used in the different research centres.
 - Chapter 5 "Geochemistry: speleothems analysis using LIBS" addresses the issue of the development of a LIBS methodology for the analysis of trace elements present in speleothems, as well as the production of elemental images, for use as paleoclimatic indicators.
 - Chapter 6 "Archaeological Analysis by LIBS" includes the preliminary analysis of soft tissue samples, the study of the dynamics and temporal evolution of the plasma

for the optimization of the experimental parameters, a seasonality study on teeth samples and the discrimination of current and archaeological bone remains. The purpose of this compendium is the accomplishment of the analysis of samples of zooarchaeological type for studies of seasonality and human behaviour.

- After Chapter 6, the main conclusions and the future challenges derived from these works are discussed.

- Finally, an annex is added with the various publications produced during the development of this thesis.

Objetivos

El objetivo principal de esta tesis es el desarrollo de una metodología analítica basada en LIBS para el estudio de muestras de origen geológico y arqueológico. La primera parte de la tesis está motivada a dilucidar la variabilidad climática y sus causas, para así poder predecir la influencia de los posibles cambios climáticos en el futuro. Para ello, se pretende obtener mediante esta metodología LIBS patrones de variabilidad paleoclimática, tales como las relaciones elementales Mg/Ca y Sr/Ca analizando la estratigrafía interanual de espeleotemas. Además, se pretende también la formación de imágenes multielementales de megapíxeles por LIBS de espeleotemas para el análisis paleoclimático.

La segunda parte de la tesis consiste en un conjunto de diversos estudios basados en la espectroscopía de ablación láser con el fin de realizar el análisis de muestras de tejido de origen arqueológico, tanto tejido blando como óseo. Así, esta línea de investigación comienza con el desarrollo de una metodología para el estudio de tejido blando muscular para la determinación del intervalo *post mortem*. Esto lleva a querer conocer en profundidad las características de la técnica en cuanto a dinámica del plasma, utilizando las muestras anteriores, para así optimizar los análisis de tejidos posteriores. Una vez concluido este proceso se procede al estudio de tejido óseo, primero para estudios de estacionalidad, y después, para realizar la correcta asignación de restos óseos al individuo al que pertenecen, primero con muestras actuales y después, muestras de carácter arqueológico, alcanzando así el objetivo último de esta línea arqueológica de investigación.

Este objetivo principal contiene otros objetivos específicos, como son:

1. Estudiar las condiciones del sistema LIBS en la interacción radiación láser-materia y optimizar dichas condiciones necesarias para el desarrollo y aplicación de una metodología para la determinación de elementos traza (Mg y Sr), presentes en muestras de origen geológico para la formación de series de variabilidad paleoclimática en espeleotemas.

2. Mostrar y validar la robustez del método basado en LIBS, y comparar los resultados obtenidos con otras técnicas de análisis más arraigadas.
3. Mostrar el potencial de la técnica para la obtención de imágenes de composición elemental a escala micrométrica, y sus posibles aplicaciones al análisis geoquímico.
4. Desarrollar una metodología de análisis basada en LIBS mediante la obtención de relaciones elementales para el análisis de muestras de tejido.
5. Optimizar las condiciones de detección de la técnica LIBS mediante el estudio del comportamiento y la dinámica del plasma para mejorar las capacidades analíticas de la técnica.
6. Aplicar la técnica LIBS para estudios de estacionalidad en muestras dentales mediante el análisis de la variabilidad de elementos traza.
7. Desarrollar e implementar la técnica LIBS para la discriminación de restos óseos, combinando métodos quimiométricos con la técnica LIBS para el reagrupamiento de muestras de interés arqueológico.

Publicaciones

El desarrollo de esta tesis ha dado lugar a las siguientes publicaciones y presentaciones en congresos:

Publicaciones en revistas:

- “*Megapixel multi-elemental imaging by Laser-Induced Breakdown Spectroscopy, a technology with considerable potential for paleoclimate studies*”, Jorge Cáceres, F. Pelascini, Vincent Motto-Ros, Samuel Moncayo, Florian Trichard, G. Panczer, Alicia Marín Roldán, Juncal A. Cruz, Ismael Coronado and Javier Martín-Chivelet, *Nature: Scientific reports* (Aceptado con cambios).
- “*Time-resolved study of the laser-produced plasma from swine muscle tissue*”, Samuel Moncayo, Alicia Marín Roldán, Joaquín J. Camacho and Jorge O. Cáceres, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (En proceso).
- “*Plume dynamics of laser-produced swine muscle tissue plasma*”, Joaquín J. Camacho, Luis Díaz, Alicia Marín Roldán, Samuel Moncayo, and Jorge O. Cáceres, *Applied Spectroscopy*, 70 (7) 1228-1238, (2016).
- “*Long-term hydrological changes in northern Iberia (4.9 - 0.9 ky BP) from speleothem Mg/Ca ratios and cave monitoring (Ojo Guareña Karst Complex, Spain)*”, J.A. Cruz, M.J. Turrero, J.O. Cáceres, A. Marín Roldán, A.I. Ortega, A. Garralón, L. Sánchez, P. Gomez, M.B. Muñoz-García, R.I. Edwards, J. Martín-Chivelet, Special Issue “Progress in Karst Research”, *Environmental Earth Sciences*, (2015).
- “*Trace Elements in Speleothems as Indicators of Past Climate and Karst Hydrochemistry: A Case Study from Kaite Cave (N Spain)*”, J.A. Cruz, J. Martín Chivelet, A. Marín-Roldán, M.J. Turrero, R.L. Edwards, A.I. Ortega and J.O. Cáceres,

Hydrogeological and Environmental Investigations in Karst Systems, Serie: Environmental Earth Sciences, 1 569-577, (2015).

- “*Evaluation of Laser Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) for detection of trace element variation through stalagmites: potential for paleoclimate series reconstruction*”, A. Marín-Roldán, J. A. Cruz, J. Martín-Chivelet, M. J. Turrero, A. I. Ortega, J.O. Cáceres, Journal of Applied and Laser Spectroscopy, 1 7-12, (2014).

- “*Determination of the postmortem interval by Laser Induced Breakdown Spectroscopy using swine skeletal muscles*”. A. Marín Roldán, Sadia Manzoor, Samuel Moncayo, Fernando Navarro-Villoslada, Roberto Izquierdo, J.O. Cáceres, Spectrochimica Acta Part B Atomic Spectroscopy, 88 186-191, (2013).

Contribuciones en congresos internacionales:

- 14 – 18 Septiembre 2016. Alcalá de Henares, España. 6th Annual European Society for the study of Human Evolution (ESHE) Meeting. “Faunal bone discrimination for archaeological purposes by laser plasma spectroscopy” (Póster)

- 12 – 16 Septiembre 2016. Chamonix, Francia. 9th International Conference on Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. “LIBS for multi-elemental imaging in paleoclimate studies” (Póster)

- 26 Junio – 1 Julio 2016. Yokohama, Japón. Goldschmidt2016. “Multi-Scale Hydrological Variability in N Iberia during the Mid to Late Holocene from Speleothem Mg/Ca” (Póster)

- 14 – 16 Octubre 2015. Évora, Portugal. XI Congreso Ibérico de Arqueometría. “Estudio preliminar de estacionalidad utilizando dientes de fauna mediante análisis por espectroscopia de plasma inducido por láser” (Presentación oral)

- 11 Marzo 2015. Tortosa, Tarragona, España. Simposio Internacional CLIMA-ES 2015. “Late Holocene Paleohydrological Changes in Northern Spain Reconstructed from Mg/Ca Stalagmite Microstratigraphy” (Póster)
- 14 – 16 Octubre 2014. Málaga, España. 5th International Symposium on Karst. “Trace Elements in Speleothems as Indicators of Past Climate and Karst Hydrochemistry: A Case Study from Kaite Cave (N Spain)” (Póster)
- 29 Septiembre – 3 Octubre 2014. Melbourne, Australia. 7th International Conference. Climate Change: The Karst Record VII (KR7). “Evaluation of Laser-Induced Breakdown spectroscopy (LIBS) for obtaining trace element time-series in speleothems” (Póster)
- 9 – 11 Julio 2014. Logroño, España. XXIV Reunión Nacional de Espectroscopia-VIII Congreso Ibérico de Espectroscopia. “Laser Induced Breakdown Spectroscopy as a Geochemical Tool to Determine Paleoclimatic Changes Using Speleothem” (Póster)
- 9 – 11 Julio 2014. Logroño, España. XXIV Reunión Nacional de Espectroscopia-VIII Congreso Ibérico de Espectroscopia. “Time and space resolved optical emission diagnostics of laser induced breakdown muscle tissue samples” (Póster)
- 16 – 18 Junio 2013. Úbeda, España. XVIII Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica. “Determinación del intervalo post mortem en tejidos mediante Espectroscopía de Ablación Láser (LIBS)” (Póster)
- 28 Julio – 2 Agosto 2013. Hiedelberg, Alemania. Summer School con Speleothems Science. “Microstratigraphy of trace elements in speleothems with LIBS: Preliminary study” (Póster)

- 26 Octubre 2012. Roma, Italia. Organizzazione e disagio da lavoro: nuovi strumenti per migliorare competitività e prevenzione a livello europeo. “Determinación del intervalo post mortem mediante Espectroscopía de Ablación Láser (LIBS) usando músculo esquelético de cerdo” (Presentación oral)

- 17 – 20 Septiembre 2012. Córdoba, España. XXIII Reunión Nacional de Espectroscopía y VII Congreso Ibérico de Espectroscopía. “Aplicación de la Espectroscopia de Ablación Láser para resolver problemas forenses: determinación del intervalo post-mortem de muestras de piel y músculo” (Póster)

Capítulo 1: Introducción

1.1. Espectroscopía de ablación láser (LIBS)

La técnica LIBS consiste en irradiar la superficie de una muestra con un pulso láser del orden de los mJ y una duración típica de varios ns¹. Esta elevada densidad de energía es suficiente para vaporizar cualquier tipo de material formando un plasma, que contiene la información analítica de los elementos presentes en la muestra. Estudiando espectral y temporalmente, la radiación que emiten las especies excitadas presentes en el plasma es posible obtener un espectro de emisión de los iones, átomos y moléculas formadas durante el proceso de ablación². Cada elemento posee una huella espectral diferente, emitiendo a longitudes de onda características, lo que permite su identificación inmediata³. En la Figura 1.1.1 puede observarse el proceso de formación del plasma al interactuar un haz láser con la superficie de la muestra:

Los fenómenos físicos involucrados en la técnica LIBS son bien conocidos⁴:

- vaporización del material dando lugar a átomos libres
- excitación de los mismos
- detección de la luz emitida tras su desactivación

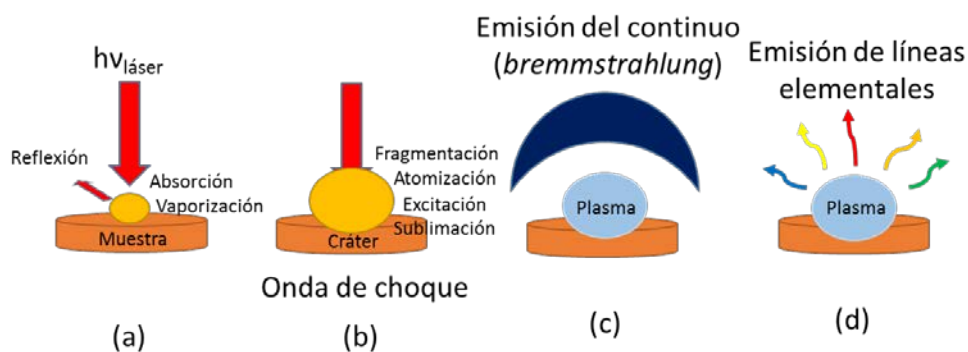


Figura 1.1.1: Proceso LIBS esquematizado: (a) Absorción del pulso láser por la muestra, (b) Formación de un cráter mediante la vaporización y excitación de la superficie de la muestra, (c) Emisión de luz y sonido al producirse una onda de choque por la diferencia de presión, (d) Emisión característica de los componentes de la muestra.

El proceso de la formación del plasma a partir de la irradiación con un láser es un proceso complejo donde es necesario que la energía del pulso sea lo suficientemente intensa como para producir fenómenos de sublimación, evaporación y extracción de partículas del material y la formación del plasma. La eyección del material ablacionado va acompañada de un sonido característico, el cual se origina como consecuencia de la onda de choque creada cuando la radiación laser comprime la atmósfera que rodea al plasma. Cuando el láser incide sobre el material, se forma un plasma luminoso transitorio de alta temperatura y alta densidad electrónica. El resultado es un cráter de pocos cientos de micras de diámetro. Por otro lado, cuando se emplean láseres con una anchura temporal de nanosegundos, la interacción láser-materia es lo suficientemente prolongada como para que la transferencia de calor se produzca eficientemente, por lo que el material se calienta (sufriendo un proceso de fusión y evaporación) provocando que la zona afectada térmicamente sea mayor que el diámetro del haz láser⁴. Cuando la duración del pulso es inferior a 1 ns, únicamente actúan mecanismos de tipo fotomecánico y fotoquímico. En este caso, al tratarse de un proceso prácticamente atómico, la zona afectada térmicamente es despreciable y, por tanto, el tamaño del cráter coincidirá con el diámetro del haz incidente.

Existen diversas técnicas que permiten la realización de imágenes elementales para el análisis de la distribución espacial de elementos en una muestra, como son la emisión óptica de plasma acoplada inductivamente a la ablación con láser (LA-ICP-OES), la espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (LA-ICP-MS)^{5,6}, la microespectrometría de fluorescencia de rayos X (μ -XRF)^{7,8}, el análisis de microscopía electrónica (EPMA)⁹, la emisión de rayos X inducida por protones (PIXE)¹⁰, la espectrometría de masas de ionización secundaria (SIMS)^{11,12}, y las técnicas de microscopía de rayos X de sincrotrón^{6,13}. Además, la técnica LIBS permite el escaneo multi-elemental rápido de muestras, con una alta sensibilidad (ppm), resolución lateral y velocidad. En la literatura existen algunos trabajos donde se han desarrollado metodologías para su empleo en la formación de imágenes, generando de esta manera una nueva perspectiva a la hora de obtener información espectroscópica, con gran número de posibles aplicaciones¹⁴. Por ello, durante el desarrollo de esta tesis se han realizado mapas elementales de muestras geológicas para su utilización en la investigación paleoclimática¹⁵. Las principales ventajas de esta técnica, para realizar imágenes elementales, además de las mencionadas anteriormente, son

la mínima preparación de muestra, la falta de restricciones en la forma o tamaño de la misma, sin limitaciones técnicas o necesidad de realizar vacío. Además, posee una alta velocidad de análisis de las muestras, regido por la tasa de repetición del láser y la velocidad de adquisición del detector, ya que el registro espectral se digitaliza y almacena instantáneamente. De esta manera, se pueden realizar análisis muy rápidos a una fracción del coste de la mayoría de las otras técnicas¹⁶.

1.2. Proceso de ablación

Cuando la radiación electromagnética emitida por un láser pulsado (pulso láser de alta potencia) incide sobre la superficie de un material se producen diversos fenómenos, entre ellos la reflexión, la transmisión, la dispersión y/o la absorción. La energía absorbida por el material puede a su vez dar lugar a la emisión de luz (fluorescencia, fosforescencia), calentar el material, fundirlo, producir vaporización, desencadenar reacciones químicas o generar un plasma. La presencia y eficiencia de cada fenómeno dependerá de las propiedades del material, de la irradiancia del láser y de su longitud de onda. La duración del pulso láser puede variar típicamente entre los microsegundos y los femtosegundos. En general, se denomina láseres de pulsos largos a aquellos cuya duración es del orden de los microsegundos o superiores, láseres de pulsos cortos a aquellos cuya duración es del orden de los nanosegundos y láseres de pulsos ultracortos a aquellos cuya longitud temporal de pulso es del orden de los picosegundos o femtosegundos. Si la irradiancia es superior a los 10^9 W/cm^2 el material se vaporiza violentamente y se produce el fenómeno de ablación¹⁷. El umbral de ablación es la mínima potencia por unidad de área necesaria para producir ablación, y depende de las propiedades del material, y de las características de la emisión del láser.

Además, el proceso de ablación está acompañado de la generación de luz y sonido. La emisión de luz se produce porque el material que interactúa con el láser es vaporizado violentamente, se rompen los enlaces de las estructuras que unen a los átomos y éstos se excitan e ionizan formando un plasma. Este plasma es extremadamente caliente, lo que produce un incremento violento de la presión, generando así una diferencia de presiones entre

la zona del plasma y la atmósfera que rodea a éste¹⁸. Este proceso genera una onda de choque que se percibe como un chasquido.

La ablación con láseres de pulsos cortos (nanosegundos) genera cráteres con crestas y con material re-depositado en los bordes y el fondo, proveniente de re-solidificación (Figura 1.2.1). Este fenómeno ocurre debido a que el pulso láser incidente tiene una duración temporal mayor que el tiempo de difusión térmica del calor en el material y se produce una onda térmica que se propaga hacia el interior del material, provocando la fusión del material cerca de la zona irradiada.

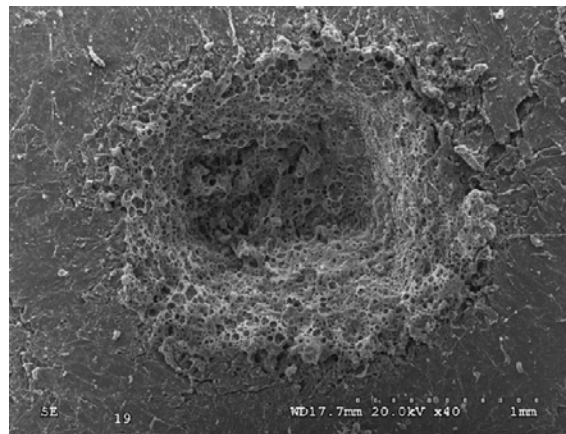


Figura 1.2.1: Cráter con re-deposición de material en los bordes y el fondo.

Los mecanismos del proceso de ablación aún no se entienden completamente, y todavía se están estudiando¹⁹. Los procesos que intervienen en la ablación pueden ser fototérmicos o fotoquímicos. La ablación fototérmica tiene lugar en las bandas visible e infrarroja del espectro, mientras que la ablación fotoquímica se produce en la parte ultravioleta, aunque todo depende de las características del material².

- Ablación fototérmica: en la superficie del material, la temperatura se eleva por la duración del pulso, mientras que la energía está siendo absorbida. Una vez que el pulso láser ha concluido, la temperatura cae mientras el calor es conducido al interior del material. Esto va acompañado de la generación de tensiones dentro del material. Si se aumenta la densidad de potencia de la radiación incidente, se producirán cambios de fase: fusión y vaporización (explosión térmica). En la

Figura 1.2.2 se muestra un esquema del funcionamiento de la ablación fototérmica.

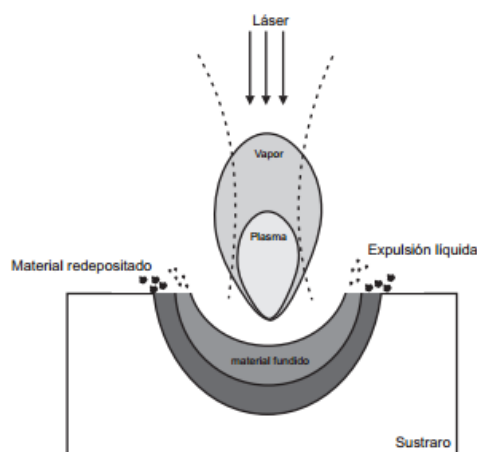


Figura 1.2.2: Esquema del proceso de la ablación fototérmica²⁰.

- Ablación fotoquímica: la radiación ultravioleta, debido a su alta energía, puede romper los enlaces covalentes, e iniciar una reacción química sin producir calentamiento, en la que los productos tienen un volumen mayor que la muestra original, y, por tanto, son eyectados de la superficie.

1.3. Dinámica del plasma

En el mundo microscópico, las colisiones tomadas como contacto físico entre los cuerpos pierden el sentido. En su lugar, la colisión se considera una interacción entre los campos de fuerza de cada una de las partículas que interactúan, asociados a la naturaleza y el movimiento de las propias partículas⁴. Las interacciones entre las partículas presentes en el plasma y los campos de fuerza existentes definen las propiedades fundamentales del mismo, y éstos pueden ser externos o internos. El movimiento de electrones en un plasma homogéneo bajo la influencia de fuerzas externas implica el transporte de masa y la conducción de la electricidad. En un plasma heterogéneo existen gradientes de densidad y/o temperatura que causan que las colisiones provoquen la deriva de los electrones por gradientes de presión (difusión). Debido a la energía cinética asociada al movimiento térmico aleatorio de los electrones, su deriva implica el transporte de energía térmica y, por lo tanto, la conducción de calor⁴.

La materia en el universo conocido se clasifica en cuatro estados: sólido, líquido, gaseoso y plasma. La distinción básica entre los sólidos, líquidos y gases radica en la diferencia entre la fuerza de los enlaces que mantienen sus partículas constituyentes. Un plasma es básicamente, un gas ionizado que se produce cuando un gas neutro se calienta hasta que se producen colisiones interatómicas de tal intensidad, que se desprenden electrones de los átomos que chocan. Por ello, se trata de otro estado de la materia y no un simple caso particular de los gases. La interacción Coulomb de múltiples partículas, sin embargo, puede simplificarse como un número de interacciones binarias simultáneas. Las múltiples interacciones que resultan de la fuerza de Coulomb son de importancia esencial para entender el comportamiento de plasmas, y subraya la validez de la descripción de un plasma como el cuarto estado de la materia.

Los fenómenos de colisión se pueden dividir en dos categorías: elásticos e inelásticos. En las colisiones elásticas existe conservación de la masa, cantidad de movimiento y de energía, de tal manera que no hay cambios en los estados internos de las partículas involucradas y no hay ni creación ni aniquilación de partículas. En las colisiones inelásticas los estados internos de algunas o todas las partículas involucradas se cambian y las partículas pueden ser creadas, así como destruidas, pudiendo recombinarse para formar partículas neutras o formar una partícula cargada más pesada. Además, los átomos pueden excitarse e ionizarse.

La física del plasma se originó en 1927 de la mano del premio Nobel Irving Langmuir, mientras estudiaba la físico-química del filamento de tungsteno de las bombillas incandescentes²¹. Más adelante, E.V. Appleton y K.G. Budden desarrollaron la teoría de la propagación de las ondas electromagnéticas a través de plasmas magnetizados no uniformes estudiando las señales fantasmas producidas por las diferentes velocidades a las que viajan las ondas con distintas polarizaciones debido al campo magnético de la Tierra²². En 1940, el premio Nobel H. Alfvén desarrolló la teoría de la magnetohidrodinámica (MHD) en la que el plasma se trata como un fluido conductor y que ha sido empleada con éxito para el estudio de los fenómenos astrofísicos, como erupciones solares, la formación de las estrellas, etc²³. A partir de la creación de la bomba de hidrógeno en 1952, el plasma termonuclear y su confinamiento por un campo magnético ha sido tema de estudio y debate²⁴. El desarrollo de

láseres de alta potencia en la década de los sesenta del siglo pasado permitió el desarrollo del campo de la física del plasma láser²⁵.

La naturaleza de un plasma inducido por láser depende de las condiciones de operación de éste último:

- 1) su longitud de onda,
- 2) la duración del pulso y
- 3) su energía.

Igualmente, es necesario tener en cuenta las condiciones de enfoque sobre la superficie de la muestra, puesto que de ello dependerá la irradiancia (W/cm^2) involucrada en el proceso. Además, los mecanismos específicos que gobiernan la forma en que se produce la absorción de la energía en la muestra dependen de la composición de la misma y de la presión del entorno en el que se produzca la evolución del plasma²⁶.

1.- Se producirá la ablación del material si el valor de la fluencia supera el umbral de daño de dicho material. Tras formarse la pluma del plasma, su densidad puede obstruir parcial o totalmente la radiación láser incidente dependiendo de la longitud de onda y de la anchura temporal del pulso. Esto implica que no toda la energía del pulso alcanzará la superficie de la muestra. El efecto de apantallamiento del plasma depende de la longitud de onda del láser. La energía del pulso puede ser absorbida por la pluma, siendo este fenómeno tanto más acusado cuanto mayor es la longitud de onda. De esta manera, cuanto menor es la longitud de onda de la radiación láser, mayor será la tasa de ablación. Además, la energía absorbida por la muestra y por la propia pluma del plasma también dependerá de la longitud de onda del láser, lo que determinará a su vez que el mecanismo de ablación sea más o menos térmico²⁰. En un proceso térmico, los electrones absorben directamente la radiación láser y, posteriormente, la transfieren a la red atómica. Esto conlleva la fusión y vaporización del material²⁰. Si la energía del fotón incidente es superior a la energía de enlace entre los átomos del sólido, la radiación láser puede romper la red atómica sin los habituales efectos térmicos.

2.- Por otro lado, la duración del pulso resulta un parámetro clave para el proceso de ablación como consecuencia de los diferentes mecanismos de disipación de la energía que

pueden tener lugar en la muestra. De hecho, la interacción de un pulso de nanosegundos (ns) con el material se produce de forma bastante distinta a la ocasionada por un pulso de femtosegundos (fs), donde la deposición de energía se produce en un tiempo mucho menor. Así, cuando se emplea un pulso de ns, el material pasa de sólido a líquido y a vapor antes de pasar a formar parte de la pluma del plasma²⁷. Así, la energía del pulso láser es el factor que más afecta al proceso de ablación y de formación del plasma, que se encuentra íntimamente relacionado con la duración del pulso²⁸. Se puede describir en términos de irradiancia (W/cm^2) o de fluencia (J/cm^2) por unidad de tiempo. Cuando se incrementa el valor de la irradiancia, tanto la densidad electrónica (N_e) como la temperatura electrónica (T_e) de la pluma aumentan²⁹. Además, la irradiancia influye en la forma en que se expande el plasma. A altos valores de irradiancia, la pluma posee mayor energía interna y contiene más cantidad de material ablacionado. Sin embargo, a menores valores de irradiancia la energía de la pluma es menor, por lo que no es capaz de expandirse muy lejos. La Figura 1.3.1 muestra que a mayor energía (de izquierda a derecha), mayor es la capacidad de ablación.

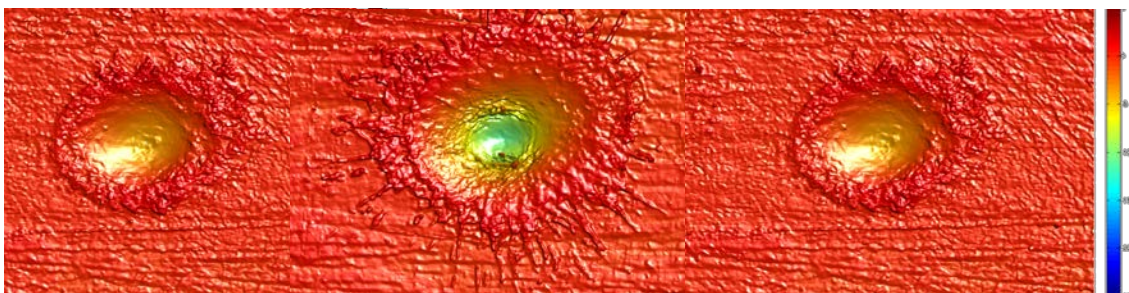


Figura 1.3.1: Capacidad de ablación al incrementar, de izquierda a derecha, la energía del pulso incidente (imagen propiedad de M^a Paz Mateo Orenes).

3.- La interacción de la pluma con un gas ambiente conduce a una expansión que implica varios procesos complejos tales como termalización, atenuación, blindaje de plasma del láser, difusión, confinamiento, deceleración de las especies eyectadas, interpenetración de los componentes presentes en el ambiente hacia el interior de la pluma, recombinación radiativa, formación de ondas de choque y aparición de agrupamientos³⁰. La importancia relativa de estos procesos en la determinación de la evolución del plasma depende de la densidad de potencia del láser, la composición de la muestra, el tamaño de las burbujas de plasma de vapor y el punto focal, la composición y la presión del gas ambiente, la longitud de onda del láser y el perfil temporal. A alta irradiancia domina el calentamiento de choque.

A largas longitudes de onda del láser, la ablación se asocia con la ionización en cascada ($h\nu + M \rightarrow e^- + M^+ \rightarrow 2e^- + 2M^+$)²⁶. El material ablacionado consta de electrones, iones, átomos, moléculas, agrupamientos y radiación dispersa. Los grupos (*clusters*) se producen debido a efectos colectivos y la formación de gotitas está relacionada con las perturbaciones hidrodinámicas y grandes fragmentos de material son expulsados debido a la relajación del estrés³⁰. Las especies, que son expulsadas de la superficie, llevan consigo una cierta energía interna y cinética. Inicialmente, las especies producidas sufren colisiones en la región de alta densidad cerca de la superficie de la muestra, que conduce a una expansión altamente direccional perpendicular a la muestra³¹. Después de la interacción del láser con el blanco, se produce una pluma de plasma de expansión isotérmica. Esta pluma absorbe la energía del haz láser y su temperatura y presión crecen. Una expansión adiabática de la pluma de plasma ocurre cuando la temperatura puede estar relacionada con las dimensiones del plasma³².

Cuando se pretende estudiar la física del plasma, es importante definir la condición de equilibrio termodinámico. Para que esta condición se cumpla, debe existir un equilibrio entre la energía cinética población de los niveles excitados y la radiación emitida. La mayoría de los plasmas sólo pueden cumplir este criterio de forma local (*LTE: Local Thermodynamic Equilibrium*). En este caso, se considera que las colisiones son más importantes que los procesos radiativos. El criterio para decidir si se trata de un LTE, consiste en que la densidad electrónica supere cierto umbral. Para calcular dicha densidad electrónica, así como la temperatura del plasma, las líneas de emisión utilizadas para el cálculo deben ser ópticamente delgadas (sin procesos de autoabsorción). Las poblaciones relativas de los niveles están descritas por la distribución de Boltzmann y las densidades relativas de especies ionizadas satisfacen la ecuación de Saha. Para cada equilibrio de ionización, considerando que los átomos y los iones se encuentran en su estado fundamental, el LTE de la reacción entre un estado de ionización i y su especie de recombinación 0 , a una temperatura T queda descrito por la siguiente ecuación:

$$\frac{n_e N_i}{N_0} = \frac{g_i g_e}{g_0} \cdot \frac{(2\pi m k_B T)^{3/2}}{h^2} \cdot e^{-\frac{I_p}{k_B T}} \quad \text{Ecuación 1.3.1}$$

1.4. Evolución temporal del plasma

La creación y evolución del plasma, suelen ser tratados por separado. Se considera que un plasma con elevada temperatura y densidad de electrones se forma primero y posteriormente se expande en el medio que le rodea. La formación del plasma ya ha sido descrita en el epígrafe anterior, por lo que ahora nos centraremos en la evolución del plasma.

Debido a la evolución en los procesos físico-químicos que tienen lugar en el plasma, su emisión varía con el tiempo. En los primeros nanosegundos se produce una emisión muy intensa de radiación continua, debido a la alta densidad electrónica, que va reduciéndose con el tiempo, dando paso a las emisiones de las transiciones entre los estados de los átomos excitados, primero de iones y luego de átomos neutros. Esta emisión perdura durante decenas de microsegundos después de la interacción pulso láser-materia. Por tanto, al comienzo de la emisión del plasma, el espectro presentaría un fondo muy alto con líneas anchas y poco distinguibles, mientras que, al avanzar en el tiempo, el continuo va desapareciendo y las líneas espectrales se hacen más nítidas y estrechas. En la Figura 1.4.1 puede verse la evolución de las líneas espectrales en función del tiempo de retraso del espectrómetro.

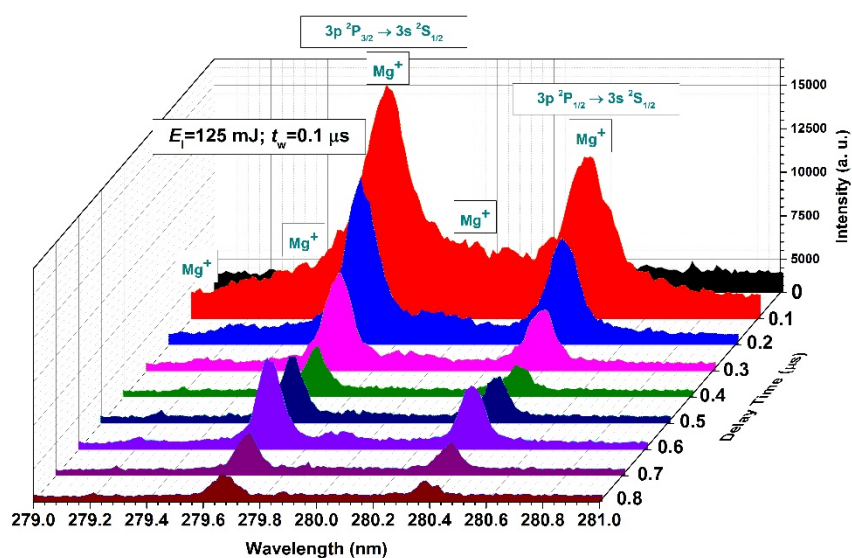


Figura 1.4.1: Evolución temporal de un espectro LIBS resuelto en tiempo para el doblete de la línea de Mg⁺ en función del tiempo de retraso para un tiempo de medida fijo de 0,1 μs, en muestras de músculo de cerdo liofilizado.

La espectroscopia de ablación láser con resolución temporal es la técnica más conocida para reducir el nivel de ruido relacionado con las emisiones continuas de fondo, que se basa en el hecho de que el continuo de fondo se desintegra más rápidamente con el tiempo que las líneas espectrales³³. En este método, los datos se adquieren con un retraso de tiempo específico después del pulso láser. Es muy importante seleccionar un tiempo de medida y un tiempo de retraso, apropiados para cada línea espectral que depende en gran medida de la longitud de onda y la intensidad del láser, así como de las propiedades físicas y químicas de las muestras.

Por tanto, para la detección con resolución temporal es imprescindible fijar el tiempo de retraso entre el pulso láser y la adquisición de la señal por parte del espectrómetro. También es importante establecer un tiempo de integración (recogida de la señal). Para la elección de dichos parámetros se buscará un compromiso entre la sensibilidad y la relación señal/ruido. En la Figura 1.4.2 puede observarse la evolución temporal de la radiación tras el pulso láser.

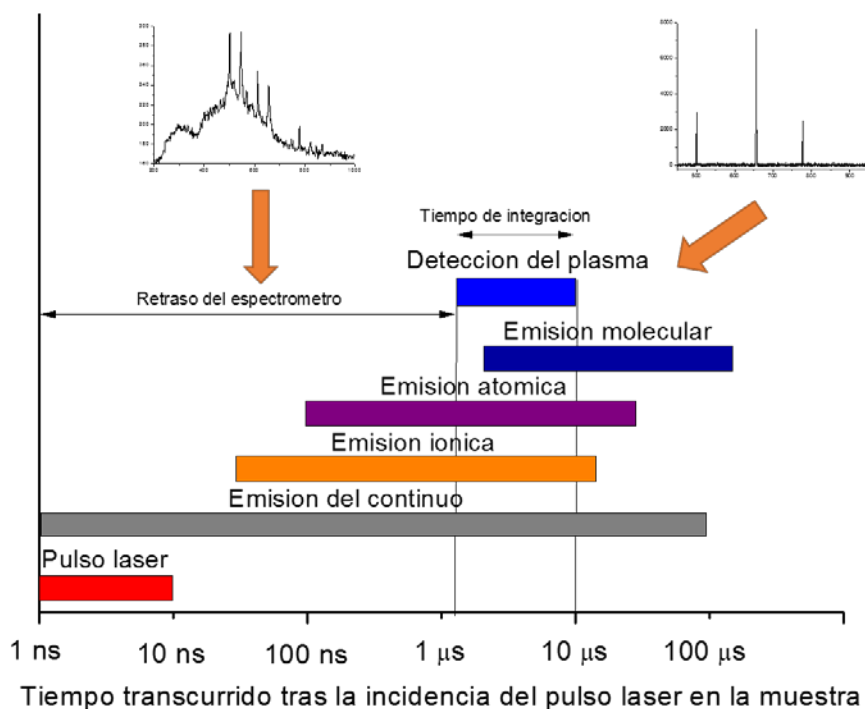


Figura 1.4.2: Evolución temporal de la radiación tras el pulso láser.

1.5. Estado del arte actual de LIBS en muestras geológicas y arqueológicas

En los últimos años, numerosas técnicas analíticas han sido utilizadas en el estudio de muestras de origen geológico y/o arqueológico con gran exactitud y precisión en los resultados. Estos métodos incluyen la espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (LA-ICP-MS)^{5,6}, la micro-espectrometría de fluorescencia de rayos X de (μ -XRF)^{7,8}, el análisis de microscopía electrónica (EPMA)⁹, la emisión de rayos X inducida por protones (PIXE)¹⁰, la espectrometría de masas de ionización secundaria (SIMS)^{11,12}, y las técnicas de microscopía de rayos X de sincrotrón^{6,13}. Algunas de estas técnicas tienen un alto rendimiento tanto en términos de resolución como de límites de detección (SIMS, μ -XRF). Otros tienen alta resolución espacial pero menor sensibilidad (EPMA), mientras que otros tienen mejores límites de detección, pero peor resolución (técnicas basadas en LA-ICP). Sin embargo, LIBS ha demostrado sobradamente sus grandes ventajas frente a estas técnicas, debido a su habilidad para analizar, de manera no invasiva, cualquier tipo de material, a su potencial para detectar tanto componentes mayoritarios como elementos traza de forma rápida y simultánea, y a su equipamiento “fácilmente” integrable en instrumentos portátiles, capaces de realizar análisis *in situ* de muestras que no pueden ser trasladadas al laboratorio³⁴. Así, por ejemplo, SEM-EDX no permite análisis *in-situ* y necesita tratamiento previo de la muestra; XRF (fluorescencia de rayos-X) falla en la detección de elementos con número atómico inferior a 23 y presenta mala resolución en profundidad, ya que hay interferencias entre distintas capas en espesores entre 10-50 micras dependiendo de la matriz; PIXE (emisión de rayos-X inducidos por partículas) requiere un acelerador de iones, lo que limita su uso a aplicaciones especializadas. Por todo ello, las ventajas inherentes a la técnica LIBS solucionan estos inconvenientes. Prueba de ello, es el elevado número de publicaciones que hacen referencia a la gran variedad de materiales de interés geológico y arqueológico que han sido estudiados por esta técnica³⁵.

El cambio climático es un gran problema medioambiental que necesita solucionarse o, al menos, ralentizar sus efectos, lo que requiere disponer de toda la información posible sobre la composición elemental de marcadores paleoclimáticos³⁶. Asimismo, LIBS es capaz

de aportar soluciones, tanto para la caracterización química de espeleotemas como para la monitorización de las cuevas de procedencia³⁷.

Del mismo modo, debe mencionarse la utilidad de LIBS para la investigación sobre material zoo-arqueológico. El descubrimiento de un nuevo yacimiento arqueológico habitualmente lleva asociada la aparición de restos óseos, resultando este tipo de material el más abundante y apreciado en arqueología, ya que es muy útil para la datación y caracterización de dichos yacimientos. Ello implica determinar los elementos trazas o minoritarios presentes en la muestra, puesto que dichos elementos suelen ser característicos de la alimentación, el metabolismo y el sistema endocrino³⁸. Como estos son distintos para cada individuo, sin mencionar además las características del medio externo donde vive, es posible el reagrupamiento de restos utilizando el contenido elemental presente en las mismas³⁹. La correcta identificación de estos restos es de gran importancia, ya que, según su reagrupamiento y distribución en el yacimiento, se puede obtener información sobre el reparto de la caza y, por tanto, sobre el comportamiento y la organización social de esos homínidos.

LIBS permite llevar a cabo microanálisis mediante el enfoque de la radiación láser, lo que posibilita realizar análisis composicionales con gran resolución lateral y en profundidad sin causar daños significativos en la muestra^{39,40}. Además, mediante el empleo de algoritmos basados en redes neuronales artificiales es posible realizar una rápida clasificación de los restos óseos procesando los datos obtenidos por esta técnica espectroscópica³⁹. Por otra parte, la obtención de perfiles en profundidad ha sido de gran utilidad para el estudio de una amplia gama de materiales de interés arqueológico, como los murales romanos en Pompeya⁴¹, el análisis de pinturas multicapa⁴² o la caracterización de artefactos metálicos⁴³.

Por todo ello, este trabajo se ha centrado en el estudio de la variabilidad climática y la estacionalidad tanto en muestras geológicas como arqueológicas mediante espectroscopía de ablación láser, ofreciendo una herramienta de vanguardia para obtener datos paleoclimáticos mediante indicadores como Mg/Ca y Sr/Ca, así como información indirecta sobre el comportamiento de los homínidos. Esta técnica tiene ventajas inherentes que hacen que estos estudios sean más fáciles y rápidos.

1.6. Introducción a la reconstrucción de series paleoclimáticas

La historia climática de la Tierra muestra una sucesión de periodos fríos y cálidos³⁶. La paleoclimatología estudia las grandes variaciones climáticas y sus causas a lo largo de la historia, observando los valores climatológicos pasados para poder predecir las posibles variaciones del clima en el futuro. Para ello se emplean multitud de registros o indicadores climáticos denominados “*proxies*”, como pueden ser perfiles de hielo, relaciones isotópicas, paleomagnetismo o las relaciones químicas Mg/Ca, Sr/Ca, etc. Éstas últimas suelen estudiarse en materiales con largos periodos de crecimiento a lo largo del tiempo, como es el caso de los espeleotemas.

Los espeleotemas son depósitos de carbonato de calcio que se forman en las cuevas a partir del agua de goteo que se filtra a través de la roca, dando lugar a multitud de formas diferentes y singulares: estalagmitas, estalactitas, coladas, banderas, etc⁴⁴. Poseen una estratigrafía interna producida por la adición sucesiva de capas, que refleja su crecimiento durante cientos o miles de años, así como los cambios geoquímicos producidos por parámetros ambientales, como la temperatura y la precipitación. Dependiendo de los factores ambientales que afecten al agua de goteo, el carbonato de calcio que forma los espeleotemas contiene cantidades variables de elementos traza. Por ello, es posible determinar la edad del material, y reconstruir cambios climáticos pasados mediante las relaciones de elementos traza en espeleotemas. Existen varias técnicas de análisis que permiten la detección de elementos traza en espeleotemas, pero en la mayoría de los casos es necesario encontrar un equilibrio entre el volumen de la muestra y la exactitud y la precisión requerida, y tener en cuenta la velocidad y el coste del procedimiento analítico^{7,12}. Las ventajas de la técnica LIBS (alta velocidad de análisis, mínima preparación de muestra y alta sensibilidad multielemental) la convierten en una herramienta capaz de producir datos geoquímicos de alta resolución en materiales heterogéneos para estudios paleoclimáticos, tal y como veremos durante el desarrollo de esta tesis.

1.7. Introducción al análisis de tejidos con fines arqueológicos

Como se comentó en el resumen de la tesis, durante su desarrollo se han realizado diversos estudios basados en la espectroscopía de ablación láser para la consecución de un

fin principal: el análisis de muestras de tejido de origen arqueológico, tanto tejido blando como óseo. Así, esta línea de investigación comenzó con el desarrollo de una metodología para el estudio de tejido blando muscular para la determinación del intervalo *post mortem*. Esto llevó a querer conocer en profundidad las características de la técnica en cuanto a dinámica del plasma, utilizando las muestras anteriores, para así optimizar los análisis de tejidos posteriores. Una vez concluido este proceso se procedió al estudio de tejido óseo, primero para estudios de estacionalidad, y después, para realizar la correcta asignación de restos óseos al individuo al que pertenecen, en una primera fase con muestras actuales y después, muestras de carácter arqueológico. Así, a continuación, se introducen los temas aquí descritos.

1º) Determinación del intervalo *post mortem* (PMI): El PMI se refiere al tiempo transcurrido desde la muerte y su estimación es extremadamente importante en las investigaciones criminales, civiles y forenses⁴⁵. La descomposición *post mortem* comienza inmediatamente después de la muerte, implicando la ruptura de los tejidos blandos debido a los procesos de autólisis y putrefacción, y a menudo con actividad de insectos⁴⁶. Un evento de muerte es seguido por una serie de reacciones químicas complicadas que siguen ocurriendo dentro de las células, y causan cambios específicos dependientes del tiempo en el metabolismo y las estructuras sub-celulares, lo que permite determinar el PMI⁴⁵. Se han empleado muchos métodos para determinar con precisión el PMI, pero la exactitud de estos métodos todavía deja una incertidumbre de tiempo alta y necesita mejoras⁴⁷. Desde el punto de vista entomológico, dado que el crecimiento y desarrollo de los insectos están fuertemente influenciados por las condiciones geográficas, topológicas y ambientales, la dificultad de contabilizar las condiciones en la escena previa al descubrimiento induce cierta incertidumbre en la aplicación, lo que dificulta la adquisición de información viable⁴⁸. Los métodos de estimación del PMI incluyen medidas de la temperatura corporal y cambios químicos *post mortem* en el cuerpo⁴⁷. Además, algunos métodos se han centrado también en la degradación de los ácidos nucleicos, incluyendo el ADN y el ARN^{45,49-51} y las proteínas dentro de diferentes tejidos^{52,53}. Sin embargo, estos métodos requieren personal especializado y laboratorios, y en algunos casos, complicados y costosos procedimientos de análisis. Además, los factores ambientales internos y externos y la causa de la muerte, afectan significativamente a la predicción del PMI, así como la variabilidad biológica individual

limitan la utilidad de la predicción del PMI. Idealmente, la concentración de los constituyentes en cualquier intervalo *post mortem* debe ser independiente de las condiciones ambientales.

Las muestras de músculo son útiles para discriminar el intervalo *post mortem* (PMI) en escenas de delito y desastres naturales o causados. En esta tesis se ha desarrollado un método simple, rápido y directo basado en la espectroscopía de ablación láser (LIBS) para la determinación del PMI, teniendo en cuenta las condiciones meteorológicas (humedad, temperatura, fauna, etc.), que tienen una fuerte influencia en la determinación del PMI. Se eligió como muestra de estudio el músculo de cerdo debido a su similitud en la composición fisiológica con tejidos musculares humanos. Se observaron cambios dependientes del tiempo en la relación de intensidad de emisión para Mg, Na, Ha y K, como resultado de las variaciones en su concentración debido a reacciones químicas en tejidos y se correlacionaron con PMI. Esta relación ofrece un medio simple y potencialmente valioso para estimar el PMI.

2º) Estudio de la dinámica del plasma: Actualmente, los plasmas producidos por láser son un tema de gran interés en áreas fundamentales y aplicadas de la investigación científica⁵⁴⁻⁵⁸. Tienen una naturaleza transitoria, con parámetros característicos que evolucionan rápidamente en el espacio y el tiempo^{59,60}. Los estudios de caracterización de plasmas son esenciales para la comprensión de diversos procesos en física de plasma fundamental⁶¹. La interacción de un plasma con el gas ambiente conduce a una expansión que implica varios procesos complejos tales como termalización, atenuación, deceleración, blindaje del plasma láser, difusión, recombinación de electrones, confinamiento, agrupamiento y formación de ondas de choque⁶²⁻⁶⁴. Durante el desarrollo de esta tesis se han estudiado los espectros de emisión, la densidad electrónica y la temperatura del plasma láser en tejido de músculo porcino, además de realizar estudios espacio-temporales. Por otra parte, se utilizó la técnica SEM para el estudio de la morfología de la muestra y de los cráteres producidos por la ablación y la espectroscopía EDX para realizar un microanálisis químico cuantitativo.

3º) Estudios de Estacionalidad: En cuanto al tejido óseo, los estudios de estacionalidad aplicados al análisis de emplazamientos arqueológicos se centran en responder a cuestiones relativas al momento del año en el que se ocupó un yacimiento³⁵. Para ello, las

técnicas de estudio de la estacionalidad han sido divididas en dos bloques: métodos indirectos (como el análisis químico del suelo o la etología de los herbívoros) y métodos directos (como el análisis de restos de fauna)^{65,66}. Sin embargo, todas estas técnicas presentan limitaciones, ya sea por límites de edad o sexo. Además, los resultados presentan una gran amplitud estacional. Por tanto, aunque los estudios de estacionalidad se han desarrollado durante mucho tiempo, ninguno de ellos ha demostrado ser lo suficientemente resolutivo. Por tanto, se plantea una nueva metodología que permita paliar las deficiencias de las técnicas tradicionalmente utilizadas, con el objeto de poder responder a la pregunta de cuando se ocuparon los yacimientos arqueológicos con una resolución óptima.

4º) Identificación de restos óseos: Por último, los restos típicos que pueden encontrarse en un yacimiento arqueológico son utensilios, cerámica, huesos de animales o seres humanos de épocas prehistóricas, entre otros. Aunque las diferencias en la composición elemental de las muestras de tejido óseo entre individuos son despreciables³⁹, algunos elementos traza pueden estar relacionados con la dieta y el entorno³⁸, pudiendo proporcionar variaciones en los espectros LIBS. La correcta identificación de los restos es importante porque permite obtener un registro muy detallado de la actividad de un asentamiento prehistórico, y, por tanto, del comportamiento de nuestros ancestros. Pero en ocasiones es extremadamente difícil, por lo que sólo puede establecerse el número mínimo de individuos (NMI)⁶⁷⁻⁷³, mediante la aplicación de técnicas tafonómicas, que son las únicas que permiten proponer explicaciones e interpretaciones sobre el registro óseo-vegetal. En el caso de huesos arqueológicos, muchas veces es inviable el análisis del ADN, debido a la mineralización de las muestras o la degradación del material. La posibilidad de combinar LIBS con métodos quimiométricos como las redes neuronales artificiales (NN) permite extraer información significativa para clasificar diferentes muestras^{39,74}. La metodología LIBS y NN puede resultar muy útil para la agrupación de restos arqueológicos y así establecer con mayor precisión el número de individuos recogidos en un yacimiento. La composición elemental de los huesos arqueológicos provee suficiente información para conseguir una correcta discriminación y agrupamiento de los diferentes restos arqueológicos, permitiendo paliar la limitación de los análisis paleoantropológicos, antropológicos, zooarqueológicos y paleontológicos, que solo pueden agrupar los diferentes restos óseos al individuo correspondiente cuando éstos están en conexión anatómica.

Capítulo 2: Análisis mediante LIBS

La técnica LIBS, al ser sensible y específica, es aplicable tanto al análisis cualitativo como cuantitativo. En este capítulo se revisan las características analíticas de la técnica LIBS para análisis cualitativo y cuantitativo. Mediante la “huella digital” característica de la muestra que nos proporciona la técnica LIBS y los algoritmos matemáticos necesarios, puede realizarse un análisis cualitativo (clasificación). Por otro lado, mediante el correspondiente calibrado, LIBS también nos proporciona información de tipo cuantitativo multielemental. La viabilidad de la técnica LIBS para el análisis micro-espacial cualitativo y cuantitativo de diferentes muestras (sólidos, líquidos y gases) ha sido descrita ampliamente en la literatura⁷⁵.

Debido a las características de la técnica LIBS, casi todos los materiales pueden ser analizados, siendo las propiedades intrínsecas del material, como la conductividad, la reflectividad, la densidad, el calor específico o el punto de ebullición, las que pueden tener una gran influencia sobre los resultados de su análisis. La reflectividad, por ejemplo, determina la cantidad de energía láser que puede ser absorbida por la superficie de la muestra, lo que afecta considerablemente a la velocidad de ablación de dicho material.

La luz emitida por el plasma inducido por láser permite obtener información cualitativa y/ cuantitativa acerca de las especies elementales presentes en la muestra mediante un análisis espectroscópico. La naturaleza macroscópica de la superficie de la muestra también es importante, ya que puede afectar al resultado del análisis cualitativo o cuantitativo. La fragilidad de la superficie puede causar daños en una superficie más extensa que la zona irradiada por el láser. Esto se debe a que la onda de choque de presión que acompaña a la ablación puede conducir al desprendimiento de partes mal adheridas de la superficie alrededor del punto analizado. La contaminación de la muestra puede afectar al análisis, pues es allí donde se produce la interacción con el pulso láser. Para limpiar la superficie, tan sólo deben aplicarse unos pocos pulsos láser sobre el punto de análisis.

Además, otras técnicas multielementales requieren de sofisticados sistemas de vacío, lo que mejora la precisión y la sensibilidad, pero complica el análisis y eleva el precio del mismo. Sin embargo, la técnica LIBS a presión atmosférica presenta una gran ventaja a la hora de realizar medidas en tiempo real e *in situ*.

2.1 Análisis cuantitativo

El análisis cuantitativo es el conjunto de procedimientos necesarios para determinar la cantidad relativa de un componente que hay en una muestra. Todos los elementos de la tabla periódica emiten luz cuando son excitados convenientemente, por lo que la técnica LIBS puede, potencialmente, determinar la composición elemental de cualquier muestra. La matriz influye enormemente en la formación del plasma, modificando sus características (temperatura, densidad de electrónica, etc.), lo que hace difícil relacionar directamente la intensidad con la concentración, especialmente cuando se trabaja con concentraciones próximas al límite de cuantificación de la técnica, ya que la presencia de un elemento afecta a la emisión característica de otro elemento. El efecto matriz es común a otras técnicas analíticas⁷⁶. Sin embargo, aún no se han realizado un trabajo metódico para caracterizar el efecto matriz para todo tipo de muestras y desarrollar así métodos para corregir sus efectos y aumentar la capacidad cuantitativa de LIBS.

En un análisis LIBS cuantitativo, la composición elemental del plasma es equivalente a la del material ablacionado por el pulso láser si la ablación es estequiométrica, y la determinación de las cantidades presentes de los distintos elementos se basa en la medida del área debajo de la línea espectral, que es proporcional a la cantidad del componente (Ecuación 2.1.1). Los ensanchamientos Doppler, Stark etc., pueden tener influencia sobre el ensanchamiento de la línea espectral. Cuando ese ensanchamiento es despreciable, la intensidad puede medirse como la altura de la línea, y esa intensidad es directamente proporcional al número de especies presentes en el plasma que emiten a esa longitud de onda, es decir, a la concentración⁷⁷.

$$I = \frac{hcA_{ki}g_kN}{4\pi\lambda_iZ} \cdot e^{-\left(\frac{E_k}{kT}\right)} \quad \text{Ecuación 2.1.1}$$

donde I es la intensidad, h es la constante de Plank, λ_i es la longitud de onda, A_{ki} es la probabilidad de transición, g_k es la degeneración del nivel superior, E_k es el nivel de energía excitado, T es la temperatura, k_B es la constante de Boltzmann y N es la cantidad de átomos en cada nivel energético.

Por ello, es posible realizar un análisis cuantitativo si se realiza una curva de calibrado. Para un resultado lo más exacto posible, la similitud entre la matriz de los patrones y la matriz de la muestra debe ser alta. Sin embargo, la necesidad de emplear patrones de referencia certificados encarece y dificulta el análisis. Sin embargo, existe un modelo de análisis cuantitativo que no requiere el uso de patrones de referencia ni construir curvas de calibrado: Calibration-Free LIBS (CF-LIBS)⁷⁸.

Como acaba de comentarse, el análisis cuantitativo puede realizarse de diferentes formas, siendo mediante una curva de calibración para los analitos seleccionados la más sencilla y directa, y por lo general, la más utilizada. Para generarla se representa la señal de intensidad de un conjunto de patrones de concentración conocida y composición igual o similar a la matriz de nuestra muestra problema, frente a dicha concentración. Para minimizar el efecto matriz se puede normalizar con un patrón interno, bien sea utilizando la relación entre dos líneas presentes en la muestra⁷⁹, una línea de la muestra y la señal de un elemento añadido externamente⁸⁰, o incluso entre la línea de interés y el ruido de fondo⁸¹.

También es posible obtener la concentración de un elemento en una muestra usando los parámetros del plasma, mediante “Calibration Free - LIBS”⁷⁸. En este método no es necesario el uso de curvas de calibración, ya que la concentración puede ser determinada a través de parámetros físicos del plasma, como su temperatura y densidad electrónica. La mayor ventaja que presenta es que permite la determinación de la concentración con solo una muestra.

2.1.1 Calibración con patrón interno

Además de la concentración, la intensidad de emisión de los elementos presentes en el plasma depende de varios factores. Por ello, es necesario emplear un patrón interno que compense las variables experimentales. Un patrón interno es una cantidad conocida de un

compuesto, diferente del analito, que se añade a la muestra o está presente en ella de forma mayoritaria. Esta última forma de emplear la calibración con patrón interno es la que se sigue en el capítulo 5 de esta tesis, donde se desea obtener variaciones en la concentración de un elemento traza cuya concentración es minoritaria en distintas regiones de la muestra y se tiene como referencia un elemento mayoritario y de concentración constante, y es la que se describirá con más detalle a continuación. De esta manera, se compara la intensidad de las líneas del patrón con las del analito.

El funcionamiento de este tipo de calibración es sencillo: la señal del analito se compara con las del patrón interno, y de ese modo se determina el analito⁸². Suele emplearse cuando la cantidad de muestra analizada o la respuesta del instrumento varían debido, por ejemplo, al efecto matriz. Para realizar la relación de intensidades ha de tenerse en cuenta lo siguiente: las líneas deben pertenecer al mismo tránsito electrónico, deben tener una alta relación señal/ruido y se deben evitar las líneas de resonancia y las interferentes⁸³.

No se obtiene la concentración absoluta del elemento, sino una concentración relativa de dicho elemento frente a una referencia. La ventaja principal de este método es que cualquier parámetro experimental que pudiera estar influyendo en el resultado, queda compensado al realizarse un cociente de intensidades, eliminando posibles variaciones de intensidad de la fuente de excitación. Además, se elimina la necesidad de utilizar materiales de referencia. Como desventaja puede mencionarse que, para minimizar la heterogeneidad del material y el efecto matriz, se requiere realizar un promedio de varios pulsos láser para la obtención de cada espectro, lo que puede no ser posible en todos los casos, especialmente con muestras valiosas o frágiles.

2.1.2. Calibración basada en parámetros físicos del plasma (Calibration Free-LIBS)

El método CF-LIBS es un método adecuado para la determinación cuantitativa precisa y exacta de la concentración de un elemento en la muestra usando los parámetros del plasma, con el fin de evitar la utilización de curvas de calibrado, la necesidad de muestras de referencia y patrones internos, y compensar el efecto matriz. Puede ser aplicado a la cuantificación de una amplia gama de elementos en cualquier estado (sólidos, líquidos y gases). Además, proporciona una reducción del tiempo de análisis cuantitativo de numerosos

elementos ya que elimina la realización de curvas de calibrado para cada elemento por separado, lo que complicaría el análisis, debido a la alta variabilidad de materiales y composiciones elementales. El método se basa en la suposición de que la ablación es estequiométrica, existe un equilibrio térmico local (LTE) y, en su formulación inicial, el plasma es ópticamente delgado⁸⁴. Se basa en el cálculo de la temperatura y de la densidad electrónica del plasma.

Ablación estequiométrica

En LIBS, el impacto del pulso láser sobre la superficie de la muestra produce la ablación del material (siempre que se supere el límite de energía necesario para producir la sublimación, evaporación y extracción de partículas de la superficie), formando un plasma luminoso transitorio a muy alta temperatura ($>10^3$ K).

Para realizar una CF-LIBS, es necesario que la ablación sea estequiométrica, lo que implica que la composición de la masa ablacionada por el láser es representativa (tiene la misma proporción) de la composición de la muestra, reduciéndose a medida que la profundidad del cráter aumenta.

Es posible producir una ablación estequiométrica realizando una buena selección de los parámetros experimentales como la fluencia, longitud de onda del láser y/o el tiempo de duración del pulso.

Equilibrio termodinámico local (LTE)

Se trata de una aproximación que considera que el volumen del plasma es tan pequeño, que tiene un tiempo de relajación tras la pérdida del equilibrio muy corto, por lo que podemos asumir que la relajación es instantánea y el subsistema se encuentra en todo momento en equilibrio termodinámico con su entorno. La radiación emitida por el plasma está determinada por los valores locales de la temperatura y la densidad, debido a que el LTE requiere una fuerte interacción láser-materia y cierto aislamiento de regiones a distinta temperatura⁸⁵. Una mayor densidad disminuye los recorridos libres medios de las partículas y, por tanto, incrementa la proporción de reacciones.

El plasma está compuesto por diferentes tipos de partículas, tanto en estados fundamentales como excitados. Por tanto, no existe una temperatura única del plasma, pudiéndose definir hasta cuatro:

- Temperatura electrónica: tan sólo considera la energía cinética de los electrones entre colisiones, de acuerdo con la ley de distribución de Maxwell-Boltzmann.
- Temperatura de excitación: es la energía interna de las partículas del plasma que da lugar a estados más excitados, de acuerdo con la ley de Boltzmann.
- Temperatura de ionización: distribución de un elemento en su primer estado de ionización, según la ley de Saha.
- Temperatura de radiación: temperatura que, según la ley de Plank, se puede asociar a la intensidad de las líneas de emisión detectadas.

Al estar en constante expansión, el plasma producido por LIBS nunca podrá alcanzar el LTE⁸⁶. Sin embargo, el tiempo de emisión de las especies presentes en el mismo y la duración del pulso láser son más pequeñas que el tiempo de vida del plasma, por lo que, asumiendo condiciones de equilibrio termodinámico local, la temperatura es la misma para todas las especies presentes en el plasma. Así, la emisión predominante al comienzo de su vida es la producida por las colisiones electrónicas, lo que permite establecer una temperatura característica, que satisface las leyes de Maxwell, Boltzmann y Saha:

- Ecuación de Boltzmann: la población de un nivel excitado está relacionado con la densidad total mediante la siguiente ecuación:

$$I = \frac{hc}{4\pi\lambda} N(T) \frac{A_{ki}g_k}{U(T)} e^{-E_k/kT} \quad \text{Ecuación 2.1.2.1}$$

donde λ es la longitud de onda, A_{ki} es la probabilidad de transición, g_k es la degeneración del nivel superior, E_k es el nivel de energía excitado, T es la temperatura (en LTE se supone que $T_{\text{electrónica}} \approx T_{\text{ionización}} \approx T_{\text{plasma}}$), k es la constante de Boltzmann y $U(T)$ es la función de partición.

Así, es posible obtener la temperatura del plasma a través de la intensidad relativa de dos líneas del mismo elemento en el mismo estado de ionización⁸⁷.

$$\ln \frac{y_2}{y_1} = -\frac{1}{kT} (E_2 - E_1) \quad \text{Ecuación 2.1.2.2}$$

Un procedimiento similar se aplica al cálculo de la temperatura para bandas moleculares:

$$\ln \left(\frac{I_{v'-v''} \lambda_{v'-v''}^4}{q_{v'-v''}} \right) = A - \frac{G(v') hc}{k_B T_{vib}} \quad \text{Ecuación 2.1.2.3}$$

donde A es una constante, $\lambda_{v'-v''}$ es la longitud de onda de emisión correspondiente a la cabeza de banda, $q_{v'-v''} = \left| \int_0^\infty \psi_{v'}(R) \psi_{v''}(R) dR \right|^2$ es el factor de Franck-Condon y $\frac{G(v') hc}{k_B}$ es la energía vibracional normalizada del estado superior vibracional (v'), k_B es la constante de Boltzmann, h es la constante de Planck y c la velocidad de la luz. La Figura 2.1.2.1 muestra un ejemplo del cálculo de la temperatura del plasma para la banda molecular de CN.

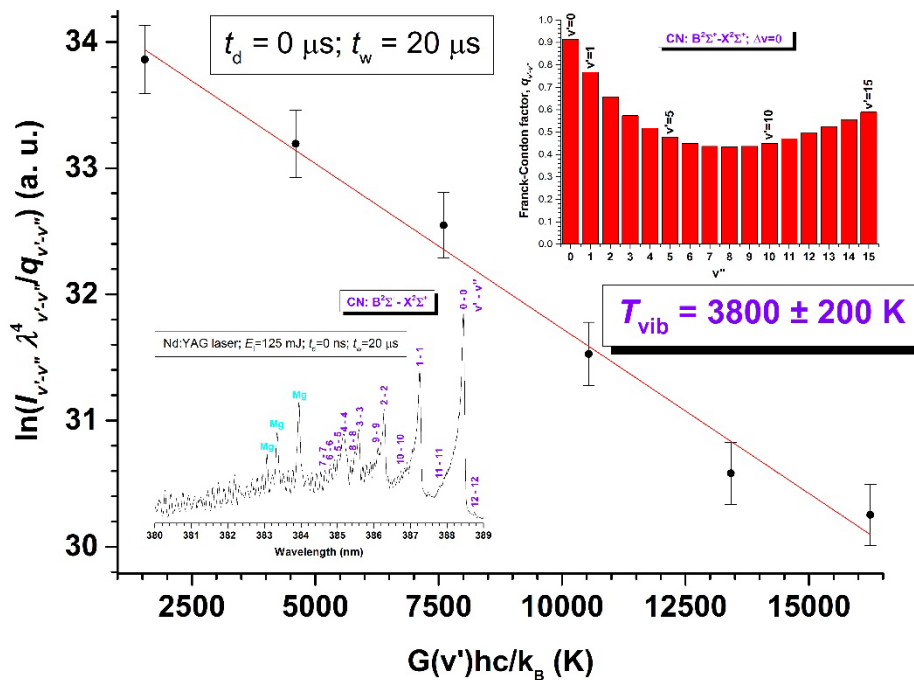


Fig. 2.1.2.1: Ajuste lineal de Boltzmann para la banda CN B-X ($\Delta v = 0$).

Para determinar la temperatura del plasma con una mayor exactitud se utiliza un mayor número de líneas de emisión. Reformulando la primera ecuación obtenemos:

$$\ln \frac{I\lambda}{A_{ki}g_k} = -\frac{1}{kT} E_k + \ln \frac{CF}{U(T)} \quad \text{Ecuación 2.1.2.4}$$

donde F es un factor experimental y C es la concentración del elemento.

Representando $y = \ln \frac{I\lambda}{g_k A_{ki}}$ frente a $x = E_k$, se produce un conjunto de líneas rectas paralelas (una para cada especie; diferentes estados de ionización...) cuya ordenada en el origen coincide con la concentración del elemento, y la pendiente es inversamente proporcional a la temperatura del plasma. El uso de una mayor cantidad de líneas espectrales procura unos resultados más precisos⁸⁸.

- Ecuación de Saha-Boltzmann: incluye el análisis de líneas de un elemento en diferentes estados de ionización⁷⁷.

$$\ln \frac{y_2}{y_1} = -\frac{1}{kT} (E_2 - E_1 + E_\infty - \Delta E_\infty) + \ln \left[2 \frac{(2\pi m k)^{3/2} T^{3/2}}{h^3 N_e} \right] \quad \text{Ecuación 2.1.2.5}$$

Se obtiene una representación similar a la obtenida por la ecuación de Boltzmann representando en la misma gráfica las especies neutra e iónica para un mismo elemento. Sin embargo, en este caso la temperatura se obtiene mediante un proceso iterativo hasta alcanzar la estabilidad en la pendiente.

En cuanto a la densidad electrónica, el plasma requiere alcanzar cierto valor mínimo para que sean las colisiones electrónicas y no los procesos radiativos los que provoquen que los átomos pasen a estados excitados (criterio de McWhirter)⁸⁹.

$$N_e \geq 1.6 \cdot 10^{12} T^{1/2} (\Delta E)^3 \text{cm}^{-3} \quad \text{Ecuación 2.1.2.6}$$

siendo T la temperatura y ΔE la diferencia de energía entre los niveles de la transición. Esto es una condición necesaria, pero no suficiente, para que exista LTE, y suele alcanzarse

durante las primeras etapas de vida del plasma. Para asegurar que se obtiene el LTE, se aplican además dos criterios adicionales:

- Comparar las temperaturas obtenidas por las ecuaciones de Boltzmann y Saha-Boltzmann.
- Comparar la distribución de Boltzmann teórica frente a la obtenida experimentalmente.

Existen tres procedimientos para calcular la densidad electrónica:

1.- El ensanchamiento de líneas Stark (STB)⁹⁰: ensanchamiento inducido por colisiones, resultado de la deformación de los átomos o moléculas cuando rebotan entre sí, lo que perturba sus niveles de energía y hace que las frecuencias de las líneas de emisión o absorción cambien ligeramente, produciendo el ensanchamiento. El ensanchamiento de líneas Stark ($\Delta\lambda_{FWHM}$) se puede calcular mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta\lambda_{FWHM} = \Delta\lambda_{observada} - \Delta\lambda_{instrumental} \quad \text{Ecuación 2.1.2.7}$$

La densidad electrónica (n_e) en cm^{-3} de la línea H_α de Balmer para el hidrógeno está relacionada con el ensanchamiento Stark $\Delta\lambda_{FWHM}^S$ en \AA mediante la siguiente ecuación⁹¹:

$$n_e = 8.02 \times 10^{12} \left(\frac{\Delta\lambda_{FWHM}^S}{\alpha_{1/2}} \right)^{3/2} \quad \text{Ecuación 2.1.2.8}$$

donde $\alpha_{1/2}$ es la anchura fraccionada Stark en \AA , que depende de la temperatura de excitación y la densidad electrónica. Para átomos polielectrónicos o iones, la FWHM de una línea con ensanchamiento Stark está relacionada con la densidad electrónica en cm^{-3} por la siguiente expresión⁷⁷:

$$\Delta\lambda_{FWHM}^S = 2W \left(\frac{n_e}{n_{ref}} \right) \quad \text{Ecuación 2.1.2.9}$$

donde W es el factor de impacto electrónico en \AA , que también es dependiente de la temperatura de excitación. Normalmente, el valor de referencia para la densidad electrónica

en átomos es 10^{16} cm^{-3} y para iones 10^{17} cm^{-3} . ⁸⁷La Figura 2.1.2.2 muestra un ejemplo del cálculo de la densidad electrónica para dos líneas, H α y O (polielectrónico).

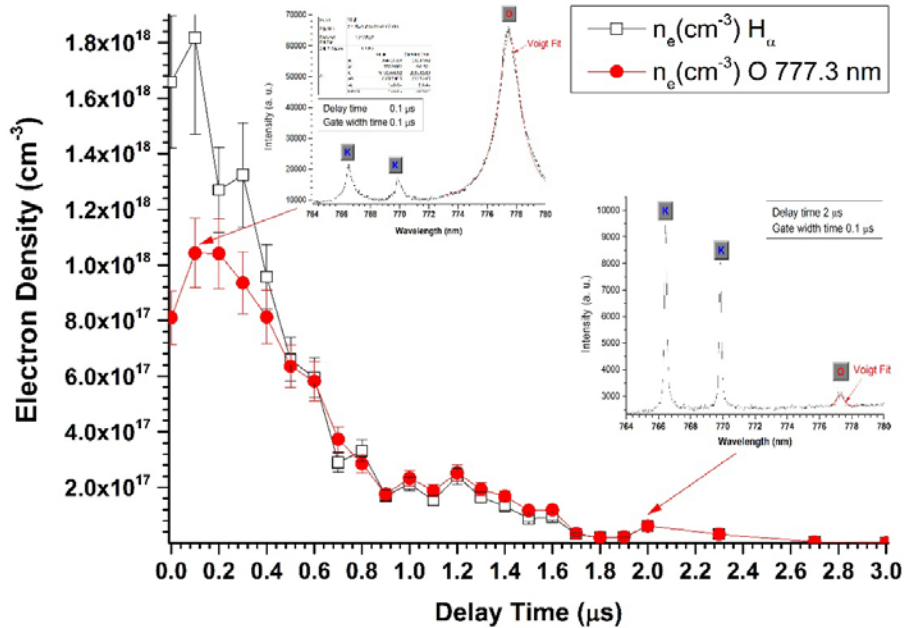


Fig. 2.1.2.2: Densidad electrónica calculada mediante el ensanchamiento Stark para dos líneas, H α y O, en función del tiempo de retraso.

Como puede observarse en la Figura 2.1.2.2, la elevada densidad de energía a tiempo 0 μs es suficiente para vaporizar el material, formando un plasma, que contiene la información analítica de los elementos presentes en la muestra. Tras formarse la pluma del plasma, su alta densidad electrónica puede obstruir parcial o totalmente (*plasma shielding*) la radiación láser incidente, por lo que no toda la energía del pulso alcanzará la superficie de la muestra. Este efecto produce espectros donde se observa un elevado fondo correspondiente al continuo de emisión, además de aumentar la anchura de las líneas de emisión debido a la auto-absorción ocasionada por la alta densidad del plasma.

2.- El desplazamiento Stark (STS)⁹²

3.- El desplazamiento calculado en la ecuación de Saha-Boltzmann (SBE)⁹³

Plasma ópticamente delgado

Para poder aplicar CF-LIBS, las medidas deben realizarse bajo equilibrio termodinámico local (LTE) y tener un plasma ópticamente fino, es decir, que no esté afectado por autoabsorción⁹⁴. En el tiempo transcurrido entre la emisión y la detección de un fotón cualquiera, éste puede ser reabsorbido por otros átomos o iones presentes en el plasma. La autoabsorción es muy frecuente cuando se consideran tránsitos que involucran al estado fundamental, particularmente cuando la concentración del elemento es elevada.

Para evitar la autoabsorción se puede⁹⁵:

- Evitar el uso de líneas que involucren el estado fundamental.
- Evitar el uso de líneas con intensidades muy altas, debido a que pueden sobreestimar la población real del elemento.

El plasma es ópticamente delgado cuando la mayoría de los fotones se pueden detectar directamente. Así, el método CF-LIBS puede aplicarse al análisis cuantitativo de los componentes directamente del punto de impacto láser. Además de estas consideraciones, también es importante controlar la homogeneidad de la muestra. El plasma es un sistema dinámico en constante evolución e interacción con el medio, produciéndose diferencias entre las zonas externas del plasma, más frías y en contacto directo con la atmósfera que lo rodea y la zona interna del plasma, más caliente y menos afectada por los alrededores. Por tanto, podemos asumir un comportamiento homogéneo considerando el núcleo del plasma.

El método CF-LIBS requiere la medición de al menos dos líneas de emisión de la misma especie, con el fin de calcular la temperatura de los electrones del plasma, así como al menos una línea para cada elemento en el plasma, con los parámetros espectroscópicos conocidos. Estos datos son utilizados para construir una gráfica de Boltzmann. Como LIBS generalmente es capaz de detectar la mayoría de los elementos con una sensibilidad de ppm, las mediciones CF-LIBS pueden alcanzar, teóricamente, una precisión muy alta. Sin embargo, debe tenerse en cuenta la poca reproducibilidad de la técnica (3% -5%), y que los valores de probabilidad de transición son a menudo desconocidos. La excitación multi-pulsos puede ser una alternativa para mejorar la sensibilidad de la técnica, ya que proporciona un claro aumento de la señal obtenida, líneas de emisión más estrechas y un menor *background*.

2.2 Análisis cualitativo: clasificación de muestras

El análisis cualitativo se define como el conjunto de procedimientos que buscan identificar el tipo de componentes presentes en una muestra, pero sin determinar cantidades. Un análisis cualitativo, por lo tanto, está orientado a la identificación de una muestra desconocida, revelar cuáles son sus características, determinar la ausencia o presencia de un elemento dado (screening) y/o a clasificar una muestra desconocida entre dos a más clases.

Los métodos de *screening* (cribado) son sistemas de medida rápidos, que determinan la presencia o no de cierto analito en una muestra si se supera cierto nivel, establecido por las características del sistema experimental utilizado. El procedimiento para realizar un análisis cuantitativo mediante LIBS, es similar al empleado en otras técnicas de espectroscopía de emisión. En general, se usa la intensidad de una o varias líneas presentes en el espectro. Sin embargo, que no se detecte el analito no implica que la muestra esté libre de tal elemento, sino que puede encontrarse por debajo del límite de detección de la técnica. Además, pueden existir interferencias espectrales que permitan una identificación errónea. Por ello, es deseable contar con un sistema experimental capaz de lograr una alta sensibilidad y resolución.

Definir exactamente la longitud de onda de las distintas líneas observadas es la mayor dificultad en el análisis cualitativo. La identificación de la composición elemental de una muestra basándose en sus líneas de emisión se realiza mediante bases de datos, siendo la más común la *National Institute of Standard and Technology* (NIST)⁹⁶. Además de incluir información sobre la posición de las líneas de emisión, incluyen información sobre intensidades relativas y constantes espectroscópicas (coeficientes de emisión, niveles energéticos del tránsito y degeneración, etc).

Un espectro LIBS es como una “huella dactilar”⁹⁷, por lo que a través de modelos quimiométricos es posible la clasificación de las muestras. En el capítulo 3 se detallarán brevemente los modelos quimiométricos más comunes. Para clasificar las muestras, se puede utilizar el espectro LIBS completo⁹⁷ o un conjunto de líneas espectrales de interés, dependiendo de la aplicación y del objetivo del análisis, así como del método de clasificación utilizado.

Por otra parte, cuando se pretende caracterizar una muestra totalmente desconocida, se puede estimar su composición analizando agrupaciones espectrales características de líneas de ciertos elementos (dobletes, tripletes o multipletes). Para asegurar la presencia de un elemento es necesario identificar el mayor número de líneas posible con certeza.

También puede realizarse un seguimiento de la evolución de un elemento a lo largo de un proceso, como el recubrimiento por deposición. El análisis del grosor del material depositado suele llevarse a cabo a nivel industrial, lo que permite reducir los desperdicios, aumentando así los beneficios.

Cuando se realiza un análisis cualitativo es necesario evaluar el éxito de la clasificación. Para ello, pueden estudiarse varios factores:

- Correlación espectral
- Tasa de no clasificados
- Sensibilidad
- Especificidad
- Exactitud
- Capacidad de generalización
- Robustez.

La **correlación espectral** es el porcentaje de muestras correctamente clasificadas sobre el total. Para obtener un modelo de clasificación apropiado, tanto la tasa de clasificación incorrecta y la **tasa de no clasificados**, han de ser lo más bajas posible.

Para definir la **sensibilidad** y la **especificidad** es necesaria la matriz de confusión (Tabla 2.2.1).

Tabla 2.2.1. Matriz de confusión

		<i>Resultado real</i>	
		Positivo	Negativo
<i>Resultado LIBS</i>	Positivo	Verdadero Positivo (TP)	Falso Positivo (FP)
	Negativo	Falso Negativo (FN)	Verdadero Negativo (TN)

Como puede observarse en la Tabla 2.2.1, cuando ambos resultados son positivos, se obtiene un verdadero positivo (TP), y cuando ambos son negativos se obtiene un verdadero negativo (TN). Además, cuando el resultado LIBS es positivo pero el valor real es negativo se obtiene un falso positivo (FP) y si el resultado LIBS es negativo pero el real es positivo se obtiene un falso negativo (FN). Así, la sensibilidad (S) es la probabilidad de que el resultado sea positivo y verdaderamente lo sea, mientras que la especificidad (SP) es el término contrario, la probabilidad de que el resultado sea negativo y efectivamente lo sea⁹⁷:

$$S = \frac{TP}{TP+FN} \qquad SP = \frac{TN}{TN+FP} \qquad \text{Ecuaciones 2.2.1 y 2.2.2}$$

Un valor de S=1 implica que todas las muestras han sido correctamente clasificadas, ya que, al ser probabilidades, “S+FN=1” y “SP+FP=1”.

Además de estos parámetros, la **exactitud** (A) es:

$$A = \frac{TP+TN}{TP+TN+FP+FN} \qquad \text{Ecuación 2.1.2.3}$$

Un método de clasificación apropiado debe ser capaz de realizar satisfactoriamente estos tres test:

- **Sensibilidad:** clasificar correctamente todas las muestras incluidas en el entrenamiento.
- **Generalización:** clasificar correctamente muestras desconocidas de la misma clase no incluidas en el entrenamiento del modelo⁹⁸.
- **Robustez:** evaluar cómo se comporta el modelo cuando se introduce una muestra ajena al mismo. Idealmente, cualquier muestra no perteneciente a ninguna clase incluida en el entrenamiento debe ser clasificada como desconocida. Para ello, se elimina completamente una clase del conjunto de entrenamiento, y se estudia el comportamiento del modelo frente a dicha clase.

Para realizar la identificación de un material desconocido mediante LIBS a partir de su espectro de emisión, éste debe ser adquirido con un instrumento que brinde un amplio rango espectral y con la mejor resolución posible. La resolución de un instrumento de análisis

viene dada por la diferencia entre las longitudes de onda ($\Delta\lambda$) de dos líneas espectrales contiguas, y viene expresada por $\lambda/\Delta\lambda$.

Como ya se ha mencionado antes, el proceso de detección en la técnica LIBS es común a muchas otras técnicas basadas en la emisión atómica. Sin embargo, la detección resuelta en tiempo puede aumentar la sensibilidad debido a la alta temperatura electrónica del plasma láser. Durante la interacción láser-muestra, tanto la densidad electrónica como la temperatura del plasma son particularmente elevadas ($10^{17} - 10^{20} \text{ cm}^{-3}$ y $\approx 20\,000 \text{ K}$), por lo que el espectro está caracterizado por una emisión continua debida a las interacciones ión-electrón (recombinación y bremsstrahlung), y las líneas atómicas e iónicas están superpuestas. Por ello, es particularmente difícil detectar líneas de emisiones débiles de elementos menores y trazas (ppm). Para conseguirlo, se puede eliminar la luz blanca intensa que se manifiesta en los primeros instantes graduando el intervalo, y acotándolo a la zona donde se perciban mejor las emisiones atómicas. De esta manera, los parámetros más importantes para la detección resuelta en tiempo son el tiempo entre la formación del plasma y el comienzo de la observación de su luz por la ventana del detector, y el período de tiempo sobre el cual la luz es registrada por el detector (tiempo de integración de la señal). Estos parámetros temporales son altamente dependientes tanto del elemento como de la matriz, por lo que deben ser optimizados para cada muestra.

Aunque la mayoría de las investigaciones con LIBS son cualitativas, sobre la distribución espacial de las especies, la técnica también tiene la capacidad de producir información cuantitativa de manera confiable. Sus principales ventajas residen en la facilidad, la rapidez y la exactitud con que se puede realizar el análisis cualitativo de una extensa variedad de sustancias.

Capítulo 3: Métodos quimiométricos

3.1 Introducción a la quimiometría

La quimiometría es la disciplina química que aplica métodos matemáticos o estadísticos para el análisis y procesamiento de datos químicos. Existen métodos para el diseño experimental, el análisis cuantitativo, la optimización de datos, el procesamiento de las señales, el reconocimiento de patrones o el modelado⁹⁹. Aunque ya se habían introducido ciertos parámetros estadísticos, como la t de Student o la distribución z de Fisher, no fue hasta finales de la década de los sesenta cuando Kowalsky y sus colaboradores publicaron un trabajo sobre el entrenamiento de máquinas para el reconocimiento de pautas y en 1972 los mismos autores acuñaron el término quimiometría¹⁰⁰. Con el desarrollo de ordenadores más potentes y sobre todo gracias al algoritmo NIPALS¹⁰¹, se desarrollaron los primeros modelos quimiométricos: el análisis de componentes principales (PCA) y el modelado suave independiente de analogía de clases (SIMCA). Actualmente, se trata de una metodología arraigada en numerosos campos³⁹: química, ingeniería, medicina, ciencias forenses, computación, biología, industria, etc.

Durante el desarrollo de esta tesis se han empleado dos métodos quimiométricos. El primero de ellos, PCA para la reducción del número de variables, la visualización del espacio multidimensional, la detección de datos anómalos (*outliers*), y para observar la relación entre variables y entre objetos; y las redes neuronales (NN), para la clasificación de muestras. Ambos métodos quimiométricos se han utilizado para la correcta clasificación de restos óseos de carácter arqueológico. A continuación, se desarrollarán los dos métodos empleados en el desarrollo de esta tesis.

3.2 Modelos quimiométricos

La obtención de datos no es suficiente para descifrar la información contenida en el objeto de estudio, es necesario interpretarlos y convertirlos en una respuesta adecuada. Para alcanzar una clasificación satisfactoria, debe elegirse en cada caso el método quimiométrico más adecuado. En la actualidad existen multitud de métodos, cuyas características y propiedades hacen de la quimiometría un campo multidisciplinar¹⁰²: química, medicina, farmacia, economía, alimentación...entre otros muchos. A continuación, veremos cómo se clasifican los métodos quimiométricos.

3.2.1 Clasificación de los modelos

Los diferentes métodos quimiométricos pueden clasificarse dependiendo de si el modelo necesita un entrenamiento previo o no. De esta manera, están los métodos supervisados o no supervisados. En los primeros, existen dos matrices de datos iniciales, la de objetos y la de clases, y dos etapas en su aplicación, el entrenamiento y el examen (test). En los métodos no supervisados tan sólo existe la matriz de objetos y es necesario definir las clases, en función de los resultados obtenidos.

- **Supervisada:** si se entrena el sistema. Se presenta una serie de objetos (muestras) definidos por múltiples variables (X) junto con la identificación de la clase a la que pertenecen (Y) para entrenar el modelo.
- **No supervisada:** No se asume ningún modelo previo de clasificación, Sólo hay un único conjunto de datos (X) la clasificación se basa en cálculos estadísticos.

Además, según la relación existente entre las variables dependiente e independiente, los métodos pueden ser lineales o no lineales. En modelos lineales, los límites entre clases serán combinaciones lineales de las variables, mientras que en un modelo no lineal la relación será más compleja, por lo que se trata de métodos más sofisticados y con mayor capacidad de clasificación.

También pueden ser clasificados en métodos de clasificación pura y métodos de modelado de clases. La principal diferencia es que en los métodos puros el espacio muestral

es dividido en tantas regiones como clases se consideren *a priori*, de modo que todos los objetos son asignados a una clase dependiendo de su posición relativa en el espacio modelado. Por tanto, es necesario saber que todas las muestras pertenecen a alguna de las clases consideradas en el modelo. Por otro lado, los métodos de modelado de clases consideran las similitudes de los objetos de una misma clase, definiendo los márgenes de separación que separan una clase específica del resto. Así, cada clase es modelada por separado, y los objetos que quedan fuera son desconocidos para esa clase. De esta manera, los objetos pueden ser asignados a una, varias o ninguna de las clases del modelo, siendo ésta la mayor ventaja del modelado de clases.

Una vez descritas las formas de clasificación de los modelos quimiométricos, se enunciarán algunos para cada tipo de clasificación:

- Métodos no supervisados:
 - *Análisis exploratorio de los datos (estadística descriptiva)*: tiene por objetivo identificar las principales características de un conjunto de datos mediante un número reducido de gráficas y/o números. Su finalidad es examinar los datos previamente a la aplicación de otro método quimiométrico, visualizando las relaciones entre muestras y variables, destacando los objetos anómalos (*outliners*) y ayudando en la selección del método más apropiado para la clasificación. Ejemplos: análisis de componentes principales (PCA), análisis de agrupamientos (*Cluster analysis*), coeficiente de correlación, análisis de componentes independientes (ICA), árbol de expansión mínima (MST) y mapas auto-organizados (SOM).
- Métodos supervisados:
 - *Lineales*: análisis discriminante lineal (LDA)¹⁰³, PLS-DA, SIMCA, entre otros.
 - *No lineales*: los métodos más utilizados son las redes neuronales artificiales (NN) y las máquinas de vectores soporte (SVM)¹⁰⁴.

3.2.2 Etapas para la aplicación de un método quimiométrico

Para que los resultados obtenidos mediante un método quimiométrico sean fiables, los modelos deben ser robustos, deben tener una alta capacidad de generalización y una alta sensibilidad y especificidad, y, para ello, el procedimiento para la aplicación de un método quimiométrico multivariante consta de ocho etapas fundamentales:

1º) Registro de la información analítica mediante la adquisición de datos de un conjunto representativo de muestras (objetos) a través de una o varias técnicas de análisis.

2º) Generación de las matrices de datos de forma útil para el modelo.

3º) Pretratamiento de los datos: minimizar las contribuciones no deseadas que disminuyen la reproducibilidad y dan lugar a estimaciones erróneas mediante centrado, autoescalado, normalización, deconvolución, filtrado de la señal, sustracción del ruido de fondo, ponderación de las variables, aplicación de una función, derivación, etc.

4º) Selección del modelo quimiométrico para realizar el análisis multivariante.

5º) Construcción y entrenamiento del método quimiométrico elegido.

6º) Interpretación y discusión de resultados.

7º) Validación del modelo: aplicando matrices de datos no utilizadas durante la etapa de entrenamiento/aprendizaje del modelo (conjunto de test), que deben ser independientes del conjunto de entrenamiento del modelo. También puede aplicarse la validación de cruce (*leave one out* - LOO), donde el conjunto de muestras se divide en bloques y se construye el modelo reservando un bloque para comprobar los resultados, y el resto para la construcción del modelo. El proceso se repite con cada bloque.

8º) Predicción de nuevos objetos: utilizando muestras nuevas.

3.3 Análisis de componentes principales (PCA)

El análisis de componentes principales (PCA) es uno de los métodos más importantes en quimiometría. El objetivo de este capítulo es presentar este método, proporcionando una descripción del análisis de componentes principales. Se trata de un método para la exploración de los datos, por lo que es utilizado generalmente como primer análisis antes de aplicar cualquier otro método¹⁰⁵. Su definición, formulada por Pearson es encontrar líneas o planos de ajuste más cercano a los conjuntos de puntos en el espacio¹⁰⁶. Se trata de un método de proyección multivariante diseñado para extraer y graficar la variación sistemática en una matriz de datos. Es muy útil para tener una visión general de los datos, pudiendo revelar agrupamientos, tendencias y datos anómalos. La influencia del ruido se minimiza a medida que las variables originales son reemplazadas por promedios ponderados, y la interpretación y visualización se ayudan enormemente al tener una visión más simple (menos variables) de todas las variaciones. El uso principal de la técnica es la reducción de la dimensión como paso previo a la aplicación de otros análisis posteriores, con el objetivo de encontrar “*agrupamientos*” en un conjunto de objetos, o para contrastar similitudes o diferencias entre los objetos¹⁰⁵.

Normalmente, los datos son procesados mediante un escalado y/o centrado. El escalado evita el sobreexpresamiento de los datos con mayor rango numérico, y por tanto, varianzas mayores, igualando la contribución de cada variable (Fig. 3.3.1), haciendo que cada columna tenga el mismo 'tamaño', para que todas las variables tengan igual oportunidad de ser modeladas (el valor medio se resta y luego la variable se divide por su desviación estándar)¹⁰⁵. Por su parte, el centrado mejora la interpretabilidad del modelo, reposicionando cada valor de modo que el valor medio de los datos quede en el origen de los ejes de coordenadas (Fig. 3.3.2).

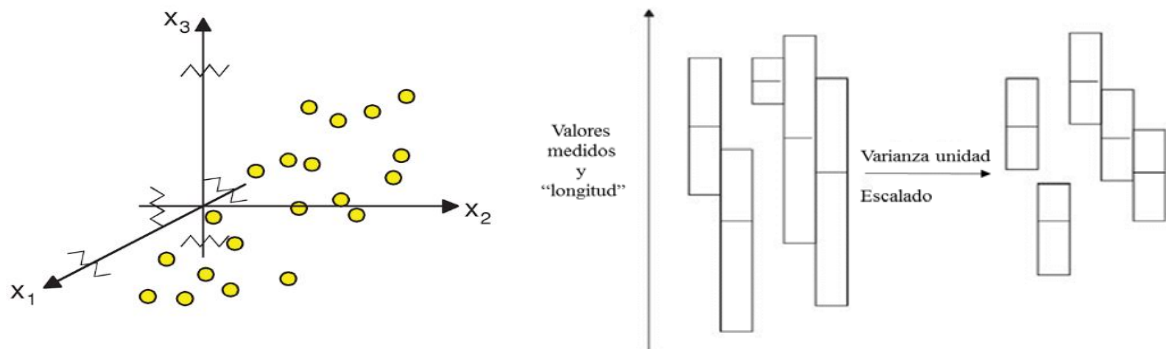


Figura 3.3.1: Escalado de los datos y su efecto en las varianzas¹⁰⁷.

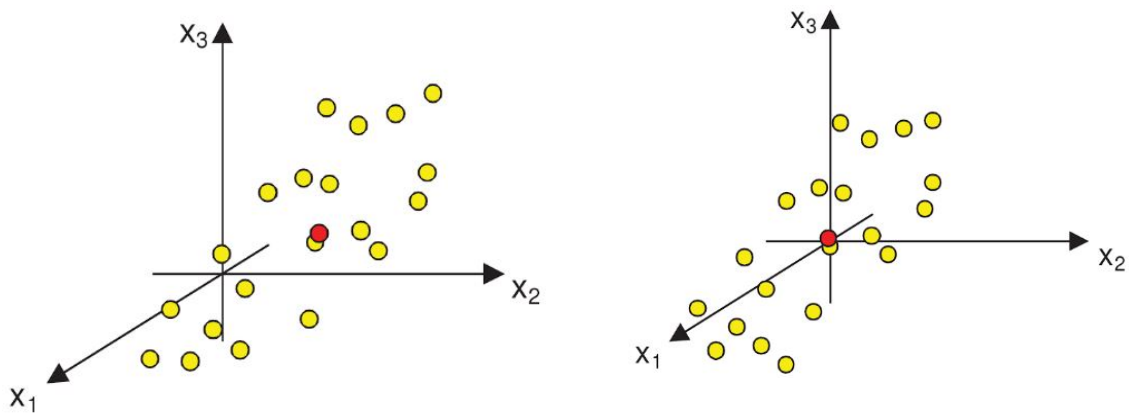


Figura 3.3.2: Efecto del centrado en los datos.

Tras el pretratamiento de los datos, el punto de inicio para el PCA es una matriz de datos X , con I filas (observaciones-objetos) y J columnas (variables), tal como muestra la tabla 3.3.1.

Tabla 3.3.1: Matriz inicial de datos X , con I filas y J columnas.

	x_1	x_2	...	x_j	...	x_j
l_1	x_{11}	x_{12}	...	x_{1j}	...	x_{1j}
l_2	x_{21}	x_{22}	...	x_{2j}	...	x_{2j}
...
l_i	x_{i1}	x_{i2}	...	x_{ij}	...	x_{ij}
...
l_I	x_{I1}	x_{I2}	...	x_{Ij}	...	x_{Ij}

El análisis de componentes principales transforma un conjunto de variables (datos originales) en un nuevo conjunto menor de variables (componentes principales),

interrelacionadas entre sí, utilizando combinaciones lineales de las variables originales, según la siguiente operación matemática¹⁰⁵ (Figura 3.3.4):

$$X = TP + E$$

donde:

- X es la matriz de datos, con dimensiones I x J (objetos por variables)
- T es la matriz de puntuaciones o “scores”, con dimensiones I x A (objetos número de componentes principales)
- P es la matriz de cargas o “loadings”, relacionada con las variables con dimensiones A x J
- E es la matriz de residuales. Para datos espectrales, los residuos corresponderían a los espectros residuales que proporcionan información química importante sobre qué variación espectral no se ha explicado.

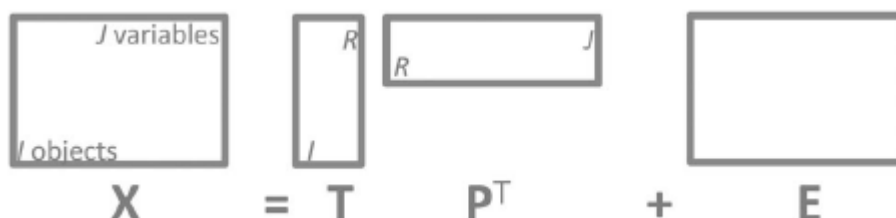


Figura 3.3.4: Estructura del modelo PCA.

Las componentes principales poseen las siguientes características siguientes:

- Son combinaciones lineales de las variables originales.
- Son ortogonales entre sí.
- El número de componentes principales debe ser, a la vez, pequeño (para que el análisis sea eficaz) y suficiente (para asimilar la mayor parte de la información de las variables iniciales).

De esta manera, existen cuatro partes en un modelo PCA: los datos, las puntuaciones “scores”, las cargas “loadings” y los residuales. Para obtener *T* y *P* pueden aplicarse diferentes algoritmos, como la descomposición del valor singular o “Singular Value Decomposition” (SVD), o el algoritmo iterativo no lineal mediante mínimos cuadrados parciales o “Non Linear Iterative Partial Least Squares” (NIPALS). El SVD obtiene todas

las componentes principales de forma simultánea, mientras que el NIPALS obtiene cada componente principal de forma secuencial.

Como medida de la cantidad de variabilidad muestral en una componente se utiliza su varianza. La varianza de las variables originales y de las nuevas calculadas será la misma, siempre que las variables originales están todas correlacionadas¹⁰⁵. Además, cuanto mayor sea su varianza, mayor importancia tiene dicha componente para el ajuste del modelo. Así, el problema se traduce en maximizar esta varianza eligiendo pesos óptimos¹⁰⁵. El análisis de componentes principales proporciona los pesos necesarios para obtener la nueva variable que mejor explica la variación en el conjunto de datos, siendo la línea del espacio dimensional que mejor aproxima los datos¹⁰⁵. Esta nueva variable, se llama el primer componente principal (Figura 3.3.5). Cada objeto proyectado en la línea de la primera componente se conoce como puntuación o “score”.

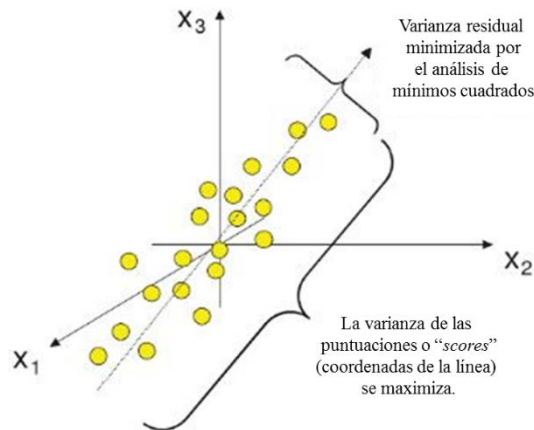


Figura 3.3.5: La primera componente principal es la proyección de los datos sobre la línea que explica la mayor variabilidad posible.

Dependiendo de los datos y de su variabilidad, una sola componente puede ser insuficiente para modelizar la variación sistemática del conjunto de datos. Sin embargo, si el porcentaje de variación explicada por la primera componente es demasiado pequeño, se calcula una segunda componente principal, que mejora la aproximación de los datos. La segunda componente principal se obtiene con un procedimiento análogo, pero añadiendo la restricción adicional de que es ortogonal a la primera (Figura 3.3.6). Así sucesivamente, buscamos el sub-espacio creado por los vectores, ortogonales dos a dos, que mejor se ajustan a la nube de puntos, buscando la dirección que maximiza la varianza con pérdida de información mínima.

Dos componentes principales definen un plano, donde, si se proyectan los objetos y se representan los resultados, es posible visualizar la estructura del conjunto de datos investigado. Como ya se ha mencionado antes, los valores de las observaciones en este plano se denominan puntuaciones o “*scores*”, por lo que la gráfica resultante se llama gráfica de puntuaciones o “*score plot*”.

Tener conocimiento sobre la calidad de los datos puede ayudar a evaluar el número de componentes. Sin embargo, en los estudios exploratorios, el objetivo es simplemente mirar la variación principal, por lo que solo se usan las primeras componentes.

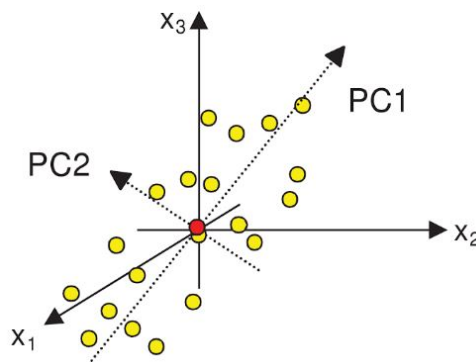


Figura 3.3.6: La primera y segunda componentes principales son perpendiculares entre sí¹⁰⁷.

Para determinar qué variables son las que generan los patrones en las observaciones, su influencia y como se correlacionan, es necesario realizar la gráfica de cargas o “*loadings plot*”. Geométricamente, las cargas o “*loadings*” son los nuevos ejes de coordenadas en los cuales se proyectan los objetos.

El significado de las puntuaciones o “*scores*” viene dado por las cargas o “*loadings*”, que forman la matriz P , y definen la orientación del plano de componentes principales con respecto a las variables originales. Algebraicamente, informan de cómo las variables se combinan linealmente para formar las puntuaciones o “*scores*”. Por lo tanto, la carga indica cuál es la tendencia y también qué variables no forman parte de la tendencia¹⁰⁵. Así, las puntuaciones o “*scores*” nos aportan información sobre las muestras y las cargas o “*loadings*” sobre las variables.

El modelo PCA es útil para encontrar datos anómalos u “*outliners*”, que no son más que observaciones extremas o que no se ajustan al modelo. Pueden detectarse fácilmente

observando la gráfica de puntuaciones o “*scores*”. Cuando se encuentra un dato anómalo de estas características, se debe eliminar del modelo de forma temporal y volver a ajustar el modelo con las nuevas variables. Si la muestra no se corrige ni se elimina ese valor atípico, el análisis subsiguiente será perjudicado por este valor¹⁰⁵. Siempre que haya dudas sobre si quitar o no un *outlier*, es muy instructivo comparar los modelos antes y después de una remoción. Si la interpretación o el uso pretendido cambian drásticamente, indica que la muestra tiene un comportamiento extremo que necesita ser manejado, mientras que lo contrario indica que es de poca importancia si la muestra se elimina. Cuando se ha detectado una muestra como un valor atípico, es interesante intentar investigar la razón. Para eliminar los valores atípicos u “*outliners*” de una forma más automática, pueden emplearse los límites T^2 proporcionados por Hotelling, permitiendo excluir del modelo todos aquellos valores que quedan fuera del intervalo de confianza del 95%.

La matriz E de errores explica la variación de las variables, dando valores entre 0 (sin explicación) y 1 (totalmente explicado). Su representación gráfica nos informa de en qué medida es contabilizada cada variable por el modelo, es decir, su importancia para el ajuste (si aparece en más de una componente principal, en qué componente principal aparece, etc.).

3.4 Redes neuronales artificiales (NN)

Las redes neuronales artificiales (NN) son un sistema iterativo de cálculo que intenta reproducir, de forma simplificada, el funcionamiento del sistema de conexiones que existe entre las neuronas del cerebro humano. En una única capa de neuronas, cada neurona recibe la información del resto de neuronas, siendo los pesos sinápticos los que controlan el efecto que produce la información recibida, que puede ser positivo o negativo, permitiendo la adaptación y el aprendizaje para realizar determinada tarea o función¹⁰⁸.

El cerebro humano es extremadamente rápido debido a que contiene más de 10^{11} neuronas, cada una conectada con más de 10^4 pesos sinápticos¹⁰⁹. Debido al interés que surge de su estudio y la necesidad de comprender más sobre su funcionamiento, surgieron las redes neuronales. Las neuronas celulares están formadas por tres partes principales bien diferenciadas:

- los axones, que son los encargados de transportar el impulso nervioso,
- las dendritas, que son las encargadas de recibir la información neuronal
- el cuerpo o núcleo, que mantiene todas las funciones celulares de la neurona

La despolarización de la membrana celular provoca la transferencia del impulso eléctrico a través del axón, produciendo la transferencia de información a través de la sinapsis neuronal. Cuando dicho impulso es recibido por la neurona, se liberan neurotransmisores químicos, que se unen a los receptores de la neurona post-sináptica¹¹⁰. Modificando el número de neurotransmisores liberados y el número de receptores moleculares se puede modular la sinapsis.

3.4.1. Redes neuronales artificiales

En las redes neuronales artificiales, la neurona artificial intenta simular una neurona biológica. La sinapsis se representa por una conexión entre dos neuronas y la fuerza sináptica por un peso (número real) asociado a esta conexión. Las señales de entrada pasan a las neuronas, donde se realiza su suma ponderada y se transforman pasando a través de una función de transferencia hacia la salida. De esta manera, la propagación de la señal viene dada por las conexiones entre las neuronas y por sus pesos asociados. La Figura 3.4.1.1 muestra un esquema de la estructura de una red neuronal artificial:

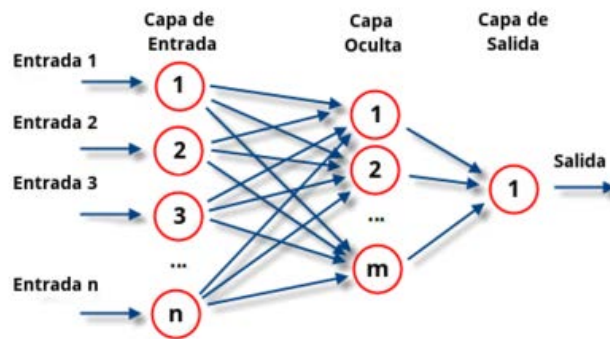


Figura 3.4.1.1: Esquema de una red neuronal artificial.

La neurona artificial es un procesador simple que constituye el elemento principal de un sistema neuronal artificial. Pueden ser lineales, binarias o sigmoideas. La manera en que están conectadas entre sí las neuronas es lo que define las redes, dando lugar a una estructura en capas. Así, existe una capa de entrada, donde se reciben los datos, una capa de salida,

donde se obtienen las respuestas, y una o más capas ocultas, donde se procesa la información. Así, la deslocalización de la información proporciona al sistema cierta tolerancia a fallos y su capacidad de adaptación al modificar sus conexiones le permite aprender de la experiencia y generalizar conceptos.

El empleo de una red neuronal consta de dos etapas: el entrenamiento y la predicción (test) de la red. En el entrenamiento se emplea un conjunto de objetos representativos, para optimizar las conexiones neuronales y dotar al sistema de la capacidad para reconocer patrones en datos a través de las salidas deseadas, adaptando los pesos de las conexiones en respuesta a las señales que le llegan en la capa de entrada. Posteriormente, se utiliza un nuevo conjunto de objetos, en este caso desconocidos para el modelo, para realizar un test y estimar su capacidad de predicción.

Existen diferentes tipos de redes neuronales, definidas por: las neuronas, la arquitectura de la red y al algoritmo de entrenamiento. A continuación, se detalla cada uno de estos elementos.

3.4.2. Modelo de neurona artificial

Como ya se ha mencionado, una neurona artificial es un procesador simple, que, a partir de un vector de entradas, produce una única salida. Existen tres tipos de neuronas artificiales:

- 1.- Neuronas de entrada: reciben la información desde el exterior.
- 2.- Neuronas ocultas: reciben información desde otras neuronas.
- 3.- Neuronas de salida: reciben la información procesada por las neuronas ocultas y la devuelven al exterior.

A su vez, las neuronas pueden ser clasificadas como binarias o digitales (si sólo admiten dos valores posibles), o continuas o analógicas (si admiten valores dentro de un rango determinado). Tenemos tantas neuronas en la capa de entrada como variables, y tantas neuronas en la capa de salida como clases a estimar. Utilizar menos neuronas de las

adecuadas provoca el funcionamiento incorrecto de la red, mientras que emplear más puede llevar a un sobreentrenamiento.

Los parámetros más importantes de las neuronas artificiales son:

a) Pesos sinápticos:

Definen la fuerza de la conexión sináptica entre dos neuronas, pudiendo tomar valores positivos (excitador), negativos (inhibidor) o cero (no hay comunicación). Mediante su ajuste, la red es capaz de adaptarse a cualquier entorno para realizar una determinada tarea.

b) Regla de propagación:

Determina el potencial resultante de la interacción de la neurona con sus neuronas colindantes. La más simple y utilizada consiste en la suma ponderada de las entradas y sus pesos sinápticos correspondientes.

c) Función de activación:

Determina el estado actual de la neurona en base al potencial y al estado anterior de la neurona.

d) Función de salida:

Proporciona el valor de salida de la neurona en base a su estado de activación.

3.4.3. Arquitecturas

Una vez definido el tipo de neurona que se va a emplear, es necesario definir la arquitectura de la red neuronal. La arquitectura es la organización y disposición de las neuronas dentro de la red, y viene dada por el número de capas, la cantidad de neuronas en cada capa, el grado de conectividad de las mismas, y el tipo de conexión entre ellas. La arquitectura de red influye altamente en los resultados, ya que influye en la modelización de las relaciones existentes entre los datos de entrada y los de salida, por lo que es importante elegirla cuidadosamente. Dependiendo de las interconexiones entre las neuronas de una red, las arquitecturas pueden clasificarse en distintas categorías:

- ***Redes feedforward:***

La información fluye hacia delante a través de dos o más capas de neuronas, siendo la capa de entrada la encargada de introducir la información exterior al núcleo de la red. La capa de salida es la encargada de transferir el resultado de la red neuronal al usuario, por lo que contiene tantas neuronas como clases tenga nuestro modelo. En el interior de la red neuronal se encuentran las capas ocultas, que pueden variar su número en función de la complejidad del sistema a modelar, y que son capaces de realizar una serie de transformaciones en los datos, con el objetivo de encontrar las similitudes entre clases que permiten llevar a cabo una clasificación¹¹¹. Necesitan de un entrenamiento.

- ***Redes Recurrentes:***

Presentan caminos de retroalimentación entre todas sus neuronas, por lo que están completamente conectadas. Por tanto, cada neurona está conectada a todas las neuronas de la siguiente capa, las neuronas de la capa anterior y a ella misma a través de los pesos sinápticos, los cuales son modificados en la etapa de entrenamiento y son recalculados en cada iteración o “*epoch*”¹¹². Su entrenamiento puede ser muy complejo, pero son más realistas desde el punto de vista del funcionamiento de las neuronas biológicas, siendo capaces de recordar información en sus capas ocultas durante un periodo grande de tiempo, pudiendo así realizar predicciones.

- ***Redes simétricamente conectadas:***

Sus conexiones entre neuronas son simétricas, es decir, tienen los mismos pesos sinápticos en ambas direcciones, pudiéndose distinguir sin embargo dos tipos: sin capa oculta o con una o más capas ocultas¹¹³. Para su entrenamiento, se maximiza el producto de las probabilidades que la red asigna a los vectores binarios del conjunto de datos de entrenamiento.

- ***Redes Perceptron:***

Está compuesta por dos capas de neuronas, una de entrada, que es la que recibe la información proveniente del exterior y la transmite a las neuronas de la capa de salida sin

realizar ningún tipo de operación sobre la variable de entrada, y una de salida (Figura 3.4.3.1). La función de activación de las neuronas es de tipo binario, donde cada neurona de salida representa a una clase. La neurona de salida responde con 1 si el vector de entrada pertenece a la clase a la que representa y con 0 en caso contrario. El algoritmo de entrenamiento se denomina algoritmo por corrección de errores hacia atrás (*back-propagation algorithm*), que ajusta los pesos de manera proporcional a la diferencia entre la salida actual proporcionada por la red y la salida objetivo, con el fin de minimizar el error producido por la red. Se trata de un método supervisado y no lineal¹¹⁴.

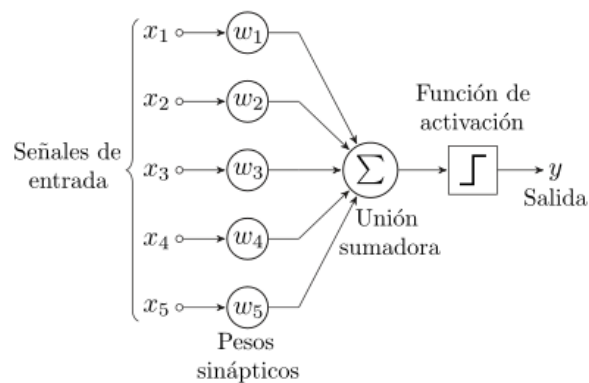


Figura 3.4.3.1: Esquema de funcionamiento de la arquitectura perceptron.

También existen las redes perceptron multicapa, que tienen capas ocultas además de la de entrada y salida.

- **Redes ADALINE / MADALINE:**

La función de salida de las neuronas es lineal, y las señales de entrada pueden ser continuas. El método de aprendizaje es mediante la regla de mínimos cuadrados, que actualiza continuamente los pesos sinápticos de acuerdo a la contribución de cada neurona sobre el error total de la red.

3.4.4. Fase de entrenamiento

Una vez seleccionados el tipo de neurona artificial y la arquitectura de la red, es necesario realizar una fase de entrenamiento. Partiendo de un conjunto de pesos sinápticos aleatorio, se va refinando iterativamente la solución hasta alcanzar el mínimo error posible

entre los valores obtenidos y los de referencia¹¹⁵. A continuación, se exponen cinco sistemas de entrenamiento de una red neuronal:

- Entrenamiento supervisado: está controlado por un agente externo, que determina la respuesta que debe generar la red respecto a las entradas, emparejando cada vector de entrada con su correspondiente vector de salida. Consiste en presentar una matriz de entrada, calcular su salida, y determinar la diferencia existente con respecto a la salida deseada, modificando los pesos sinápticos, hasta que el error conjunto es pequeño y aceptable.
- Entrenamiento por refuerzo: no se tiene la salida exacta que se desea para una entrada determinada, por lo que la función del supervisor es indicar si la salida de la red se ajusta a la deseada, con una señal positiva (+), o a un fracaso, con una señal negativa (-). Los pesos se ajustan mediante probabilidades.
- Entrenamiento no supervisado: no requiere la presencia de un agente externo para ajustar los pesos de las conexiones entre neuronas, por lo que es capaz de auto-organizarse¹¹⁶. Se trata de crear una representación interna de los datos de entrada, que ayude a realizar un segundo entrenamiento supervisado o por refuerzo. Es capaz de crear una representación de los datos de entrada, similar al PCA, pero buscando relaciones no lineales.
- Método gradiente descendiente: se buscan los pesos que proporcionan un mínimo global de la función de error, aunque en muchos casos es suficiente encontrar un mínimo local lo suficientemente bueno¹¹⁷, y no la solución correcta. La velocidad depende de la rapidez con la que los pesos convergen con sus valores correctos.
- Algoritmo de propagación inversa o “Back-Propagation”¹¹⁸: es un método supervisado basado en el método de gradiente descendiente, donde se distinguen dos fases: en la primera, se aplica un patrón de entrada y se propagado hacia las distintas capas de la red hasta generar la salida; mientras que en la segunda, esta salida es comparada con la salida esperada, y se calcula el error. Cada neurona recibe un valor de error proporcional a su contribución sobre el error global de la red, ajustando iterativamente los pesos sinápticos en cada neurona¹¹⁹. De esta

manera, la red evoluciona en el sentido de máxima adaptación a los datos de entrada.

3.4.5. Generalización

Después de realizar el entrenamiento del modelo, la red neuronal puede generalizar¹²⁰, pudiendo realizar predicciones si se utilizan datos que no han sido usados durante la etapa de entrenamiento. Para ello, en el entrenamiento la red debe ser capaz de extraer las características representativas de las muestras. Sin embargo, si se realiza un sobreentrenamiento de la red, se pierde capacidad de generalización del modelo, siendo la respuesta de la red a los objetos del entrenamiento muy buena, mientras que la respuesta a objetos desconocidos muy pobre. Esto se produce por el uso excesivo de neuronas ocultas en la red neuronal, lo que ajusta con mucha exactitud los patrones de entrenamiento, evitando que se extraigan las características del conjunto. Este problema se ve agravado cuando los patrones de entrenamiento poseen ruido, ya que la red ajusta también el mismo. Con el fin de optimizar el tiempo de entrenamiento de la red y evitar el sobreentrenamiento, se deben tener en cuenta ciertas consideraciones:

- La calidad de los datos de entrada: las muestras utilizadas deben definir de forma correcta el espacio de aplicación de la red.
- El orden aleatorio con que se presentan los datos en cada iteración.
- Realizar la normalización de los datos de entrada.
- El pretratamiento de los datos: reducir el número de variables de entrada.
- Validación del modelo: utilizar un segundo conjunto de datos tras el entrenamiento, independiente pero representativo, para optimizar el modelo y evitar el sobreentrenamiento³⁹.

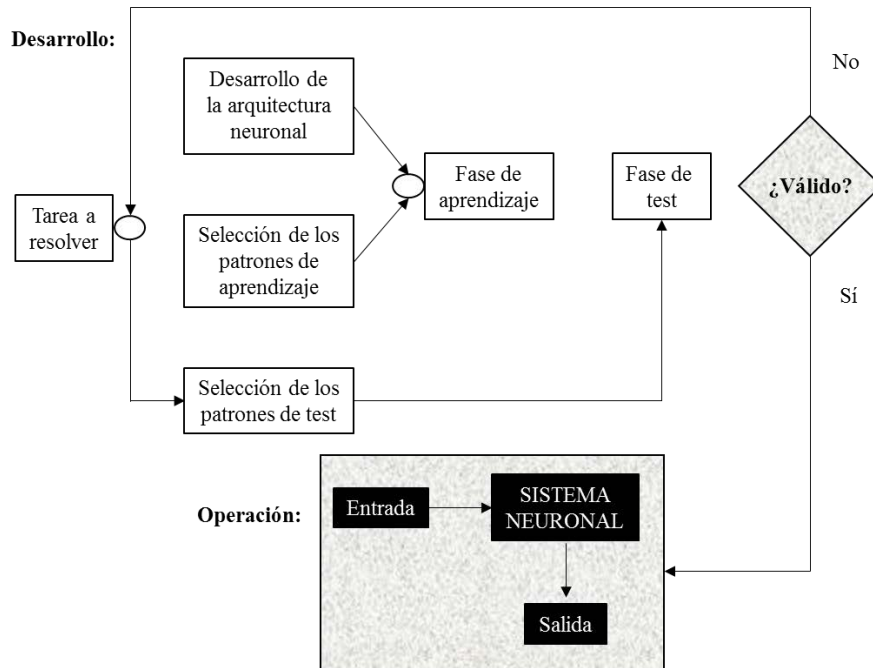


Figura 3.4.5.1: Resumen de los pasos a seguir para la utilización de una red neuronal artificial.

Como puede observarse en la Figura 3.4.5.1, los pasos a seguir para utilizar la red neuronal es elegir la arquitectura y los patrones de aprendizaje y test. Se realiza la fase de aprendizaje o entrenamiento y después se realiza el test. Si el resultado es correcto, ya tenemos nuestro modelo de red neuronal. Si no es el caso, entramos en un proceso iterativo hasta alcanzar el resultado correcto.

3.4.6. Robustez del modelo

Para saber si el modelo que hemos entrenado y que es capaz de generalizar es robusto, eliminamos una de las clases con las que hemos realizado dicho entrenamiento y volvemos a entrenar. Después, esa clase eliminada se utiliza para realizar el test. El modelo es robusto cuando considera que es una clase desconocida, puesto que la hemos eliminado anteriormente.

Capítulo 4: Instrumentación y sistema experimental

4.1. Instrumentación LIBS

En este capítulo se van a abordar los aspectos técnicos de la instrumentación para el análisis LIBS. En primer lugar, se dará una visión general de la instrumentación necesaria y después se describirán los componentes que lo constituyen individualmente. La instrumentación necesaria para la obtención de un espectro LIBS es mínima y sencilla y además es común a otros métodos de emisión atómica.

La instrumentación LIBS necesaria se compone de:

- un sistema eléctrico que suministre energía al equipo, y desde donde efectuar los procesos de control del láser,
- un láser de suficiente potencia para ablacionar el material, normalmente se trata de un láser de estado sólido (Nd:YAG),
- un sistema óptico para focalizar y dirigir el haz láser y para recoger la emisión del plasma producido, que suele ser una fibra óptica,
- un espectrómetro compacto que separe en las diferentes longitudes de onda,
- un detector,
- un ordenador con software apropiado para el procesamiento de la información.

Como ya se ha mencionado antes, los componentes básicos de cualquier sistema espectroscópico son comunes, pero pueden modificarse las especificaciones y parámetros de cada equipo para cada aplicación. A continuación, se describirá en detalle cada uno de estos dispositivos.

4.1.1. Láser

La palabra láser es el acrónimo de amplificación de la luz por emisión estimulada de radiación (“*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*”). Se trata de una multiplicación de los fotones que atraviesan una cavidad resonante. En 1956, Gordon Gould (USA) propuso el uso del bombeo óptico para estimular un máser, cuya idea fue después desarrollada por Charles Townes (USA), Nikolay Basov (URSS) y Aleksandr Prokhorov (URSS), por lo que obtuvieron el Nobel en física en 1964, debido a “su trabajo fundamental en el campo de la electrónica cuántica, que ha permitido la construcción de osciladores y amplificadores basados en el principio del máser-láser”¹²¹.

Las características únicas de la radiación láser, como su alta intensidad y su monocromaticidad, han permitido la realización de experimentos difícilmente realizables sin esta tecnología¹²². Por ello, actualmente se utilizan tanto en investigación como en la industria, generando beneficios cercanos a los 10^4 billones de dólares anuales¹²³, y estando presente en numerosas aplicaciones, como las comunicaciones, el procesamiento de materiales, servicios militares, aplicaciones médicas y un largo etcétera.

En el mercado existe una amplia gama de láseres: de CO₂, de diodos, etc., siendo los más utilizados los de estado sólido, y en particular, los láseres pulsados de Nd:YAG, que generan pulsos de nanosegundos. Este tipo de láseres poseen un cristal de granate de Ytrio dopado con iones de neodimio (Y₃Al₅O₁₂) como medio activo (véase Capítulo 1). Para pulsos más cortos (femtosegundos) se emplean láseres Ti:Al₂O₃, pero, la estabilidad, potencia, consumo de recursos y precio, hacen del láser de Nd:YAG la elección mayoritaria. Durante el desarrollo de esta tesis, se ha empleado un láser de Nd:YAG (Q-Switch activo, modelo Brio de Quantel, 1064 nm, 4ns de ancho de pulso, 4 mm de diámetro de haz y 0.6 mrad de divergencia). Sin embargo, durante las colaboraciones con los profesores J.J. Camacho, de la Universidad Autónoma de Madrid, y V. Motto-Ros, del Institute Lumière Matière en Lyon, se han usado otras dos configuraciones instrumentales¹²⁴, que se describen más detalladamente en apartados posteriores.

Láser de Nd:YAG

Es un láser de 4 niveles, donde el sistema de bombeo se realiza a través de una lámpara flash de Xe que opera entre 800-820 nm, y cuya línea fundamental de emisión se encuentra a 1064.14 nm. Además, estos láseres pueden generar sus armónicos a 532 nm, 355 nm y 266 nm¹²⁵. La figura 4.1.1.1 muestra un láser de Nd:YAG, así como el diagrama de los niveles energéticos.

Desde su descubrimiento, el láser de Neodimio (Nd) ha sufrido diversas dopaciones del cristal, que mejoraron sus propiedades como medio activo. Se comenzó con el Nd:Vidrio, y le siguieron el YAG (Ytrium-aluminium garnet), el Cr:GSGG y, por último, el YLF. El Nd:YAG es un material duro y quebradizo que presenta muy buenas propiedades ópticas, mecánicas y térmicas, lo que permite trabajar a altas frecuencias y densidades de energía. También posee buena eficiencia, robustez y repetitividad y, a diferencia de los láseres gaseosos, no presentan desgaste del medio activo.

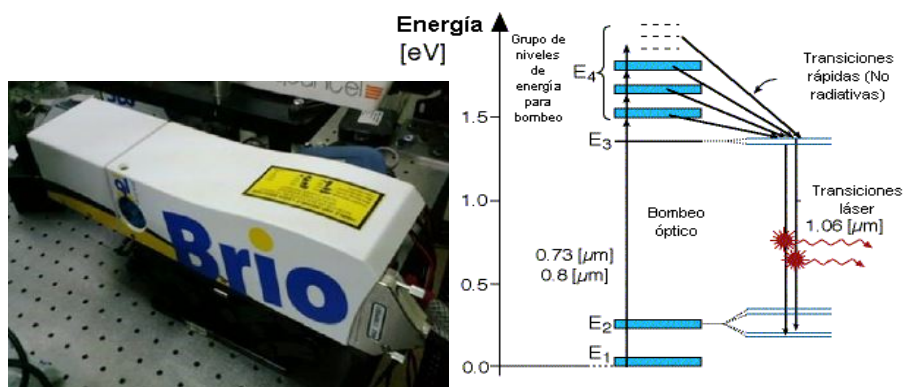


Figura 4.1.1.1: Láser de Nd-YAG y diagrama de niveles de energía.

Láser de TEA:CO₂

El láser de CO₂ es uno de los más antiguos, fue desarrollado por Kumar Patel en los Laboratorios Bell en 1964 y todavía hoy tiene un gran número de aplicaciones. Se trata de un láser con medio gaseoso, que consiste en un tubo de descarga cerrada, con un espejo al 100% en un lado y un semi-espejo transparente recubierto de seleniuro de zinc en la salida lateral, cuya reflectividad es de 5-15%. La Figura 4.1.1.2 muestra un esquema de un láser de CO₂.

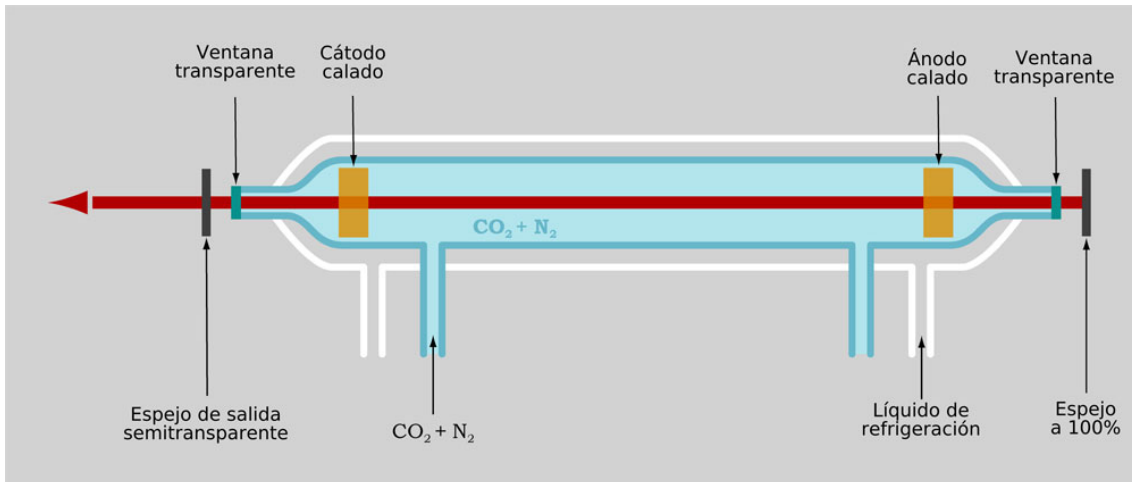


Figura 4.1.1.2: Esquema principal de un láser de CO_2 .

Las transiciones vibrorotacionales de las moléculas CO_2 hacen que estos láseres emitan en la zona del infrarrojo (IR), por lo que su banda de longitud de onda principal está comprendida entre 9,4 y 10,6 μm . En modo continuo, tienen potencia de entre milivatios (mW) a kilovatios (kW) y la relación entre la potencia de bombeo y la potencia de salida alcanza el 20%, por lo que son muy eficaces.

Puesto que emite en el infrarrojo, su fabricación requiere de materiales específicos: los espejos multicapa son fabricados con silicio, molibdeno u oro, mientras que las ventanas y las lentes son de germanio o seleniuro de zinc, o incluso de diamante. Antes se fabricaban de cloruro de sodio (NaCl) o de potasio (KCl) debido a su bajo coste, pero tenían una alta sensibilidad a la humedad. Debido a que los materiales transparentes en el infrarrojo causan importantes pérdidas, se utilizan casi siempre un interferómetro Fabry-Pérot, para así obtener líneas muy finas.

Dada su alta potencia combinada con un coste razonable, los láseres de CO_2 se utilizan en la industria para el corte, la soldadura, y el grabado, marcar materiales de embalaje, o para la separación de pintura selectiva o completa, la eliminación de la contaminación o las capas de recubrimiento, y limpiar moldes y herramientas. También se utiliza en cirugía, porque trabajan en una longitud de onda muy bien absorbida por los tejidos vivos, o en telemetría con fines militares, debido a que la atmósfera terrestre es particularmente transparente al infrarrojo.

4.1.2. Óptica

La interacción del haz láser focalizado sobre la superficie de la muestra genera un plasma, cuya luz ha de ser dirigida hasta el sistema de análisis de la forma más eficaz posible, ya sea utilizando lentes que enfoquen la radiación hasta la entrada del espectrómetro, o usando fibras ópticas que la recogen directamente. Además, existen técnicas modernas, como es el uso de telescopios (*stand-off*) para el análisis remoto.

4.1.3. Posicionamiento de la muestra

Durante el desarrollo de esta tesis sólo se ha trabajado con muestras sólidas, por lo que el sistema de posicionamiento de la muestra se llevó a cabo a través de una plataforma con movimiento X-Y-Z con desplazamiento de 500 μm . En los experimentos realizados en la Universidad Autónoma de Madrid, se empleó una cámara de vacío con posicionador rotatorio, que permite controlar las posiciones X-Y. En los experimentos llevados a cabo en el ILM de Lyon, el movimiento es a través de motores controlado por ordenador y el movimiento mínimo es 1 μm .

4.1.4. Espectrómetros

Las líneas espectrales que se obtienen por la emisión del plasma producido por la ablación láser contienen información sobre la muestra y sobre el gas que rodea al plasma. Los espectrómetros son instrumentos que permiten separar las diferentes componentes de la luz emitida por el plasma, obteniendo así un espectro que relaciona la intensidad de emisión con su correspondiente longitud de onda.

En la actualidad, existen gran variedad de espectrómetros, entre los que se encuentran: Echelle, Czerny-Turner y compactos. Sin embargo, todos tienen en común los siguientes parámetros:

- el rango espectral,
- la resolución,
- el tiempo de integración.

Idealmente, cualquier espectrómetro debe abarcar el máximo rango espectral para considerar las emisiones del máximo número de elementos y con una resolución suficientemente alta como para poder distinguir entre líneas de emisión muy próximas.

Espectrómetros Czerny-Turner

Son los más habituales cuando se trabaja con la técnica LIBS debido a su sencillo funcionamiento. La radiación proveniente del plasma pasa por una rendija y es colimada sobre un espejo, que lo dirige hacia una red de difracción que permite la separación en las diferentes longitudes de onda y después es dirigida a un segundo espejo, que la proyecta hacia la rendija de salida hacia el detector¹²⁶. Es posible aumentar o disminuir el rango espectral y la resolución del espectrómetro, tan sólo modificando la red de difracción, lo que lo convierte en un instrumento muy versátil. Las redes con muchas líneas permiten altas resoluciones, a costa de disminuir el rango espectral. En la Fig 4.1.4.1 se muestra un esquema de un espectrómetro tipo Czerny-Turner.

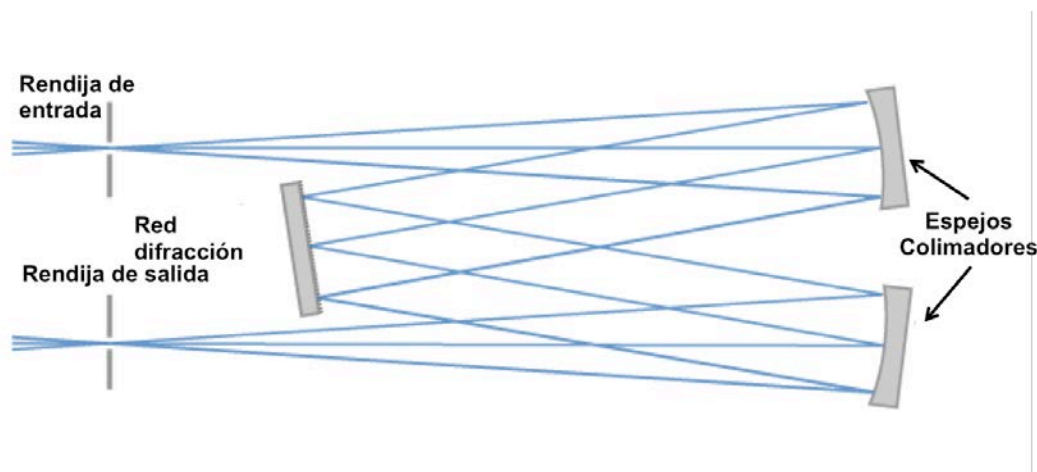


Figura 4.1.4.1: Esquema de un espectrómetro tipo Czerny-Turner.

Si se modifica la configuración de los espejos internos del espectrómetro, se puede obtener información espacial del plasma, y así observar la formación, expansión y extinción de especies y líneas a tiempo real.

Espectrómetros Echelle

Poseen una gran versatilidad, y permiten un rango espectral entre 180 - 1000 nm con

resoluciones $> 0.1 \text{ nm}^{127}$. Su implementación en sistemas de campo *in situ* y a nivel industrial es fácil debido a que no presentan partes móviles. Sin embargo, su precio suele ser superior a los espectrómetros Czerny-Turner y necesitan lámparas para su calibración diaria.

La Figura 4.1.4.2 representa la configuración de este tipo de espectrómetros. Consta de una serie de espejos y lentes de corrección para coleccionar y dirigir la radiación a una red de difracción. La luz incidente es difractada por un prisma y un segundo elemento dispersivo perpendicular a la red actúa como un "separador de orden" o "dispersor cruzado" en la trayectoria del haz.

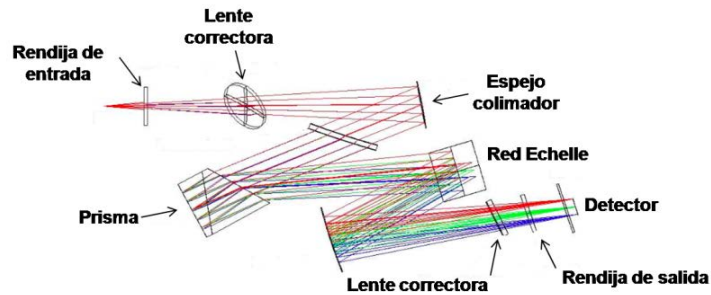


Figura 4.1.4.2: Esquema de un espectrómetro Echelle.

Espectrómetros compactos

Para llevar a cabo medidas *in situ* son necesarios equipos capaces, pequeños, robustos, portátiles y con un consumo bajo de electricidad. Los espectrómetros compactos poseen una red de difracción fija, que permiten obtener un espectro en un rango espectral y con una resolución que se seleccionan en función de la aplicación, modificando la posición de la red de difracción. La Figura 4.1.4.3 muestra el esquema de un espectrómetro compacto.



Figura 4.1.4.3: Espectrómetro compacto tipo Czerny Turner.

4.1.5. Detectores

El detector mide la intensidad de la radiación a cada longitud de onda, previamente separada por el espectrómetro. Existen muchos tipos de detectores: térmicos, tubos fotomultiplicadores o sistemas “array” de fotodiodos. Sin embargo, casi todos ellos han sido remplazados por sistemas electrónicos, como Charge Coupled Devices (CCD), Complementary Metal Oxide Semiconductors (CMOS) y los CCD intensificados (ICCD). En los espectrómetros convencionales el detector se acopla a su salida. Sin embargo, los espectrómetros compactos lo llevan incluido en el interior.

Dispositivos acoplados de carga (CCD)

Willard Boyle y George E. Smith obtuvieron el premio Nobel en Física en el año 2009 por la invención, en 1969, de un circuito de formación de imágenes y el sensor CCD. Están compuestos por materiales semiconductores, de forma que cuando un fotón incide sobre ellos, producen electrones, que pueden ser acumulados y medidos eléctricamente en una estructura de píxeles en forma de matriz. Posteriormente, la carga acumulada se transforma en voltaje, produciendo a su salida un espectro o imagen.

Dispositivos intensificados acoplados de carga (ICCD)

Multiplica los fotones incidentes, permitiendo la obtención de espectros o imágenes en condiciones de luz extremadamente bajas, o usando tiempos de exposición muy cortos.

Están formados por tres componentes:

- un fotocátodo, que transforma los fotones incidentes en electrones,
- un disco de microcanales, que multiplica los fotoelectrones
- una lámina de fósforo, que transforma de nuevo los electrones en fotones, y los dirige, mediante un recubrimiento de aluminio, al sensor CCD.

4.2. Sistemas experimentales empleados

4.2.1. Sistema experimental utilizado en la UCM

Emplea un láser de Nd:YAG con Q-Switch activo (Quantel, modelo Brio), con línea fundamental a 1064 nm, una duración de pulso de 4 ns, un diámetro de haz de 4 mm y divergencia de 0,6 mrad. El haz láser se focaliza con una lente de 100 mm de distancia focal. La emisión del plasma se recoge mediante un colimador de sílice fundido y una fibra óptica acoplada a un espectrómetro EPP2000, StellarNet (Tampa, FL, U.S.A.) con un detector CCD y una resolución espectral de $\pm 0,5$ nm en el intervalo de longitudes de onda de 200 a 1000 nm.

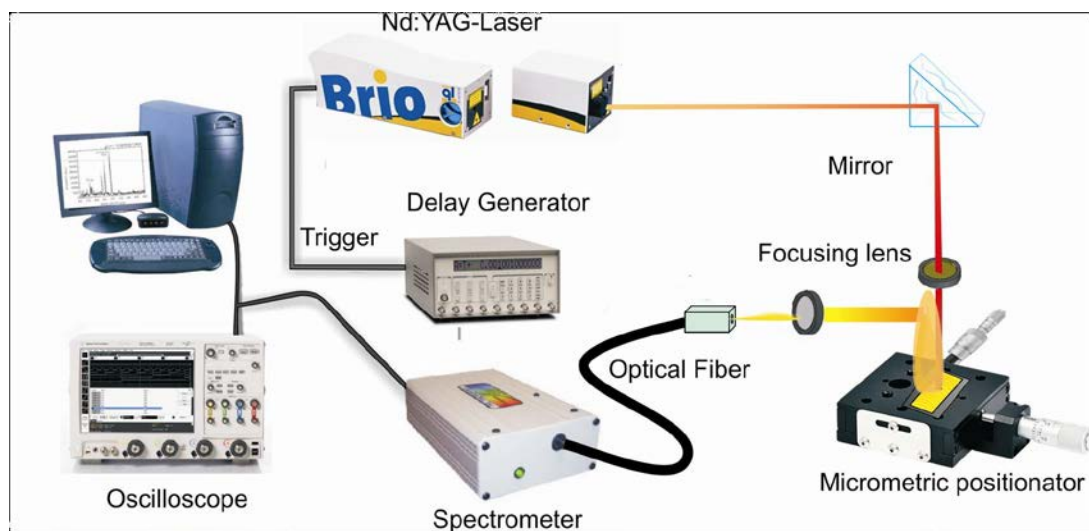


Figura 4.2.1.1: Esquema de la instrumentación utilizada en la Universidad Complutense de Madrid.

4.2.2. Sistema experimental utilizado en la UAM

Durante el desarrollo de esta tesis se ha colaborado con el laboratorio del Prof. J.J. Camacho, de la Universidad Autónoma de Madrid, donde se ha podido utilizar la siguiente instrumentación¹²⁸. Se empleó un láser gaseoso de TEA:CO₂. El haz láser se enfoca en la superficie de la muestra mediante una lente de NaCl con una distancia focal de 25 cm. El posicionamiento de la muestra se realiza en una cámara de vacío con un sistema de translación XY más rotación. Se disminuye la energía de salida del láser utilizando un atenuador óptico variable motorizado mediante un polarizador de cavidad extra y una placa de media onda, mientras que para estimar las pérdidas se utiliza un detector piroeléctrico, antes y después de la lente. Para los estudios resueltos en tiempo, se utiliza un espectrómetro Shamrock 500i de triple tránsito de 0,5 m (2400, 1800 y 1200 líneas/mm). El sistema de detección está acoplado a una cámara ICCD (Andor iStar DH-734).

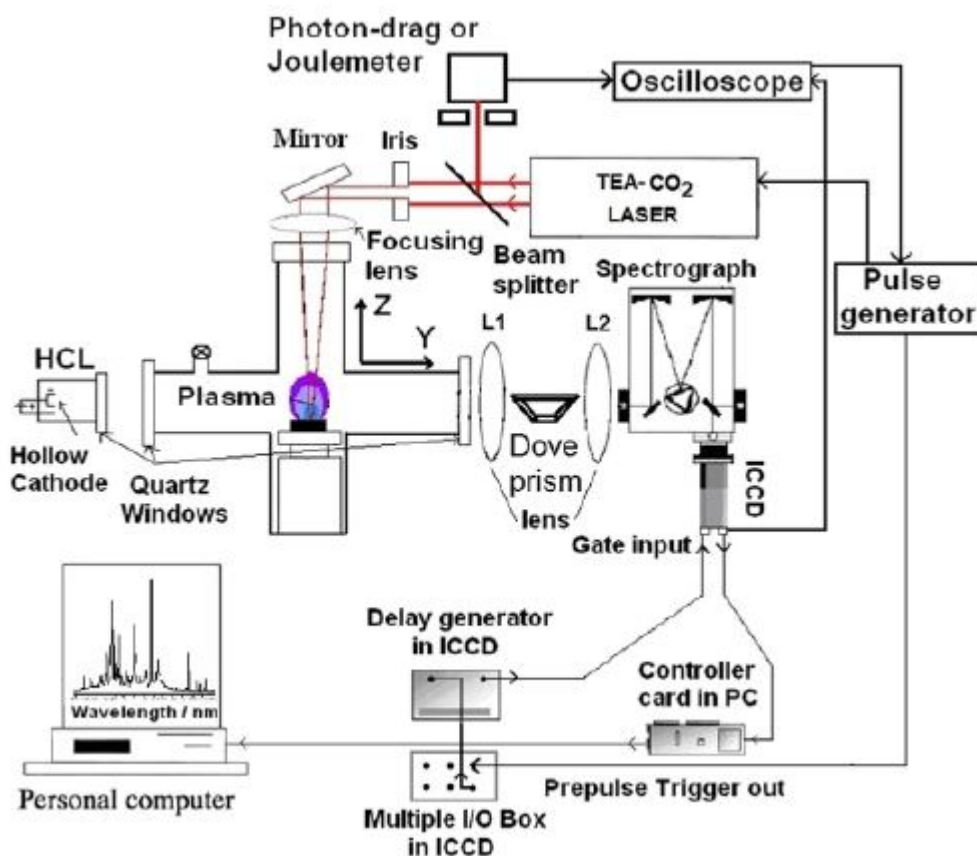


Figura 4.2.2.1: Esquema de la instrumentación utilizada en la Universidad Autónoma de Madrid.

4.2.3. Sistema experimental utilizado en el ILM (Lyon, Francia)

La configuración instrumental consiste en la combinación de un microscopio óptico, un láser LIBS, un aparato estándar de imágenes ópticas y una plataforma motorizada tridimensional (para el posicionamiento de la muestra)¹²⁹. El láser empleado es de Nd:YAG, con línea fundamental de emisión a 1064 nm y pulsos de 5 ns (Centurion, Quantel), centrado verticalmente mediante un objetivo de 15x aumento (LMM-15X-P01, Thorlabs), tal y como puede observarse en la Figura 4.2.3.1. Además, posee un sistema de enfoque automático (*autofocus*). La luz emitida por el plasma se recoge mediante dos fibras ópticas, conectadas a dos espectrómetros Czerny-Turner: un Shamrock 500 y un Shamrock 163 (ambos de Andor Technology), equipados con redes de 600 l/mm y 1200-l/mm, respectivamente. Ambos espectrómetros están equipados con cámaras ICCD, sincronizadas con el Q-switch del láser y tienen una resolución espectral de aproximadamente 0,15 nm. El movimiento de la muestra se sincronizó con el disparo láser para así realizar los experimentos de mapeo a la máxima velocidad posible, explorando la superficie de la muestra línea por línea. La energía del láser se controla mediante un medidor de potencia y un atenuador controlado por ordenador (ATT1064, Quantum Composers).

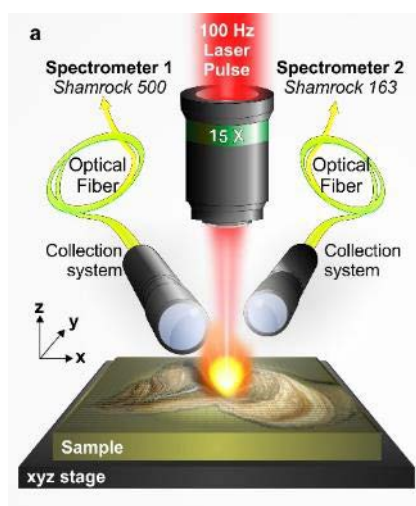


Figura 4.2.3.1: Esquema de la instrumentación utilizada en el ILM (Lyon, Francia).

Capítulo 5: Geoquímica: análisis de espeleotemas mediante LIBS

La paleoclimatología estudia las grandes variaciones climáticas y sus causas a lo largo de la historia climática de la Tierra, que muestra una sucesión de periodos fríos y cálidos, observando los valores climatológicos pasados para poder predecir las posibles variaciones del clima en el futuro. Para ello se emplean multitud de registros o indicadores climáticos, como los perfiles de hielo, las relaciones isotópicas, el paleomagnetismo o las relaciones elementales Mg/Ca, Sr/Ca, analizándolos en materiales con largos periodos de crecimiento a lo largo del tiempo, como es el caso de los espeleotemas. Los espeleotemas son depósitos de carbonato de calcio que se forman en las cuevas a partir del agua de goteo que se filtra a través de la roca y poseen una estratigrafía interna producida por la adición sucesiva de capas, que refleja su crecimiento durante cientos o miles de años, así como los cambios geoquímicos producidos por parámetros ambientales, como la temperatura y la precipitación, incorporando cantidades variables de elementos traza. Así, reconstruir cambios climáticos pasados. Este capítulo detalla la aplicación de la técnica LIBS para el desarrollo de una metodología de análisis con el fin de realizar estudios paleo-climáticos en espeleotemas.

5.1 Preparación de las muestras

La estalagmita estudiada fue reconstruida a partir de varias piezas rotas recogidas en la sala Buda, en la parte más interior de la cueva Kaite (Burgos, noroeste de España), tal y como se muestra en la figura 5.2.1, y que se conservan en la colección del Departamento de Estratigrafía de la Universidad Complutense de Madrid. Dicha cueva está siendo estudiada en el marco de un programa de investigación paleoclimático más amplio.

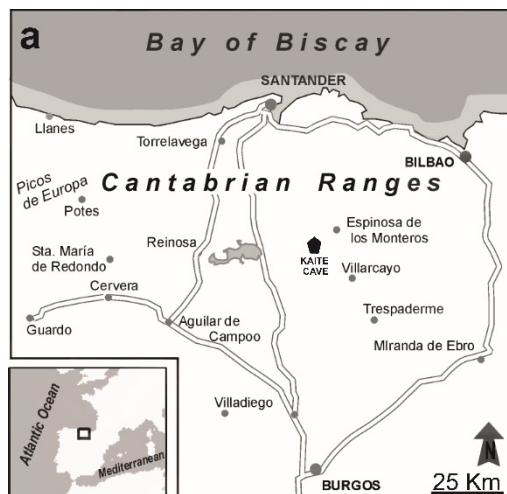


Figura 5.2.1: Mapa de la localización de la cueva Kaité.

La estalagmita, llamada Buda-100, tiene forma cónica y muy alargada (112 cm de largo, 5 a 6 cm de diámetro), compuesta exclusivamente de calcita (fibrosa columnar en la parte axial y dendrítica en algunas áreas periféricas), y con una estratigrafía interna definida por una laminación de crecimiento a escala micrométrica. La datación por uranio indica que la estalagmita pertenece al Holoceno medio, y confirma el carácter anual de la laminación. La estalagmita se preparó para los análisis de acuerdo al siguiente protocolo:

- 1) cada pieza se cortó verticalmente a lo largo del eje de crecimiento;
- 2) se prepararon 19 láminas de 5x8x0.5 cm con un espesor de 500 micras;
- 3) se pulió la superficie de cada sección petrográfica.

Las figuras 5.2.2 y 5.2.3 muestran el espeleotema completo y una sección del mismo. La cueva Kaité tiene 350 m de longitud máxima y se encuentra a 12-20 m por debajo de la superficie, topográficamente aislada de los principales niveles del complejo kárstico de Ojo Guareña y a 860 m sobre el mar, por lo que el área tiene un clima relativamente húmedo y templado, con temperaturas medias anuales de 10-11 ° C (aunque varían notablemente según las estaciones: >18 ° C en julio-agosto, y < 5 ° C en enero-febrero). El programa de monitoreo comenzó en 2002 en Las Velas Hall, una pequeña galería adyacente a Buda Hall, ambas separadas 340 m de la entrada principal, que registra un goteo variable estacionalmente, una temperatura de 10,40±0,04 ° C y una humedad relativa > 99%¹³⁰, por lo que existen abundante cantidad de espeleotemas, que siguen creciendo en la actualidad. La roca madre de la cueva está compuesta por calizas del Cretácico Superior, que muestran dolomitización

parcial, mientras que la edad de la estalagmita, obtenida por ICPMS en el Laboratorio de Isótopos de Minnesota, oscila entre 4,9 y 0,9 ka BP.

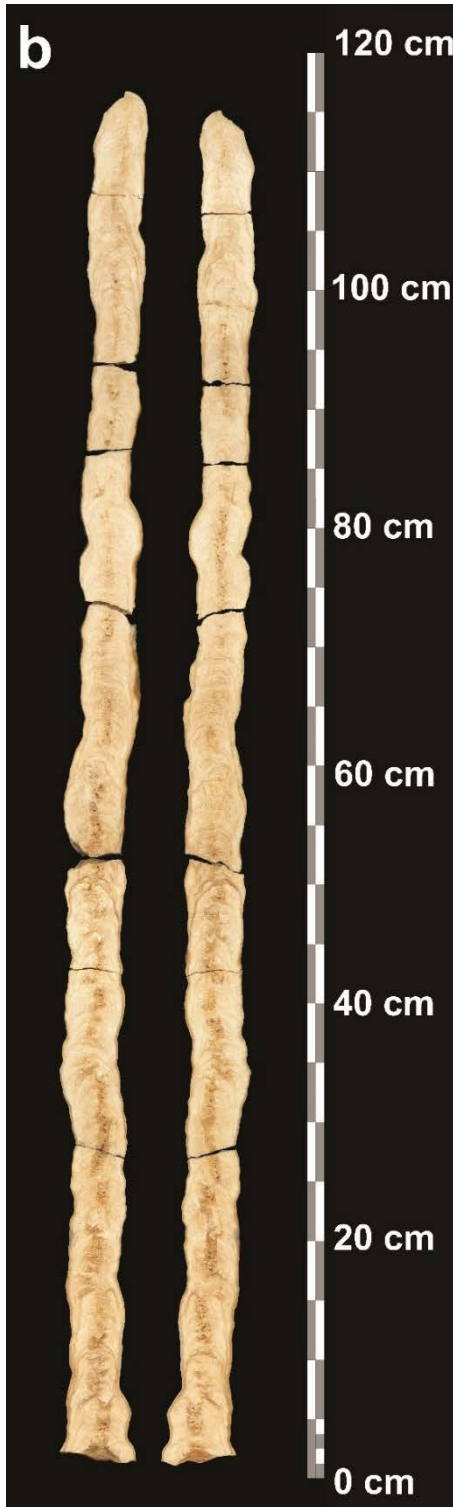


Figura 5.2.2: espeleotema completo.

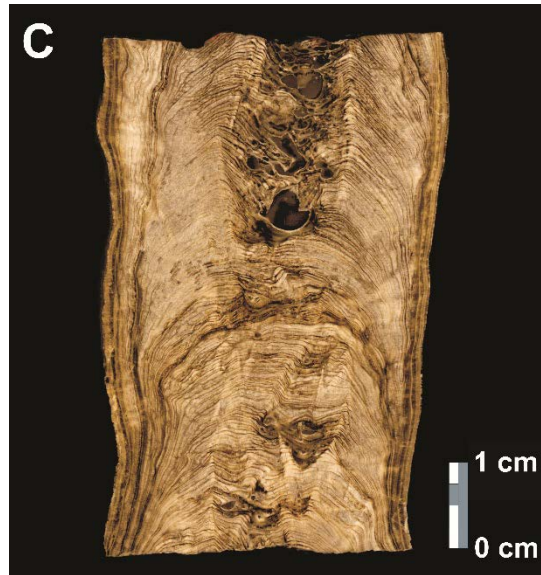


Figura 5.2.3: sección del espeleotema.

Además, para el estudio de imágenes elementales se utilizó la muestra SLX 2B, que es una losa longitudinalmente pulida de una estalagmita recuperada de la Galería Sílex de Cueva Mayor en la provincia de Burgos (42 ° 21.53'N, 3 ° 31.1'W) con el permiso otorgado por la Junta de Castilla y León y el apoyo del Grupo Espeleológico Edelweiss (Ex. Dip. Prov. Burgos). La muestra se consideró para estudios paleoclimáticos en el marco de los proyectos de investigación CLISP/RECCE. Se almacena en el Departamento de Estratigrafía de la Universidad Complutense de Madrid. Este espeleotema se recogió de una galería fuertemente aislada donde la temperatura permanece casi constante a lo largo del año a aproximadamente $10,6 \pm 0,1$ °C, la humedad relativa es cercana al 100% y no existen corrientes de aire significativas.

5.2 Evaluación de la técnica LIBS para la detección de la variación de elementos traza en espeleotemas

Este trabajo ha sido publicado en Journal of Applied Laser Spectroscopy con la siguiente referencia bibliográfica:

“Evaluation of Laser Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) for detection of trace element variation through stalagmites: potential for paleoclimate series reconstruction”. A. Marín-Roldán, J. A. Cruz, J. Martín-Chivelet, M. J. Turrero, A. I. Ortega, J. O. Cáceres. **1** (2014) 7-12.

Resumen

Se evalúa el potencial de la técnica LIBS para la caracterización de elementos traza (Mg/Ca y Sr/Ca) en espeleotemas (depósitos en cuevas de carbonato de calcio, como las estalagmitas), que se utilizan para reconstruir series temporales del cambio climático pasado. Estos materiales geológicos poseen una estratigrafía interna relativamente simple que refleja su historia de crecimiento, y los cambios geoquímicos pueden reflejar variabilidad en parámetros ambientales como la temperatura y las precipitaciones. En este trabajo, se realiza la caracterización de parámetros metodológicos y experimentales, como la preparación, tamaño y representatividad de las muestras, y la sensibilidad, linealidad y replicabilidad de

la técnica LIBS, que revelan el alto potencial de la técnica y muestran claras ventajas frente a otras técnicas de uso común.

5.2.1. Introducción

Las características de la técnica LIBS presentan ventajas frente a otros métodos de análisis para la detección de las variaciones de elementos traza en muestras geológicas, convirtiéndola en una herramienta con un alto potencial para el análisis geoquímico. Otros autores han realizado ensayos preliminares con muestras de espeleotemas¹⁴, pero ésta es la primera vez que se realiza una caracterización sistemática, validando los resultados mediante pruebas de homogeneidad y reproducibilidad del análisis.

La variación en la concentración de elementos traza a lo largo del crecimiento de una estalagmita se pueden utilizar como indicadores paleoambientales o paleoclimáticos, debido a que su tasa de incorporación a la calcita está controlada indirectamente por factores ambientales, como la temperatura o las precipitaciones. Por ello, se han realizado análisis mediante LIBS para la obtención de relaciones Mg/Ca y Sr/Ca en espeleotemas para reconstruir los cambios ambientales del pasado. La premisa es que los pequeños cambios de temperatura del aire de la cueva y las pequeñas variaciones que se producen en las tasas de crecimiento de la estalagmita no afectan significativamente a los coeficientes de distribución del Mg y Sr por lo que mayoritariamente depende del agua de goteo. Debido a que su composición depende de las interacciones suelo-agua y agua-roca que se producen antes de que el agua llegue a la cueva, cualquier cambio en el suelo o en los parámetros climáticos, como la precipitación y la temperatura, puede modificar su hidroquímica, y, por tanto, la concentración de los elementos traza presentes en la estalagmita.

La figura 5.2.1 muestra un espectro LIBS de emisión típico desde 200 nm hasta 1000 nm correspondiente a la muestra de espeleotema medido a presión atmosférica. Además, se muestra una sección de la imagen óptica donde se puede apreciar la estratigrafía de la muestra, alternando capas oscuras y claras. La región espectral seleccionada contiene las líneas de emisión más significativas en este tipo de muestras, identificándose líneas espectrales correspondientes a Ca, Mg, y Sr, principalmente, que fueron asignadas utilizando la base de datos NIST⁹⁶.

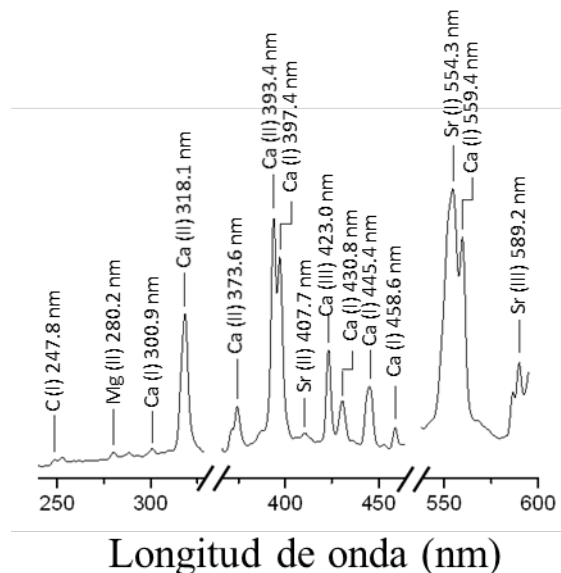


Figura 5.2.1: Principales líneas de emisión recogidas en un espectro típico de espeleotema.

5.2.2. Procedimiento experimental

El sistema experimental se ha descrito en el Capítulo 4 de esta tesis. En este caso se han empleado una fluencia del láser de 20 J/cm^2 y una tasa de repetición de 1 Hz. Para eliminar todas las impurezas en la superficie se realizaron 3 disparos de láser antes de realizar promedios de 20 pulsos en cada posición individual, para obtener un espectro. Como ya se ha mencionado con anterioridad se seleccionaron las relaciones Mg/Ca y Sr/Ca debido a que son indicadores paleoclimáticos.

5.2.3. Resultados

Para que la comparación entre la intensidad de emisión de las líneas espectrales y la respuesta analítica sea lo más precisa posible, es imprescindible que no exista ninguna variación significativa en la temperatura del plasma durante las medidas. Para controlar la variación de la temperatura del plasma se puede controlar la relación existente entre dos líneas espectrales atómicas (ver epígrafes 6.1.2. y 6.1.3). La temperatura del plasma se ha estudiado mediante la relación de intensidades de emisión de dos líneas de calcio: Ca (I) en 430,8 nm y Ca (I) en 445,4 nm. La Figura 5.2.3.1 muestra que la temperatura del plasma se mantiene casi constante a lo largo de las mediciones, lo que reduce al mínimo el efecto matriz

y proporciona resultados más precisos, ya que las variaciones de intensidad de emisión de los elementos presentes en la muestra sólo pueden ser atribuidas a cambios en la concentración elemental.

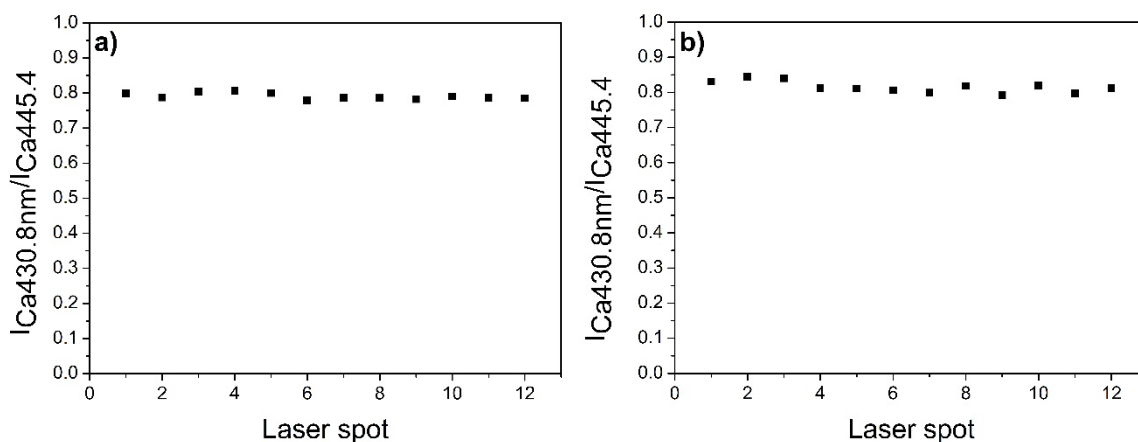


Figura 5.2.3.1: Relación de intensidades de emisión de las líneas de calcio en a) en la misma capa estratigráfica, y b) en dos líneas paralelas a lo largo del eje de crecimiento del espeleotema.

PRUEBA DE HOMOGENEIDAD

Para verificar la homogeneidad de la muestra, se realizaron doce mediciones Mg/Ca y Sr/Ca a lo a lo largo de una única capa de crecimiento (anual). La figura 5.2.3.2 muestra los resultados obtenidos para comprobar la continuidad lateral de la capa de crecimiento, mientras que la figura 5.2.3.3 muestra una imagen óptica de la capa delgada donde se realizaron las pruebas, mostrando los cráteres dejados por los pulsos láser.

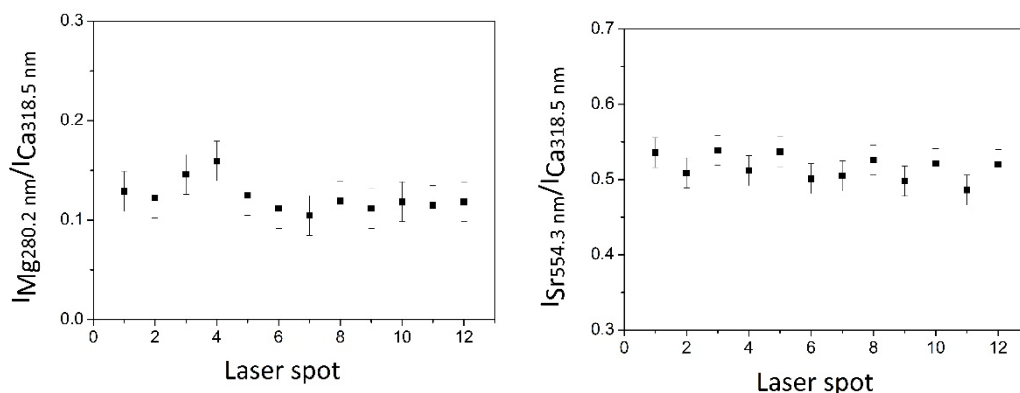


Figura 5.2.3.2: resultados de Mg/Ca y Sr/Ca a lo largo de una capa anual de crecimiento.

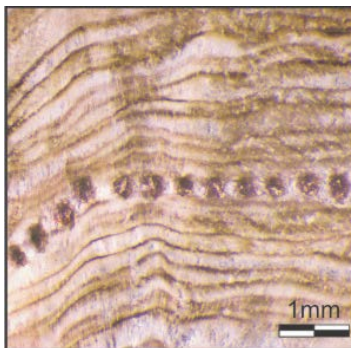


Figura 5.2.3.3: cráteres resultantes del análisis por LIBS en una misma capa de crecimiento.

Como puede observarse Figura 5.2.3.3, incluso con el sistema de posicionamiento micrométrico, la estratigrafía de la muestra no permite el rastreo en la misma capa para los primeros cuatro valores, que están claramente fuera y cuyos valores de intensidad también están fuera de la tendencia observada. Sin embargo, se observa una alta correlación estable entre las relaciones Mg/Ca y Sr/C, mostrando uniformidad de capa y repetibilidad anuales.

PRUEBA DE REPETIBILIDAD

La repetibilidad analítica se evaluó midiendo las relaciones Mg/Ca y Sr/Ca de 140 puntos individuales a lo largo de dos líneas separadas por 3 mm, paralelas al eje de crecimiento de la estalagmita en la misma sección delgada. La figura 5.2.3.4 muestra las dos líneas de análisis realizadas sobre la superficie del espeleotema. Esta prueba permite evaluar la estabilidad y las irregularidades/fusiones dentro de las capas anuales, lo que podría tener una gran influencia en el análisis. Sin embargo, los resultados (Figura 5.2.3.5) muestran una buena concordancia. Los valores de RSD obtenidos corresponden a una elevada heterogeneidad de la superficie de un punto a otro adyacente debido a la estratigrafía de la muestra.



Figura 5.2.3.4: cráteres resultantes del análisis por LIBS en el análisis de repetibilidad.

Como se ve puede observar en esta figura, la tendencia de las relaciones de intensidad Mg/Ca y Sr/Ca en las líneas paralelas a lo largo del eje de crecimiento es muy similar y los máximos y mínimos se mantienen en ambas líneas. Las pequeñas diferencias observadas pueden ser explicadas por la concentración de Ca, que también varía a lo largo del eje de crecimiento.

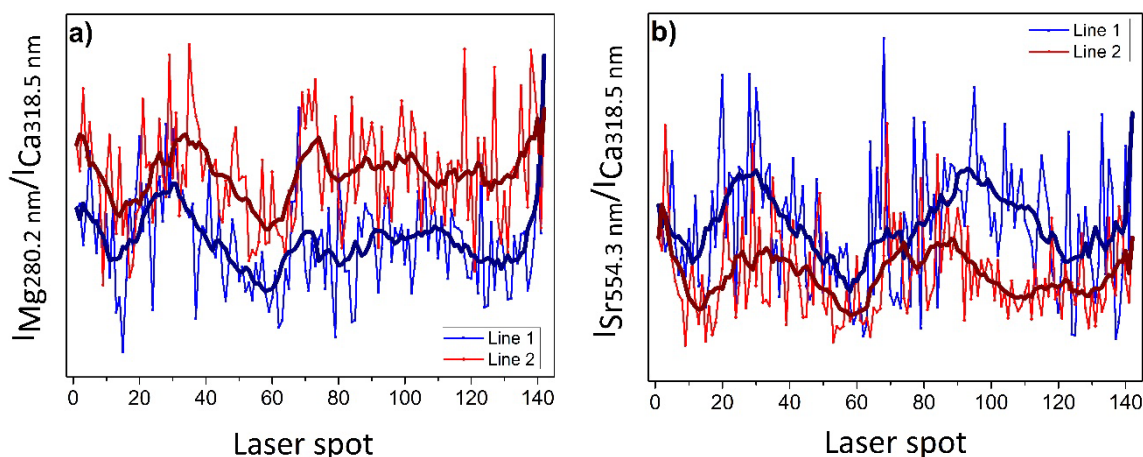


Figura 5.2.3.5: relaciones Mg/Ca y Sr/Ca obtenidas por LIBS de 140 puntos individuales a lo largo de dos líneas separadas por 3 mm, paralelas al eje de crecimiento de la estalagmita en la misma sección delgada del análisis para el análisis de repetibilidad.

Los resultados muestran que, a pesar de la heterogeneidad de la muestra, las muestras geológicas de este tipo pueden ser adecuadamente analizadas por LIBS. Por otro lado, las pruebas de homogeneidad y reproducibilidad demuestran dos aspectos:

- 1) la continuidad lateral uniforme resalta la sensibilidad de la técnica LIBS
- 2) posee resolución suficiente desde el punto de vista geológico, como lo demuestra el análisis de sucesión microestratigráfica. Además, el ensayo demuestra que las muestras no habían sufrido procesos de disolución y/o recristalización que pudieran alterar la composición.

5.2.4. Conclusiones

LIBS ha sido empleado satisfactoriamente para la detección de variaciones elementales a lo largo del eje de crecimiento de la estalagmita, mostrando su potencial para la reconstrucción de series paleoclimáticas. A pesar de la heterogeneidad de la muestra, la

técnica LIBS proporcionó resultados precisos, tal y como lo demuestran los ensayos de repetibilidad y replicabilidad.

Aunque la técnica LIBS sólo vaporiza una pequeña fracción de la muestra en cada disparo láser, proporciona buena sensibilidad analítica de los elementos traza presentes en el espeleotema y permite la replicabilidad del análisis de alta velocidad, incluso para series largas. La reconstrucción de series paleoclimáticas en espeleotemas suele implicar grandes cantidades de análisis geoquímicos realizados a partir de muestras minúsculas, por lo que el LIBS ha demostrado ser una técnica analítica capaz de lograr un buen equilibrio entre el volumen de material, la precisión y exactitud de los resultados, y la velocidad y el coste del proceso analítico.

5.2.5. Agradecimientos

Especial agradecimiento a todos los autores del artículo, J. A. Cruz, J. Martín-Chivelet, M. J. Turrero, A. I. Ortega, J. O. Cáceres. Este trabajo es una contribución a los proyectos CGL2010-21499-BTE y CGL2013-43257-R, y al grupo de investigación "Paleoclimatología y Cambio Global" de la UCM (España). Agradecimientos también a la Junta de Castilla y León (España) por acceder y trabajar en la Cueva Kaite del Monumento Natural de Ojo Guareña y la colaboración del Grupo Espeleológico Edelweiss de la Excelentísima Diputación Provincial de Burgos.

5.3 Elementos traza como indicadores del paleoclima

Este estudio ha sido realizado en colaboración con el grupo "Paleoclimatología y Cambio Climático" de la UCM, habiéndose llevado a cabo por Juncal A. Cruz y la doctoranda de la presente tesis.

Esta línea de trabajo ha dado lugar a dos publicaciones en *Environmental Earth Sciences* con las siguientes referencias bibliográficas:

“Long-term hydrological changes in northern Iberia (4.9–0.9 ky BP) from speleothem Mg/Ca ratios and cave monitoring (Ojo Guareña Karst Complex, Spain)”. J. A. Cruz, M. J. Turrero, J. O. Cáceres, A. Marín-Roldán, A. I. Ortega, A. Garralón, L. Sánchez, P. Gómez, M. B. Muñoz-García, R. L. Edwards, J. Martín-Chivelet. **74** (2015) 7741-7753.

“Trace Elements in Speleothems as Indicators of Past Climate and Karst Hydrochemistry: A Case Study from Kaite Cave (N Spain)”. J.A. Cruz, J. Martín-Chivelet, A. Marín-Roldán, M.J. Turrero, R.L. Edwards, A.I. Ortega and J.O. Cáceres. **1** (2015) 569-577.

A continuación, se resumen los resultados más destacables obtenidos mediante LIBS.

Resumen

Se han realizado 2400 análisis Mg/Ca, analizando una estalagmita perteneciente al Holoceno procedente de la Cueva Kaite (Complejo Karst Ojo Guareña, Burgos, N España) mediante espectroscopia de ablación láser (LIBS), con el objetivo de obtener una serie de alta resolución a lo largo de la estratigrafía de la estalagmita. Los análisis LIBS producen información sobre los cambios significativos en las relaciones de intensidad Mg/Ca y Sr/Ca a través de la estalagmita, reflejada en la concentración inversa de la concentración de los elementos traza entre el agua de goteo y el espeleotema, lo que revela una variabilidad interanual en las precipitaciones.

5.3.1. Introducción

La Paleoclimatología es el estudio del cambio climático durante toda la historia de la Tierra, ya que ésta ha intercalando periodos fríos (glaciaciones) y periodos cálidos. Actualmente estamos en una era glacial, pues tenemos un continente permanentemente helado: la Antártida. Dentro de una era glacial se producen igualmente periodos fríos (glaciares) y periodos cálidos (interglaciares). La emisión creciente de gases de efecto invernadero a la atmósfera tiene resultados inciertos en el clima, lo cual afecta a todos los seres vivos. Por ello, la Paleoclimatología adquiere una mayor relevancia, ayudando a prever los posibles cambios futuros y a obtener una mejor comprensión del sistema climático. Los

indicadores de la evolución del clima terrestre son variados: huellas glaciales, sondeos de hielo, sondeos de sedimentos del fondo marino, los anillos de los árboles, las medidas instrumentales de las variables meteorológicas, y, el que aquí nos ocupa, el registro de elementos traza en espeleotemas (estalagmitas, estalactitas, etc)

Aunque la mayoría de las estalagmitas están compuestas de carbonato de calcio casi puro, se pueden incorporar diferentes elementos traza, como el Mg y el Sr, cuya concentración depende de múltiples factores, determinados por el ambiente de la cueva, la roca huésped y los procesos de la superficie^{131,132}. Suponiendo que los coeficientes de distribución del Mg y Sr son aproximadamente constantes a través del tiempo, las variaciones en las proporciones de Mg/Ca y Sr/Ca en la estalagmita están relacionados con el agua de goteo y, por tanto, con los patrones de precipitación. Como las estalagmitas suelen crecer durante largos períodos de tiempo, pueden registrar cambios en la concentración de los elementos traza, que pueden ser interpretados en términos paleoclimatológicos. El análisis de las variaciones en la concentración de elementos traza, como el magnesio o el estroncio durante el crecimiento de los espeleotemas ha demostrado tener un alto potencial como herramienta para reconstruir cambios pasados debido a la hidrología, la lluvia, y la temperatura¹³³. Sin embargo, el uso de los elementos traza en espeleotemas como paleoindicadores requiere técnicas analíticas capaces de detectar los pequeños cambios de composición en micromuestras que representen intervalos de tiempo tan cortos como una estación o un año. Dado que los espeleotemas producen series temporales de cientos o miles de años, las técnicas analíticas deben ser prácticas y relativamente baratas. Para ello, la espectroscopia de ablación láser (LIBS) proporciona un enorme potencial, ya que la técnica da suficiente sensibilidad analítica a los elementos traza más abundantes, y es notablemente rápida y asequible¹³⁴.

5.3.2. Procedimiento experimental

Las mediciones LIBS se obtuvieron utilizando el equipamiento descrito en el Capítulo 4, perteneciente a la UCM.

5.3.3. Análisis mediante LIBS

Los datos geoquímicos de Mg y Sr en la muestra Buda-100 se obtuvieron mediante LIBS (con el equipo descrito en el Capítulo 4) sobre la superficie pulida de las 19 secciones delgadas (de 5-8 cm, 500 μm de espesor) preparadas para petrografía y colocadas sobre un posicionador micro-métrico manual X-Y-Z con desplazamiento de 0,5 mm. Para la obtención de cada espectro, se realizaron promedio de 20 disparos, con tres disparos de limpieza previos. La Figura 5.3.3.1 muestra un espectro LIBS y un detalle de las líneas espectrales observadas.

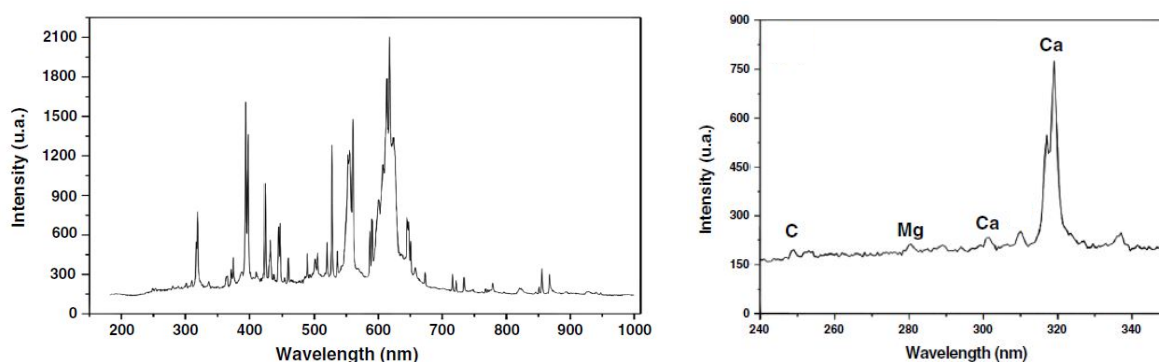


Figura 5.3.3.1: Izquierda) espectro típico LIBS para la muestra BUDA-100, Derecha) detalle ampliado del espectro, donde se observan las líneas asignadas.

Para minimizar el efecto matriz (debido a la heterogeneidad, rugosidad, variaciones en el microporosidad, etc. de la superficie de la muestra), los datos obtenidos mediante LIBS se muestran como la relación de intensidades Mg/Ca y Sr/Ca, siendo el Ca el estándar interno.

Los datos Mg/Ca obtenidos por LIBS se validaron mediante la realización de un análisis por medio de plasma acoplado inductivamente a espectroscopía de emisión (ICP-OES). Este análisis fue llevado a cabo por Juncal A. Cruz en el Centro Nacional de Investigación de la Evolución Humana (CENIEH), en Burgos (España). Debido al método de obtención de las muestras mediante perforación de la estalagmita, los resultados de ICP-OES son promedios de aproximadamente 10-20 capas anuales de crecimiento, mientras que los resultados de LIBS corresponden al tiempo de crecimiento de varios meses. Debido al diferente tamaño de las muestras, no pueden obtenerse coincidencias perfectas, pero se ha obtenido una correlación razonablemente buena entre los dos registros, tal y como puede apreciarse en la Figura 5.3.3.2:

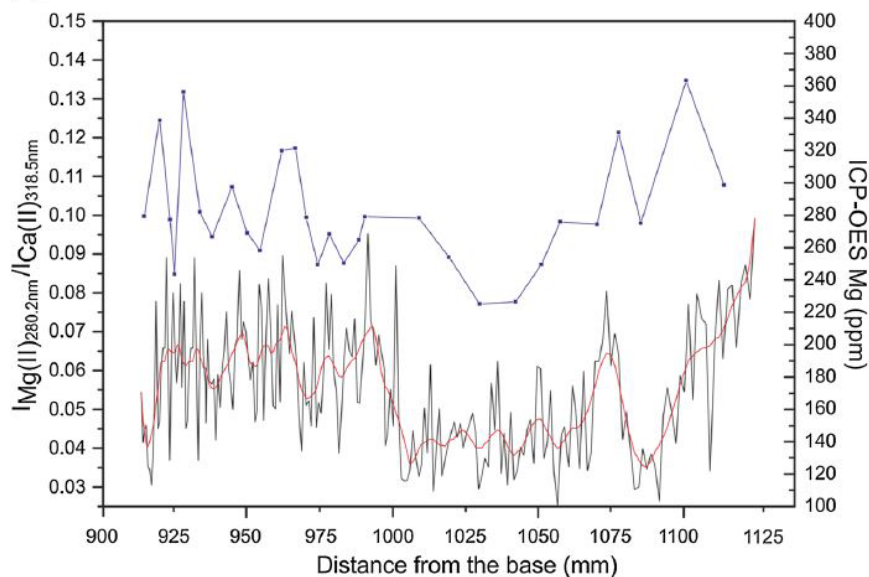


Figura 5.3.3.2: Correlación de las tendencias entre los datos Mg/Ca obtenidos mediante LIBS y los datos de Mg obtenidos mediante ICP-OES.

Estos datos apoyan el hecho de que las mediciones mediante LIBS muestran representativamente los cambios en el contenido de elementos traza en el espeleotema a través del tiempo, y, por tanto, se pueden utilizar para la interpretación paleoclimática.

Se realizaron 2400 mediciones Mg/Ca y Sr/Ca mediante LIBS a lo largo de la sección longitudinal de la muestra Buda-100. La serie paleoclimática así obtenida, refleja la variabilidad estacional en la composición del espeleotema, que se expresa como variaciones en las relaciones de intensidad Mg/Ca y Sr/Ca. Estas series se representan gráficamente en la Fig. 5.3.3.3, donde se ha realizado un suavizado (“smooth”) de los datos mediante la realización de promedios de nueve periodos para una mejor visualización de los mismos.

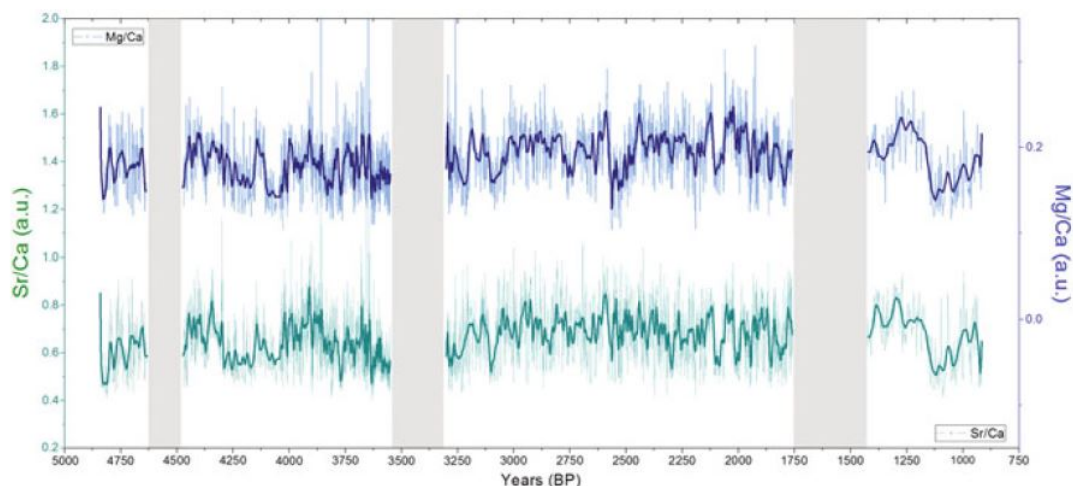


Figura 5.3.3.3: Serie de tiempo para las relaciones de intensidad de Mg/Ca y Sr/Ca en la muestra Buda100, donde las áreas grises representan hiatos.

La relación Mg/Ca parece ser más sensible a los cambios en la precipitación que la relación Sr/Ca, aunque ambos parámetros presentan cierta correlación en las escalas estacionales.

Los cambios paleohidrológicos que ocurrieron en la región de la cueva a través del tiempo vienen reflejados en el registro Mg/Ca de la Fig. 5.3.3.4. Las variaciones en la relación de intensidades Mg/Ca del espeleotema están determinadas principalmente por la composición del agua de goteo, que a su vez es fuertemente dependiente de la interacción agua-roca. Tiempos de residencia mayores darían como resultado el enriquecimiento en Mg del agua, como resultado de varios procesos que incluyen la precipitación previa de la calcita y/o la disolución diferencial de calcita y dolomita en el lecho rocoso. Debido a que los tiempos de residencia disminuyen con la mayor recarga de agua, y ésta depende de la cantidad anual de precipitación (principalmente otoño-invierno-primavera), el contenido de Mg en la calcita del espeleotema es inversamente proporcional a ese parámetro meteorológico. Sin embargo, dicho registro Mg/Ca no permite ni la cuantificación absoluta, ni la calibración de los cambios paleohidrológicos reconstruidos a partir del registro de Mg/Ca, interpretándose tan sólo en términos de variaciones de paleoprecipitación "relativas" (intervalos más secos o más húmedos).

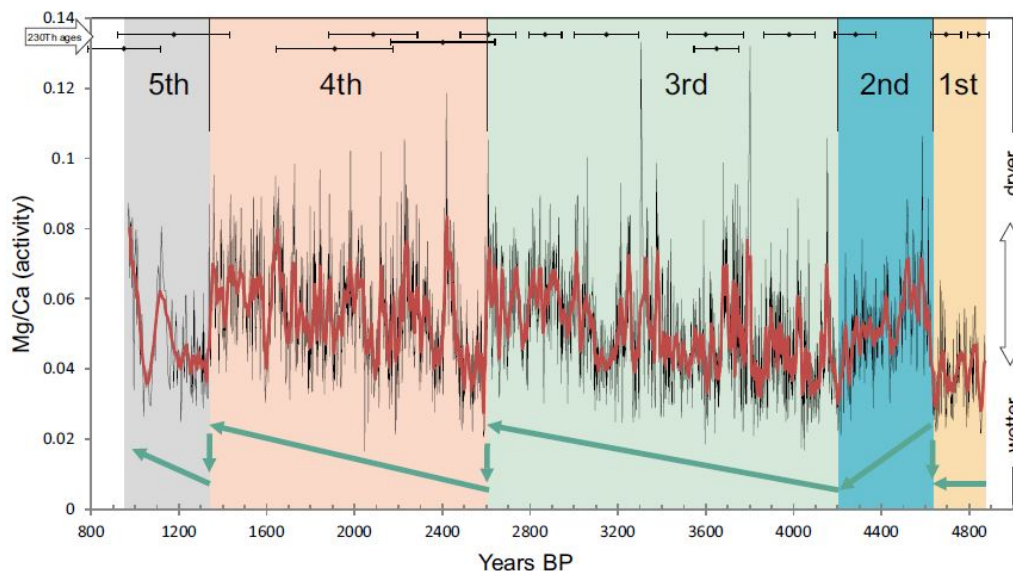


Figura 5.3.3.4: mediciones Mg/Ca a lo largo del eje de crecimiento del espeleotema y que muestran los cambios paleohidrológicos ocurridos.

5.3.4. Conclusiones

LIBS es una técnica analítica prometedora para obtener series largas de datos geoquímicos de series microestratigráficas tales como las contenidas en espeleotemas de carbonato. La técnica proporciona suficiente sensibilidad analítica para los elementos traza más abundantes, y es notablemente rápida y asequible. La estalagmita Buda-100 del Holoceno, recuperada de la Cueva de Kaite (Complejo Ojo Guareña Karst, norte de España), fue analizada por espectroscopia de ablación láser (LIBS) para obtener series de alta resolución basada en 2400 mediciones Mg/Ca y Sr/Ca. La estalagmita muestra variaciones significativas de Mg/Ca, principalmente por los cambios en las precipitaciones.

5.3.5. Agradecimientos

Especial agradecimiento a todos los participantes de esta línea de investigación, J. A. Cruz, M. J. Turrero, J. O. Cáceres, A. I. Ortega, A. Garralón, L. Sánchez, P. Gómez, M. B. Muñoz-García, R. L. Edwards, J. Martín-Chivelet. Esta línea de investigación pertenece a los proyectos CGL2010-21499-BTE y CGL2013-43257-R del Programa Nacional de I+D (MINECO), fruto de la colaboración con el grupo de investigación "Paleoclimatología y

Cambio Global" de la UCM (España). Agradecimientos también a la Junta de Castilla y León (España) por las instalaciones y permisos para acceder y trabajar en el Monumento Natural de Ojo Guareña y la colaboración del Grupo Espeleológico Edelweiss de la Excelentísima Diputación Provincial de Burgos.

5.4 Análisis de imágenes multielementales de megapíxeles mediante LIBS como potencial herramienta en estudios paleoclimáticos

Este trabajo ha sido enviado a Scientific Reports con la siguiente referencia bibliográfica (en revisión):

“Megapixel multi-elemental imaging by Laser-Induced Breakdown Spectroscopy, a technology with considerable potential for paleoclimate studies”. J. O. Cáceres, F. Pelascini, V. Motto-Ros, S. Moncayo, F. Trichard, G. Panczer, A. Marín-Roldán, J.A. Cruz, I. Coronado, J. Martín-Chivelet. (En revisión).

Resumen

Los estudios paleoclimáticos juegan un papel crucial en la comprensión de los climas pasados y futuros y sus impactos ambientales. Las metodologías actuales para realizar análisis elementales altamente sensibles a resoluciones espaciales de micrómetros se limitan al uso de técnicas complejas y/o no aplicables, como la micrografía de fluorescencia de rayos X de radiación de sincrotrón (μ -SRXRF), la espectrometría de masas de iones nanosecundarios (SIMS) o la espectrometría de masas de plasma acoplada inductivamente por ablación con láser (LA-ICP-MS). Además, el análisis de grandes muestras (> pocos cm^2) con cualquiera de estos métodos sigue siendo muy difícil debido a su velocidad de adquisición relativamente baja (≈ 1 -10 Hz), y porque deben ser operados en vacío o en una atmósfera controlada. En este trabajo, se pretende mostrar un nuevo enfoque de obtención de imágenes capaz de realizar investigaciones elementales de rutina en grandes superficies utilizando instrumentación que es totalmente compatible con la microscopía óptica estándar. Esta metodología, basada en espectroscopía de ablación láser (LIBS), ha sido desarrollada para permitir el escaneo multi-elemental rápido de muestras geológicas y tiene un alto rendimiento en términos de sensibilidad (ppm), resolución lateral (hasta 10 Mm) y velocidad

de funcionamiento (100 Hz). Este método se aplicó con éxito para obtener las primeras imágenes megapíxeles de grandes espeleotemas y se obtuvo nueva información no accesible mediante otras técnicas. Estos resultados abren una nueva perspectiva en el uso de la espectroscopía láser en un gran número de aplicaciones geoquímicas en el campo de la ciencia ambiental, aumentando potencialmente la cantidad de información paleoambiental.

5.4.1. Introducción

La reconstrucción de la variabilidad climática del pasado en una serie de escalas temporales o espaciales se ha convertido en una tarea clave en la comprensión del clima actual y futuro. Dado que los datos instrumentales se limitan a las últimas décadas o siglos, las reconstrucciones deben basarse en paleoindicadores climáticos, es decir, las impresiones de variables climáticas en materiales naturales como rocas sedimentarias¹³⁵, fósiles¹³⁶, anillos¹³⁷ o hielo antiguo¹³⁸ que también pueden ser fechadas con resoluciones que se acercan a las escalas anuales o sub-anuales mediante una combinación de métodos radiométricos y microestratigráficos¹³⁹. El registro paleoclimático es enorme y todavía parcialmente explorado, a pesar de los enormes avances de las últimas tres décadas. Debe descifrarse rápidamente para responder a la necesidad científica y social de caracterizar los patrones del cambio climático, los factores forzantes y sus impactos. Esta tarea requiere la búsqueda de nuevas técnicas analíticas con la posibilidad de escanear grandes superficies de muestra (para obtener registros más largos y más continuos del paleoclima) con resolución a escala micrométrica (para poder resolver cambios anuales o estacionales) que combinen un razonable coste con análisis de alta velocidad y preparación simple de la muestra.

En este estudio, se propone la aplicación de una nueva tecnología de imagen, que cumple estos requisitos previos, como una herramienta práctica y útil para la obtención de registros de indicadores paleoclimáticos mediante la composición elemental de muestras geológicas. Se basa en la espectroscopia de ablación láser (LIBS)⁷⁶ y proporciona datos de imagen elemental de alta calidad con características tales como resolución micrométrica, límite de detección a escala ppm y alta velocidad de escaneado (100 píxeles/s). Aunque el análisis LIBS espacialmente resuelto ya ha sido demostrado en la literatura para materiales heterogéneos, como los utilizados en la investigación paleoclimática¹⁴, este trabajo

proporciona la posibilidad de producir imágenes de megapíxeles para muestras grandes. Otros estudios han demostrado la capacidad y el potencial de la formación de imágenes LIBS en diversos campos de aplicación, como la biología¹⁴⁰, la geología³⁷ y la industria¹⁴¹. En todos estos casos, las superficies analizadas tenían típicamente áreas de 1 cm² o menos, y se midieron con una resolución lateral que varía de 10 a 50 μm. Debido a los requerimientos de las reconstrucciones de series de datos paleoclimáticos, la aplicación de esta tecnología, y más generalmente todas las metodologías de imágenes, a estas muestras sigue siendo muy difícil. Los tamaños de muestra grandes imponen la necesidad de una alta velocidad de escaneo (para escanear varios cm² con resolución micrométrica en un tiempo de análisis razonable) y un sistema de auto-enfoque fiable y rápido, así como la capacidad para manejar y analizar grandes cantidades de datos.

Aquí se presenta la posibilidad de realizar imágenes de megapíxeles elementales de grandes muestras geológicas y biológicas. Esta técnica también ofrece características atractivas, tales como la capacidad de detección multi-elemental, una resolución de escala micrométrica, sensibilidad a nivel de ppm y preparación fácil de la muestra, así como una falta de restricciones en la forma o tamaño de las muestras y sin las limitaciones técnicas impuestas por las condiciones de funcionamiento en vacío. Esta tecnología se puede aplicar a esencialmente todo tipo de materiales geológicos y biológicos. Su aplicación se ha demostrado usando espeleotemas, comúnmente utilizados en la reconstrucción de series temporales paleoclimáticas. Estos resultados ofrecen nuevas perspectivas sobre el uso de imágenes LIBS en aplicaciones de ciencias de la Tierra y allanan el camino para numerosas aplicaciones en el campo de la paleoclimatología.

Los espeleotemas se usan comúnmente para la reconstrucción de series paleoclimáticas porque pueden ser datados con exactitud mediante la combinación de técnicas radiométricas y microestratigráficas, y porque pueden producir registros multi-proxy. La mayoría de los paleoindicadores climáticos que se pueden recuperar de estos materiales son geoquímicos, ya que los cambios en el clima o las condiciones ambientales que ocurren durante sus períodos de crecimiento suelen causar pequeñas pero significativas modificaciones en sus composiciones elementales o isotópicas.

Las estalagmitas son minerales secundarios precipitados de aguas de filtración en cuevas. La composición más común de estos depósitos es el carbonato de calcio, y la calcita es la fase mineral más común. Las estalagmitas muestran con frecuencia una delicada estratigrafía interna, que puede consistir en la acumulación vertical de capas de crecimiento anuales. Los cambios en el clima regional determinan las variaciones en la química (y las tasas) de las aguas de goteo y/o en el ambiente de las cuevas, que se registran en las estalagmitas en crecimiento¹⁴².

La tasa de crecimiento anual de estos archivos naturales es bastante variable en el tiempo y en el espacio, y depende de las condiciones fisicoquímicas de la precipitación mineral (por ejemplo, tasas de goteo, sobresaturación de calcita y temperatura), que suele ocurrir a tasas de 0,01 a 2 mm por año¹⁴³. Los cambios en la composición de los elementos traza, como Mg, Sr y Ba, a lo largo de la estalagmita se interpretan comúnmente como cambios en las variables paleoclimáticas, tales como la temperatura o la lluvia. Sin embargo, la importancia paleoclimática de estos elementos depende en gran medida de cada cueva y del contexto climático, y la calibración de los indicadores es una tarea compleja que suele requerir programas de monitoreo de cuevas¹⁴⁴.

5.4.2. Sistema de auto-enfoque

El aspecto más crítico para la obtención de imágenes de estas grandes muestras geológicas se basa en el control preciso del enfoque con láser. Para garantizar ablaciones reproducibles durante toda la exploración de secuencia, es realmente indispensable asegurar una distancia constante entre el objetivo de enfoque y la superficie de la muestra. Para muestras tan grandes (con superficies superiores a $\sim 20 \text{ cm}^2$) es difícil, si no imposible, obtener una superficie suficientemente plana, incluso después de una rigurosa preparación y pulido de la muestra. Por ello, se expone aquí un nuevo tipo de autofocus aplicable en cualquier experimento LIBS, que ha sido desarrollado por el Prof. Vincent Motto-ros, de la Universidad de Lyon. Se basa en la idea básica de medir y controlar la posición vertical de la emisión de plasma a una velocidad alta (Figura 5.4.2.1.a)¹⁴⁵. Para este propósito, el plasma se representa en la entrada de un haz de fibras específico (conector 1 en la Figura 5.4.2.1.a). El sistema óptico utilizado es similar al utilizado para la recolección de luz; la única

diferencia es su ángulo (~55 grados) con respecto al eje vertical. El haz de fibras está constituido por cuatro fibras con un diámetro de núcleo de 200 μm distribuidas simétricamente con respecto al centro del conector (conectores 1 y 2 en la Figura 5.4.2.1.a). La salida del haz de fibras se representa a continuación en una cámara rápida CMOS USB3. Esta cámara es activada por la señal de salida del diodo láser y puede proporcionar típicamente 120 fotogramas/segundo para una región de interés de 640 x 480 píxeles. Un algoritmo rápido, desarrollado en el entorno LabVIEW, extrae la intensidad global recogida por cada una de las cuatro fibras en tiempo real y calcula la siguiente señal de error:

$$\delta_z = \frac{(I_A + I_B) - (I_C + I_D)}{(I_A + I_B) + (I_C + I_D)}$$

donde I_A e I_B representan la intensidad total recogida en las dos fibras superiores, e I_C e I_D representan aquella capturada en las dos fibras inferiores (Figura 5.4.2.1.a). Esta señal de error es positiva si la superficie de la muestra (y por lo tanto el plasma) es alta con respecto a la posición de referencia y negativa en el otro caso (Figura 5.4.2.1.b). Esta señal se utiliza entonces en un sistema proporcional e integral (PI) que proporciona el punto de consigna a la etapa motorizada en z.

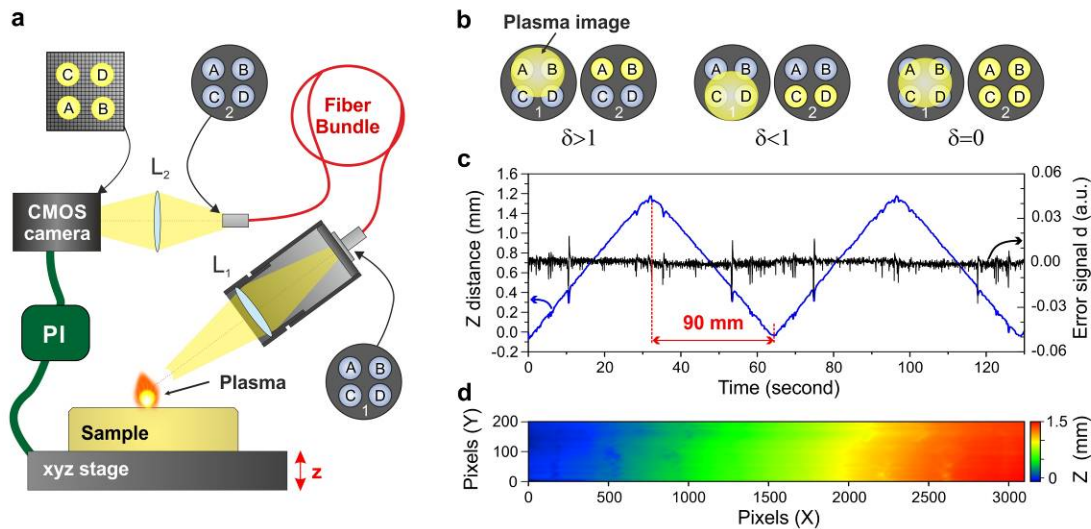


Figura 5.4.2.1: (a) Vista esquemática del sistema de enfoque automático (PI: Servo de bloqueo integral proporcional) b) Principio del sistema de autofocus y su influencia en la señal de error δ . (c) Posición vertical de la muestra (azul) y la señal de error asociada (negro) para una exploración de 90 mm de la muestra medida hacia delante y hacia atrás dos veces. (d) Muestra de imagen residual que muestra la morfología de la superficie y la planaridad de la muestra durante una exploración de 100x200 (resolución de 15 μm).

La ventaja decisiva de este sistema de enfoque automático se basa en su alta velocidad de funcionamiento. En la configuración propuesta, este sistema funciona a 100 Hz y puede seguir cada disparo láser, aunque la corrección se aplica a la toma de láser anterior en este concepto de autofocus. Además, en comparación con los sistemas convencionales de autofocus que utilizan imágenes ópticas (que implican punteros o sistemas de auto-enfoque de imágenes de contraste), este sistema tiene una velocidad mucho mayor y una mayor fiabilidad porque no depende de las propiedades de la muestra (color, transparencia, etc.). Por último, se debe mencionar que la velocidad de autofocus podría todavía ser mejorada en gran medida usando una configuración que incluya un fotodiodo de cuadrante y un bloqueo PI analógico, así como un sistema piezoeléctrico.

5.4.3. Procedimiento experimental

La configuración instrumental utilizada en este experimento es la explicada en el Capítulo 4, perteneciente al Instituto Lumière Matière.

5.4.4. Construcción de las imágenes

Se ha desarrollado un tratamiento de espectro avanzado para realizar una extracción de intensidad rápida para cada sitio de medición y para cada especie de interés. Se selecciona una única línea de emisión para cada elemento de interés y el algoritmo define un ajuste de línea de base utilizando una función polinómica y lo resta de la señal de emisión. Las líneas de emisión se seleccionan sobre la base de dos criterios: se requiere que cada línea seleccionada sea la línea más fuerte de cada elemento en el intervalo analizado, y que no se vea afectada por ninguna interferencia posible de otras líneas.

Con este software, una imagen típica de ~3 millones de espectros se procesó en menos de 5 minutos. Se proporcionó una matriz bidimensional que contenía la intensidad de línea seleccionada desde un punto de la superficie de la muestra para cada elemento y se podía visualizar usando una escala de falsos colores para presentar un resultado visual en forma de imágenes elementales. Todas las imágenes fueron procesadas usando el software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, www.nih.gov). Las imágenes fueron ligeramente suavizadas (usando un suavizado gaussiano de 0,5 píxeles) y convertidas de imágenes de 16 bits a 8 bits.

Obsérvese que todas las imágenes de Mg, Sr y Na presentadas han sido normalizadas con Ca.

5.4.5. Resultados

Como se mencionó anteriormente, la aplicación de la espectroscopía de ablación láser (LIBS) para generar imágenes de megapíxeles de espeleotemas se centra en determinar la distribución de múltiples elementos directamente de grandes secciones longitudinales con alta resolución espacial. Para este propósito, se enfocaron impulsos láser infrarrojo de nanosegundos (1064 nm) con una frecuencia de repetición de 100 Hz, utilizando un objetivo de microscopio de aumento de 15x para inducir la ablación del material (Figura 5.4.5.1.a). Se utilizó una energía de impulso típica de 900 μJ . Bajo estas condiciones, la resolución mínima accesible fue de aproximadamente 10 μm , valor estimado a partir del tamaño de los cráteres de ablación que se desarrollaron sobre el carbonato de calcio. La radiación luminosa emitida por el plasma fue recogida por dos sistemas de detección óptica, cada uno conectado a un espectrómetro Czerny-Turner a través de un haz de fibra óptica. Cada espectrómetro estaba equipado con una cámara de dispositivo de carga acoplada intensificada (ICCD). El uso de dos espectrómetros que sondan diferentes rangos espectrales fue necesario para detectar simultáneamente todos los elementos de interés (Figura 5.4.5.1.b). Se han analizado principalmente tres elementos: el magnesio (Mg), el estroncio (Sr) y el calcio (Ca), aunque otros elementos, incluyendo sodio (Na), carbono (C), silicio (Si), hierro (Fe), aluminio (Al) y manganeso (Mn) también han sido observados. El plasma inducido por láser se generó de forma continua al escanear la superficie de la muestra sobre la región de interés. El escaneo superficial se realizó línea por línea mediante un posicionador x-y-z controlado por ordenador. Se registró un espectro de emisión para cada posición de muestreo. El recorrido de la platina motorizada X era de 100 mm, mientras que el recorrido de las etapas Y y Z era de 50 mm. Los rangos X e Y imponen un límite en el área superficial máxima que puede analizarse en un escaneado (es decir, 50 cm^2). La resolución espacial se puede ajustar cambiando la velocidad de la etapa X en un rango de unos pocos μm a 100 μm . Un software en el entorno LabVIEW controlaba todos los componentes del sistema y permite establecer secuencias automatizadas para escanear regiones de interés con la resolución especificada.

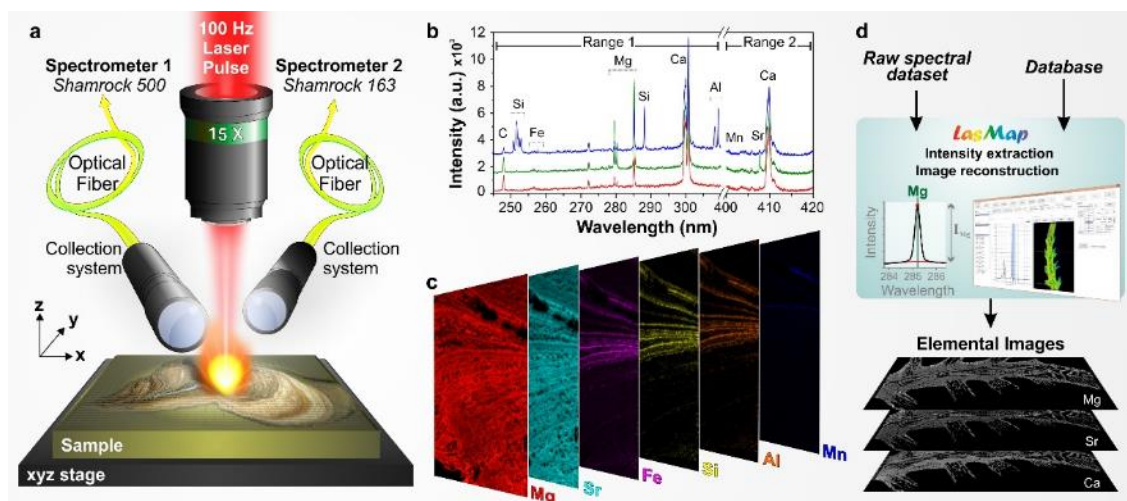


Figura 5.4.5.1: (a) Vista esquemática del instrumento LIBS que muestra los componentes principales: el objetivo del microscopio utilizado para enfocar el pulso láser, la plataforma motorizada que soporta la muestra y los dos sistemas de detección óptica conectados a diferentes espectrómetros a través de haces de fibra óptica. (b) Espectros de emisión de una sola muestra que cubren rangos espectrales entre 245 y 310 nm (espectrómetro 1) y entre 400 y 420 nm (espectrómetro 2) registrados en tres regiones diferentes de la muestra de espeleotema. Estos 3 espectros se han desplazado verticalmente para una mejor claridad. Se detectan claramente las líneas características de emisión de calcio (Ca), carbono (C), silicio (Si), hierro (Fe), magnesio (Mg), aluminio (Al), manganeso (Mn) y estroncio (Sr). (c) Imágenes de abundancia relativa de Mg (rojo), Sr (cian), Fe (violeta), Si (amarillo), Al (naranja) y Mn (azul) representadas mediante escalas de color falsas para una secuencia de 3000x1000 píxeles (resolución de 15 μm). (d) Principio de análisis de datos utilizando el software LasMap.

Una vez finalizada la exploración en 2D, se seleccionaron las líneas de emisión para cada elemento. Su abundancia relativa puede obtenerse y mostrarse en imágenes de color falso, en las que se asigna un color arbitrario a cada elemento (Figura 5.4.5.1.c). En el presente manuscrito, un resultado de imagen típico representa aproximadamente 3 millones de píxeles y una cantidad de datos de aproximadamente 50 GB (~25 GB / espectrómetro). Con una frecuencia de 100 Hz, la duración de un análisis es de aproximadamente 8 horas (360 000 píxeles / hora). Se ha desarrollado software para manejar la gran cantidad de datos recolectados y extraer imágenes elementales de los conjuntos de espectros (Figura 5.4.5.1.d). Este software incluye diferentes bases de datos atómicas y moleculares que permiten la rápida identificación de las líneas de emisión observadas en el espectro. Después de identificación de líneas, el software extrae las intensidades correspondientes por espectro para crear las imágenes elementales asociadas con cada elemento. Esta operación requiere menos de 7 minutos para un conjunto de datos 3 megapíxeles. Para adecuar las metodologías estándar usadas generalmente en los estudios paleoclimáticos, se normalizó la señal obtenida para los

elementos de interés (Mg y Sr), píxel por píxel, por la señal de Ca. Aunque el análisis cuantitativo no era necesario, los límites de detección de Mg y Sr se estimaron en, respectivamente, 5 ppm y 7 ppm para el análisis de una sola toma con una muestra de referencia de carbonato de calcio realizada en el laboratorio.

La formación de imágenes LIBS de megapíxeles se aplicó a una sección longitudinal de la estalagmita SLX-2B. La estalagmita, de aproximadamente 25 cm de longitud, está formada por calcita translúcida, columnar o microcristalina¹⁴⁶, y su micraestratigrafía está definida por bandas de crecimiento anual de escala sub-milimétrica y por un hiato prominente no-deposicional en su parte media (Fig. 5.4.5.2).

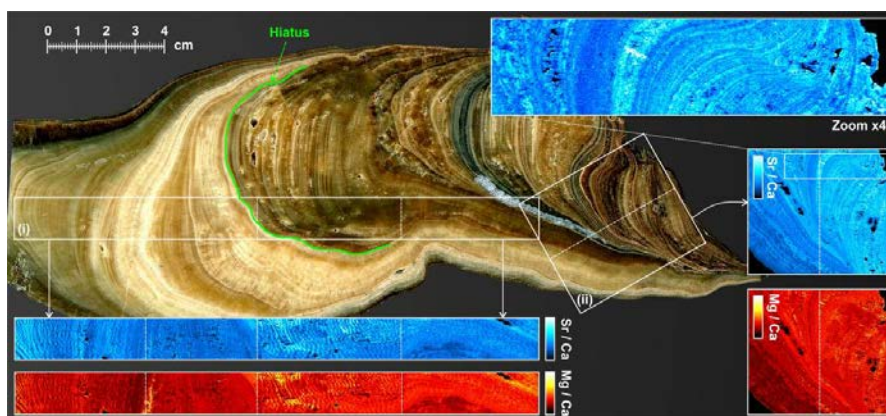


Figura 5.4.5.2: Medida (i): imágenes de resolución de 15 μm de Sr (azul) y Mg (rojo) ensambladas a partir de 4 secuencias sucesivas (mostradas por líneas de puntos). La longitud total escaneada corresponde a más de 16 cm, y la superficie analizada a $\sim 24 \text{ cm}^2$. Este análisis representa aproximadamente 12 000 000 mediciones individuales (es decir, píxeles). Medida (ii): Imágenes de resolución de 15 μm de Sr y Mg para una superficie de muestra de $\sim 5 \times 4 \text{ cm}$. Este análisis representa más de 9 000 000 píxeles. También se muestra un factor de cuatro de zoom para el Sr. Todas las imágenes de Sr y Mg han sido normalizadas por Ca. La línea verde indica una superficie hiatal importante, que representa una brecha de tiempo en el crecimiento de la calcita durante el desarrollo del espeleotema.

Se obtuvieron dos imágenes LIBS diferentes de esta muestra. El primer análisis se realizó sobre el eje longitudinal del espeleotema (Figura 5.4.5.2.i) con una resolución de 15 μm . Este análisis cubrió una distancia de aproximadamente 16 cm x 1,5 cm, lo que representa una superficie de $\sim 24 \text{ cm}^2$ y un número total de píxeles de más de 12 millones. Debido al limitado recorrido del motor (10 cm), este análisis se llevó a cabo utilizando 4 exploraciones consecutivas de ~ 3 megapíxeles cada uno. Estos diferentes escaneos fueron ensamblados juntos después. El segundo experimento se realizó en el núcleo del espeleotema (Figura 5.4.5.2.ii) y representó una superficie analizada de aproximadamente 20 cm^2 ($\sim 5 \text{ cm} \times 4 \text{ cm}$), con aproximadamente 9 millones de disparos láser individuales. Se requerían dos

exploraciones consecutivas en este caso debido a las limitaciones técnicas impuestas por el rendimiento de los ordenadores utilizados, ya que sólo pueden registrar 5 millones de espectros en una sola exploración. Para ambos análisis, las imágenes de Mg/Ca y Sr/Ca se muestran en la Figura 5.4.5.2. La ampliación de la región de la muestra ii) por un factor de cuatro, muestra claramente las capas de crecimiento anual.

Estas imágenes ilustran las capacidades de resolución del método de formación de imágenes LIBS, y muestran la distribución espacial de elementos traza sobre grandes superficies a escala de micrómetro. Los cambios de composición en Mg y Sr siguen los patrones de la estratigrafía del espeleotema, un aspecto clave para mostrar que las variaciones de composición no son aleatorias, sino que están determinadas por cambios temporales en las condiciones hidrogeoquímicas durante el crecimiento de las estalagmitas. Por otra parte, las anomalías de la composición en comparación con los patrones estratigráficos generales podrían estar relacionadas con las superposiciones geoquímicas post-deposicionales causadas por procesos diagenéticos como la recristalización, cuya identificación y eliminación podrían ser esenciales al buscar la composición química original prístina de la estalagmita. Las áreas no alteradas del espeleotema son ideales para la extracción de indicadores paleoclimáticos y la datación por uranio.

Sin embargo, los estudios paleoclimáticos se centran comúnmente en la construcción de series temporales de alta resolución, es decir, variaciones en un indicador a través del tiempo. Estas series de datos 1-D se pueden extraer fácilmente de imágenes LIBS, que permiten elegir los tramos más favorables, generalmente los que siguen el eje de crecimiento. La Figura 5.4.5.3 muestra los cambios relativos de las relaciones Mg/Ca y Sr/Ca (expresados en %) a lo largo del perfil axial seleccionado, incluyendo fluctuaciones de alta frecuencia (correspondientes a cambios estacionales e interanuales), así como patrones de largo plazo con posible significado climático. Obsérvese la presencia de una disrupción mayor en la serie 1-D de las relaciones Mg/Ca y Sr/Ca, que coinciden con el hiato no-deposicional. Esa superficie estratigráfica separa un área de mayor contenido de Mg y Sr y mayor variabilidad (debajo del hiato) de otra área caracterizada por menores valores de ambos elementos y una dispersión mucho menor en los cambios a corto y mediano plazo.

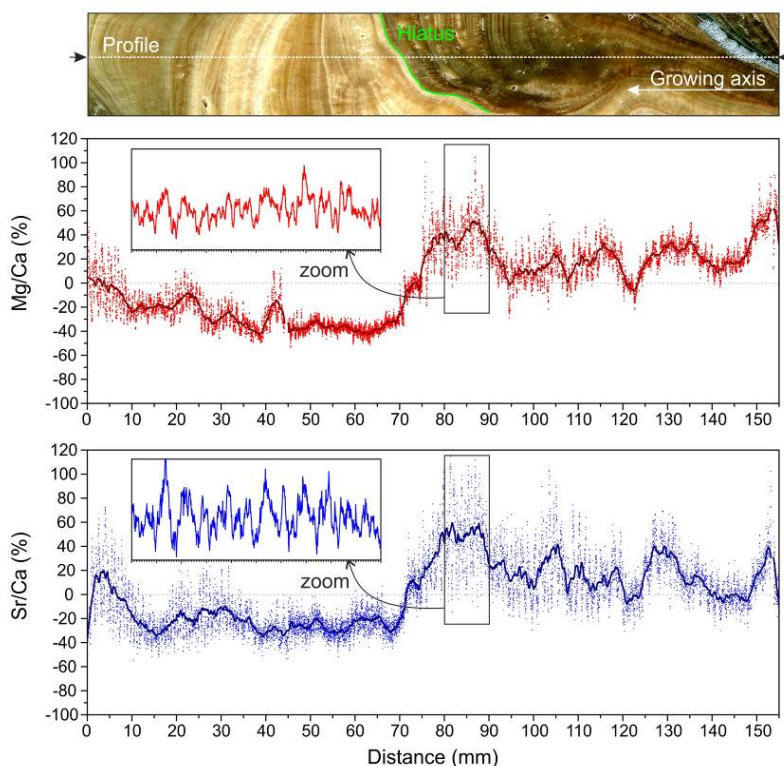


Figura 5.4.5.3: Series de datos 1-D que muestran las variaciones relativas de las relaciones Sr/Ca y Mg/Ca (expresadas en %) a lo largo del eje de crecimiento del espeleotema a través del perfil axial seleccionado (indicado por la línea de puntos). Un hiato no-deposicional produce una interrupción importante en la serie 1-D de las relaciones Mg/Ca y Sr/Ca, que se muestra en las ventanas de zoom.

5.4.6. Comparación con otras técnicas analíticas

Varios métodos micro-analíticos de imagen han sido utilizados previamente para analizar la distribución espacial de elementos menores y traza en espeleotemas. Estos métodos incluyen la emisión óptica de plasma acoplada inductivamente a la ablación por láser (LA-ICP-OES), la espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (LA-ICP-MS), la micro-espectrometría de fluorescencia de rayos X de (μ -XRF), el análisis de microscopía electrónica (EPMA), la emisión de rayos X inducida por protones (PIXE), la espectrometría de masas de ionización secundaria (SIMS), y las técnicas de microscopía de rayos X de sincrotrón⁶. Algunas de estas técnicas tienen un alto rendimiento tanto en términos de resolución como de límites de detección (SIMS, μ -XRF). Otros tienen alta resolución espacial pero menor sensibilidad (EPMA), mientras que otros tienen mejores límites de detección, pero peor resolución (técnicas basadas en LA-ICP). Sin embargo, todos están

típicamente limitadas a tamaños de muestra pequeños ($\sim \text{cm}^2$) y también requieren la preparación de las muestras. Estas tecnologías también son generalmente limitadas en términos de su tasa de adquisición ($\sim 1 - 10 \text{ Hz/píxel}$). El equipo requerido para las técnicas más poderosas ($\mu\text{-XRF}$ y microscopía de rayos X de sincrotrón) se encuentra en las instalaciones de sincrotrón, restringiendo su uso.

Varias de estas desventajas son superadas por la formación de imágenes LIBS, que permite el análisis de grandes muestras ($> 50 \text{ cm}^2$) mientras se opera en atmósfera ambiente. Más importante aún, esta tecnología no tiene limitaciones intrínsecas en términos de velocidad de análisis, que sólo se rige por la tasa de repetición del láser y las velocidades de adquisición del detector. Ya se han demostrado tasas de adquisición del orden de 1 kHz ¹⁴⁷. Estas ventajas dan a la imagen LIBS capacidades únicas en el escaneado de grandes superficies de muestras. Además, la compatibilidad total de la instrumentación LIBS con la microscopía óptica y su facilidad de uso, ponen de manifiesto que esta técnica tiene un alto potencial de crecimiento y conlleva la posibilidad de proporcionar información adicional en un futuro próximo. También es sencillo aplicar estas técnicas de imagen en los laboratorios de investigación.

5.4.7. Conclusiones

La tecnología de imágenes de LIBS parece muy atractiva en el campo de las ciencias de la Tierra y en particular para los estudios paleoclimáticos, ya que permite que las variaciones en los indicadores climáticos se caractericen a gran escala, cubriendo varios siglos y proporcionando información climática que revela cambios estacionales. Sin embargo, la gran cantidad de información que puede recopilar la imagen LIBS debe ajustarse a los requisitos estándar de los estudios paleoclimáticos, en particular la necesidad de proporcionar series temporales (es decir, variaciones en los diferentes indicadores a través del tiempo). Para estudiar las variaciones locales en paleoindicadores (elementos traza y composiciones isotópicas) a escalas de varios mm^2 en espeleotemas⁷, se han aplicado técnicas de imagen microanalítica. Así, la obtención de imágenes LIBS de grandes áreas con alta resolución espacial ofrece, por primera vez, información de composición y tejido que podría traducirse a características paleoclimáticas.

La formación de imágenes LIBS de megapíxeles surge como una poderosa técnica analítica en el estudio de las variaciones de elementos traza a micro y macroescala en muestras de espeleotemas, y en la definición de los límites de viabilidad de elementos traza como indicadores paleoclimáticos. Los datos obtenidos permitirán profundizar en los procesos que controlan la precipitación, así como los factores que controlan la variabilidad espacio-temporal de los elementos traza en muestras grandes de espeleotemas. La caracterización de alta resolución de esta variabilidad y su comprensión son tareas clave en estudios del paleoclima y reconstrucciones paleoambientales. La imagen LIBS representa un gran paso adelante, y este trabajo sienta las bases para la futura investigación paleoclimática en estos y otros archivos naturales comunes. La técnica abre grandes oportunidades para generar nuevos registros paleoclimáticos de alta resolución de muestras de una amplia gama de edades y procedencias. El trabajo futuro debe tener como objetivo mejorar y estandarizar la técnica para que pueda ser incorporado en laboratorios paleoclimáticos y proyectos de investigación. Dicha incorporación podría contribuir a:

- 1) obtener mejores registros multi-indicadores del paleoclima resultante de la integración de diferentes datos químicos;
- 2) una mejor comprensión de los patrones de crecimiento de los espeleotemas;
- 3) identificación de sobreimpresiones diagenéticas o áreas alteradas en las muestras (mejorando así las estrategias de muestreo para otros estudios, como la geoquímica isotópica).

5.4.8. Agradecimientos

Especial agradecimiento a todos los autores del artículo, J. O. Cáceres, F. Pelascini, V. Motto-Ros, S. Moncayo, F. Trichard, G. Panczer, J.A. Cruz, I. Coronado, J. Martín-Chivelet. Agradecimientos por el apoyo del programa español de I+D+i (MINECO) y del Lyon Science Transfert, de la Alsace Région y del Feder (fondos de la Comunidad Europea).

Capítulo 6: Análisis arqueológico mediante LIBS

Este capítulo está compuesto por diversos estudios basados en LIBS para alcanzar el objetivo final de realizar análisis de muestras de tejido de origen antropológico y arqueológico, tanto tejido blando como óseo. Así, esta línea de investigación comenzó con el desarrollo de una metodología para el estudio de tejido blando muscular para la determinación del intervalo *post mortem*. Esto llevó a querer conocer en profundidad las características de la técnica en cuanto a dinámica del plasma, utilizando las muestras anteriores, para así optimizar los análisis de tejidos posteriores. Una vez concluido este proceso se procedió al estudio de tejido óseo, primero para estudios de estacionalidad, y después, para realizar la correcta asignación de restos óseos al individuo al que pertenecen, en una primera fase con muestras actuales y después, muestras de carácter arqueológico.

6.1. Determinación del intervalo post-mortem en tejido muscular

Este trabajo ha sido publicado en *Spectrochimica Acta Part B* con la siguiente referencia bibliográfica:

“Determination of the post mortem interval by Laser Induced Breakdown Spectroscopy using swine skeletal muscles”. A. Marín-Roldan, S. Manzoor, S. Moncayo, F. Navarro-Villoslada, R.C. Izquierdo-Hornillos, J.O. Cáceres. 88 (2013) 186-191.

Resumen

Las muestras de piel y músculo son útiles para discriminar a individuos, así como su intervalo *post mortem* (PMI) en escenas de delito y desastres naturales o causados. En este estudio se ha desarrollado un método simple y rápido basado en la espectroscopía de ablación láser (LIBS) para estimar las condiciones meteorológicas esqueléticas del PMI (humedad,

temperatura, fauna, etc.) que tienen una fuerte influencia en la determinación del PMI. Se observaron cambios dependientes del tiempo en la relación de intensidad de emisión para Mg, Na, Ha y K, como resultado de las variaciones en su concentración debido a reacciones químicas en tejidos y se correlacionaron con PMI. Esta relación, que no ha sido reportada previamente en la literatura forense, ofrece un medio simple y potencialmente valioso para estimar el PMI.

6.1.1. Introducción al intervalo post-mortem (PMI)

El intervalo post mortem (PMI) se refiere al tiempo transcurrido desde la muerte, y su estimación es extremadamente importante en las investigaciones criminales, civiles y forenses. La descomposición post mortem comienza inmediatamente después de la muerte, implicando la ruptura de los tejidos blandos debido a los procesos de autólisis y putrefacción, y a menudo con actividad de insectos. Un evento de muerte es seguido por una serie de reacciones químicas complicadas que siguen ocurriendo dentro de las células, y causan cambios específicos dependientes del tiempo en el metabolismo y las estructuras subcelulares, lo que permite determinar el PMI. Se han empleado muchos métodos para determinar con precisión el PMI, también conocido como tiempo de muerte (TOD), pero la exactitud de estos métodos todavía deja una incertidumbre de tiempo alta y necesita mejoras. Desde el punto de vista entomológico, dado que el crecimiento y desarrollo de los insectos están fuertemente influenciados por las condiciones geográficas, topológicas y ambientales, la dificultad de contabilizar las condiciones en la escena previa al descubrimiento induce cierta incertidumbre en la aplicación. Esta variabilidad en las condiciones ambientales hizo un fundamento bien caracterizado de información viable difícil de alcanzar. En realidad, los métodos de estimación del PMI incluyen medidas de la temperatura corporal y post mortem cambios químicos en el cuerpo. Además, algunos métodos se han centrado también en la degradación de los ácidos nucleicos, incluyendo el ADN y el ARN y las proteínas dentro de diferentes tejidos. Sin embargo, estos métodos requieren personal especializado y laboratorios, y en algunos casos, complicados y costosos procedimientos de análisis.

Se ha establecido una relación significativa entre la proporción de post mortem de sodio y la variación de la concentración de potasio con PMI en suero de rata *wistar* y la

sangre humana muestras. Sin embargo, los autores mostraron que los factores ambientales internos y externos, así como la causa de la muerte afectan significativamente la predicción del PMI debido a los cambios rápidos de esta relación en las muestras de suero y plasma (0-12 h). Por otro lado, la variabilidad biológica individual también limita la utilidad de la predicción del PMI basada en estas mediciones de la relación. Idealmente, la concentración de los constituyentes en cualquier intervalo post mortem dado debe mostrar una variación biológica individual mínima y debe ser independiente de las condiciones ambientales.

La espectroscopía de ablación láser (LIBS) ha sido un tema de investigación para las últimas décadas debido a sus características únicas y una amplia variedad de aplicaciones en diversos campos. En los últimos años, LIBS se ha convertido en una poderosa herramienta analítica debido a su capacidad para llevar a cabo un rápido análisis cualitativo y cuantitativo de diferentes muestras, LIBS analiza una muestra mediante una emisión directa de la emisión atómica de los elementos del plasma inducido por láser generado por la ablación de la muestra, proporcionando una huella digital inmediata que es representativa de su composición elemental. Además, la técnica requiere poca o ninguna preparación de muestras, opuesto a los métodos bioquímicos.

La distribución espacial de la densidad de energía volumétrica generada por la irradiación láser impulsa todos los procesos de ablación láser pulsado. En el caso de la interacción láser-tejido, esta distribución es controlada por la exposición radiante incidente y la absorción óptica y las propiedades de dispersión del tejido. Una descripción detallada de la interacción láser-tejido ha sido el tema de muchas revisiones (*reviews*) que discuten aspectos generales de este proceso. Los procesos específicos de ablación láser resultantes de la absorción no lineal también se han considerado.

Este artículo se centra en el desarrollo de un método analítico simple, rápido y directo para la determinación del PMI basado en LIBS. Los músculos de los cerdos son elegidos para producir una descomposición fisiológica similar a la de los tejidos musculares humanos. Se han considerado diferentes condiciones ambientales (humedad, temperatura, fauna, etc.) que tienen una fuerte influencia sobre la determinación del PMI.

6.1.2. Materiales y métodos

Preparación de las muestras

El estudio se realizó con las muestras de músculo esquelético de dos cerdos obtenidos de un matadero industrial con licencia, con todos los certificados necesarios, de conformidad con el requisito formal de la Unión Europea. los cerdos no fueron sacrificados sólo con el propósito de llevar a cabo este experimento, sino que fueron seleccionados al azar de la población muerta para el propósito de consumo diario, Ambos cerdos fueron traídos de condiciones similares de alimentación y crecimiento. se almacenaron muestras duplicadas de músculo esquelético (500-600 g) de cada cerdo en tres condiciones experimentales diferentes: 1) en un recipiente de plástico cerrado, 2) al aire libre cubierto de una malla metálica, 3) al aire libre sin cubrir, manteniéndose todas ellas en el mismo lugar a temperatura ambiente y protegido de la lluvia. De cada muestra se midieron tres sub-muestras a 0, 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28 y 35 días, donde cero se refiere al día en que los cerdos fueron sacrificados. Para asegurar la homogeneidad de la muestra, los tejidos fueron liofilizados. Se trituraron 250 mg de tejido con un mortero de ágata y un mazo durante 5 minutos y posteriormente se comprimieron en un gránulo compacto utilizando una prensa hidráulica de 10 t/cm². El espesor y el diámetro de los gránulos eran de aproximadamente 2 mm y 12 mm, respectivamente. Los gránulos se analizaron directamente sin preparación adicional.

Instrumentación empleada

La configuración LIBS y la metodología utilizada en el presente trabajo ya se ha descrito en el Capítulo 4 de la presente tesis. Por lo tanto, sólo describimos las condiciones experimentales relevantes para el estudio presentado aquí. La fluencia del láser se fijó 20 J/cm² y la tasa de repetición fue de 1 Hz. Se registraron 2048 espectros para cada muestra. El tiempo de integración del detector se ajustó a 1 ms. Para evitar la detección de *bremsstrahlung*, se activó el detector con un tiempo de retardo de 5 μ s entre el pulso láser y la radiación plasmática adquirida utilizando un generador de retardo digital (modelo Stanford DG535).

Medidas LIBS

Todas las muestras se analizaron a temperatura ambiente y presión atmosférica. Cada espectro se realizó mediante la adquisición de un promedio de 20 pulsos individuales. Posteriormente, la muestra se movía 1 mm, para incidir el haz láser en una posición fresca de la superficie, evitando así las áreas alteradas por los disparos anteriores. Se obtuvieron cinco espectros LIBS para cada pastilla. El tiempo de adquisición total fue inferior a 2 min, teniendo en cuenta el tiempo de integración del espectrómetro y la repetición del pulso láser.

Análisis de los datos

Bajo condiciones de equilibrio termodinámico local (LTE), la intensidad de una línea espectral de emisión atómica puede describirse como⁷⁶:

$$I = \frac{hcg_k A_{ki} N}{4\pi\lambda Z} \exp\left(-\frac{E_k}{kT}\right) \quad \text{Ecuación 6.1.2.1}$$

donde h es la constante de Planck, c la velocidad de la luz, g_k la degeneración de un estado de energía dado, A_{ki} la probabilidad de transición (coeficiente Einstein), N la población total de la especie, λ la longitud de onda de emisión, Z el peso estadístico del estado fundamental, E_k la energía del estado superior, k la constante de Boltzmann y T la temperatura del plasma.

Para una línea espectral específica, la intensidad de emisión (I) sólo se relaciona con T y N , pues el resto de parámetros son conocidos. Si se supone que no existe una variación significativa de T a lo largo de las mediciones experimentales, puede establecerse N^{148} . Sin embargo, aunque todos los parámetros experimentales permanecen constantes, la temperatura del plasma podría variar debido a otros factores, como el potencial de ionización de los elementos (dependiente de la matriz). Por lo tanto, la temperatura del plasma depende tanto de la composición de la muestra como de la población de la especie¹⁴⁹.

Desde el punto de vista instrumental, la temperatura del plasma puede fijarse a un valor constante controlando la energía de los pulsos láser. Una manera de comprobar la temperatura del plasma es mediante el monitoreo en tiempo real de la relación de dos líneas espectrales atómicas durante el experimento LIBS (gráfico de Boltzmann)¹⁵⁰. Ninguna variación significativa de la temperatura del plasma durante las mediciones experimentales

permite establecer una relación más precisa entre la intensidad de emisión de las líneas espectrales y la respuesta analítica (PMI). En este trabajo se monitorizó la temperatura del plasma mediante la relación de intensidad de emisión de dos líneas espectrales de potasio, a 766,5 y 769,9 nm, respectivamente ($I_{K766.5} / I_{K769.9}$), tal y como se muestra en la Figura 6.1.2.1:

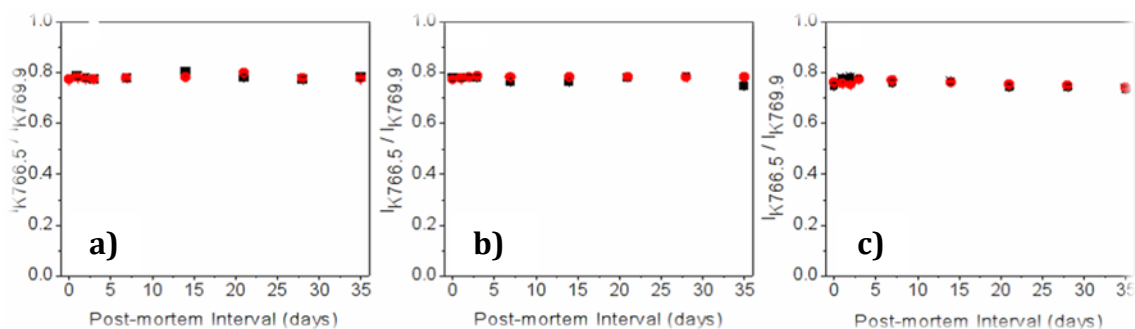


Figura 6.1.2.1: monitoreo de la temperatura del plasma mediante la relación de intensidades entre dos líneas de potasio.

6.1.3. Resultados

Los experimentos LIBS se realizaron para muestras de músculo esquelético de dos cerdos, almacenadas en tres condiciones experimentales diferentes. La Figura 6.1.3.1 muestra un espectro LIBS típico de una muestra de músculo esquelético de cerdo almacenada al aire libre. Se observa un perfil espectral similar para todas las muestras de tejido almacenadas en las tres diferentes condiciones experimentales ensayadas. Basado en la base de datos atómica del NIST¹⁵¹, las líneas de emisión de los principales elementos identificados en las muestras de tejido son C I (247.8 nm), Mg II (280.3 nm), Na I (588.9 nm), Na (589.6 nm), H_{α} (656.3 nm) K I (766,5 nm) y K I (769,9 nm). Na I y K I fueron los principales elementos observados en todas las muestras. Por otra parte, debido a que las muestras se midieron en condiciones ambientales, se observaron también señales de emisión de aire en los espectros LIBS. Sin embargo, como se ha demostrado, estas señales no interfieren significativamente con la contribución espectral relativa de los elementos traza presentes en las muestras¹⁵². Además, se observó también una señal de emisión de fondo continuo como un componente típico del espectro LIBS.

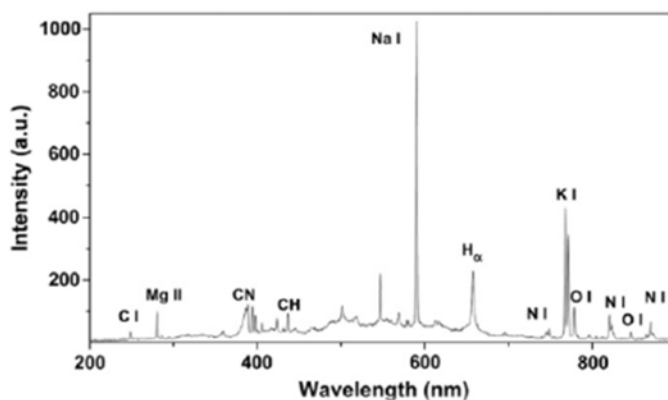


Figura 6.1.3.1: Espectro típico LIBS de una muestra de músculo esquelético almacenada en aire, liofilizada y compactada en pastillas.

La poca variación de la temperatura del plasma se verificó utilizando las dos líneas espectrales de K I. La Figura 6.1.2.1 muestra la relación de intensidad de emisión dependiente del tiempo (PMI) de las dos líneas espectrales ($I_{K766.5nm} / I_{K769.9nm}$) para las tres condiciones experimentales estudiadas. La hipótesis de que la pendiente de la línea de regresión es cero se demuestra mediante el siguiente cálculo¹⁵³:

$$t = \frac{|b-0|}{s_b} \quad \text{Ecuación 6.1.3.1}$$

Donde t es el valor calculado, b es la pendiente y s_b su desviación estándar. No se observan variaciones significativas de la temperatura del plasma en ningún caso. Por lo tanto, las variaciones de la intensidad de emisión de los elementos en las muestras de tejido se pueden atribuir solamente a los cambios de concentración elemental debido a las reacciones químicas que tienen lugar en el proceso de putrefacción a lo largo del tiempo *post mortem*, permitiendo la estimación PMI. Además, una temperatura constante del plasma puede minimizar el efecto matriz, proporcionando resultados más precisos.

La determinación del PMI se basó en la variación de intensidad dependiente del tiempo de los elementos principales observados en el espectro LIBS. En este caso, cuatro elementos mostraron una señal de intensidad de emisión significativa en las muestras de tejido, es decir, Mg (280,3 nm), H α (656,3 nm), Na (588,9 nm, 589,6 nm) y K (766,5 nm, 769,9 nm). No se observó ninguna variación significativa para la línea de emisión del C (247,9 nm) con el PMI. Por lo tanto, con el fin de correlacionar la intensidad de emisión con la población de elementos en las muestras, las señales de estos elementos principales se

normalizaron con respecto a la intensidad de la línea de este elemento, denotado en lo sucesivo como $I_{C247.9nm}$.

Las Figuras 6.1.3.2-6.1.3.5 muestran los cambios temporales de la intensidad de emisión de los elementos H_{α} , Na, Mg y K con el PMI, respectivamente. Cuatro tipos diferentes de cambios metabólicos después de la muerte se observaron basándose en las variaciones de señal de estos elementos: hacia arriba, hacia abajo, una combinación ascendente-descendente (o viceversa) y poca o ninguna variación. Estos resultados indicaron que el proceso de descomposición de la muestra depende de las condiciones de almacenamiento, incluso cuando las muestras se mantienen a la misma temperatura.

La Figura 6.1.3.2 muestra la variación de la intensidad de emisión del hidrógeno durante el proceso de descomposición de ambas muestras de cerdos en las tres condiciones experimentales. La variación de la señal de este elemento mostró una correlación significativa con el PMI a partir del quinto día. Sin embargo, su tendencia fue diferente dependiendo de las condiciones experimentales donde las muestras de tejido se almacenaron. Por lo tanto, la señal de intensidad de emisión disminuyó linealmente con el tiempo *post mortem* cuando las muestras fueron almacenadas en un contenedor abierto (Figura 6.1.3.2.a, b), mientras que se observó una tendencia no lineal y opuesta para las muestras almacenadas en el contenedor cerrado (Figura 6.1.3.2.c). Esta tendencia ascendente no lineal podría deberse al acceso limitado del aire a las muestras y/o al amortiguamiento de la actividad metabólica de los insectos. Muchos estudios han mostrado que el H_{α} es un elemento importante para clasificar diferentes compuestos orgánicos¹⁵⁴. Por lo tanto, debido a la composición orgánica de los tejidos esqueléticos, el H_{α} se puede utilizar como un indicador de los cambios químicos que ocurren dentro de los tejidos, y su comportamiento lineal lo convierte en el elemento más adecuado para determinar el PMI. Se calculó un error del 7% (nivel de significación = 0,05) en la estimación del PMI para la línea espectral H_{α} cuando las muestras de tejido se almacenaron en el recipiente abierto al aire.

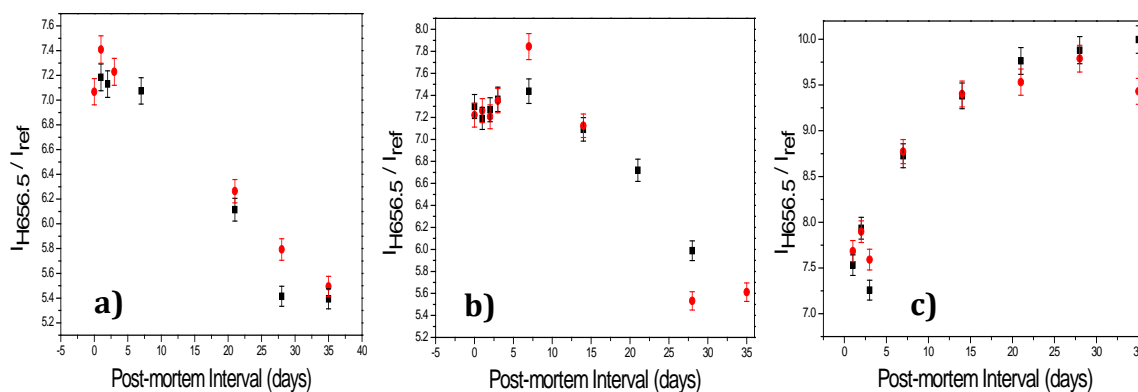


Figura 6.1.3.2: Intensidad de emisión del hidrógeno (H_{α}) dependiente del PMI (656,3 nm) para muestras de tejido de cerdo almacenadas en (a) un recipiente abierto, (b) un recipiente abierto cubierto con una malla metálica y (c) un recipiente de plástico cerrado. (■) Cerdo 1. (■) Cerdo 2.

El Na I mostró una variación significativa de la intensidad de emisión cuando las muestras de tejido se almacenaron en las tres condiciones experimentales estudiadas, $I_{Na}(5 \text{ días}) / I_{Na}(35 \text{ días}) \approx 2$ (Figura 6.1.3.3). Se observa una combinación hacia abajo y hacia arriba para las muestras de tejido almacenadas en un recipiente abierto, mientras que se observa una tendencia opuesta para las muestras de tejido almacenadas en un recipiente de plástico cerrado. La diferencia en la variación de la intensidad de emisión de este elemento con las condiciones de almacenamiento podría deberse a la ausencia o presencia de factores externos que puedan afectar al proceso de descomposición química, como la degradación de los lípidos.

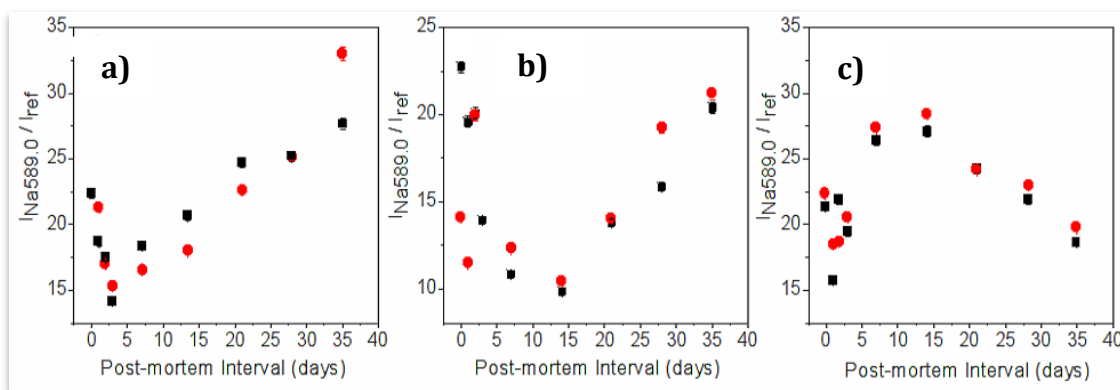


Figura 6.1.3.3: Intensidad de emisión del sodio (Na) dependiente del PMI (589,6 nm) para muestras de tejido de cerdo almacenadas en (a) un recipiente abierto, (b) un recipiente abierto cubierto con una malla metálica y (c) un recipiente de plástico cerrado. (■) Cerdo 1. (■) Cerdo 2.

Con respecto al Mg II, no se observa variación significativa en la intensidad de emisión con el PMI, $I_{Mg}(5 \text{ días})/I_{Mg}(35 \text{ días}) \approx 1,2$ (Figura 6.1.3.4), mientras que el K I mostró una variación similar de intensidad de emisión, como el Na I, $I_K(5 \text{ días})/I_K(35 \text{ días}) \approx 2$ (Figura 6.1.3.5). La evaluación de las concentraciones de electrolitos plasmáticos *post mortem* en suero de rata wistar¹⁵⁵ y sangre humana¹⁵⁶, sugiere una doble relación logarítmica entre la relación plasmática sodio/potasio y el PMI. Sin embargo, en este trabajo no se observaron variaciones significativas en las intensidades de emisión de estos dos elementos en muestras de tejido de cerdo (Figura 6.1.3.6).

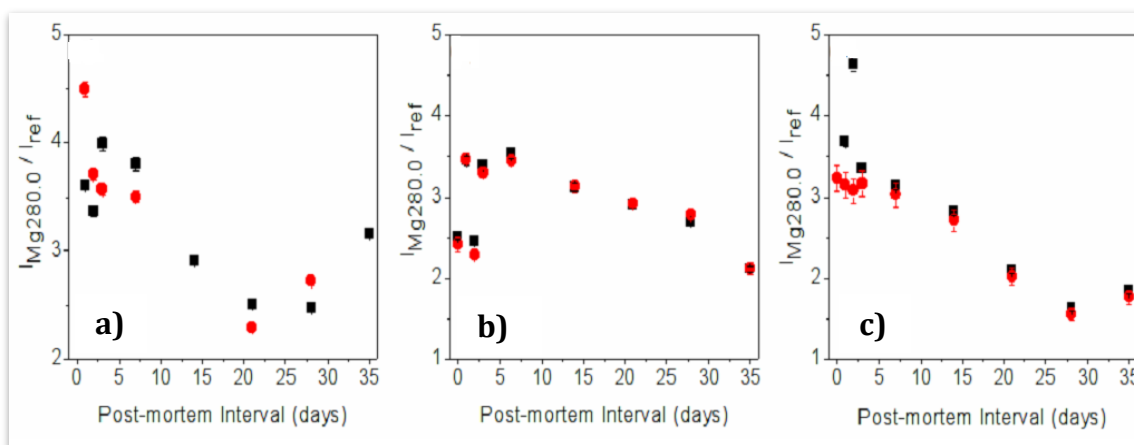


Figura 6.1.3.4: Intensidad de emisión del magnesio (Mg) dependiente del PMI (280.3 nm) para muestras de tejido de cerdo almacenadas en (a) un recipiente abierto, (b) un recipiente abierto cubierto con una malla metálica y (c) un recipiente de plástico cerrado. (■) Cerdo 1. (■) Cerdo 2.

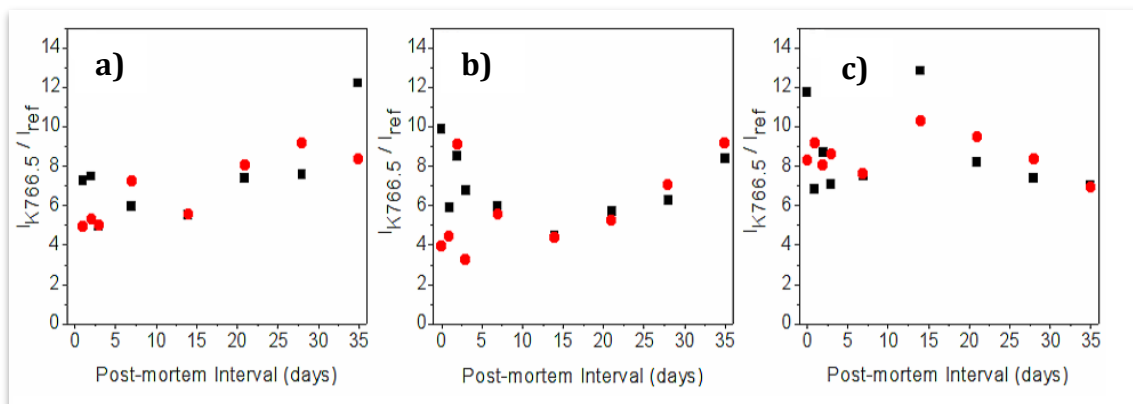


Figura 6.1.3.5: Intensidad de emisión del potasio (K) dependiente del PMI (766.5 nm) para muestras de tejido de cerdo almacenadas en (a) un recipiente abierto, (b) un recipiente abierto cubierto con una malla metálica y (c) un recipiente de plástico cerrado. (■) Cerdo 1. (■) Cerdo 2.

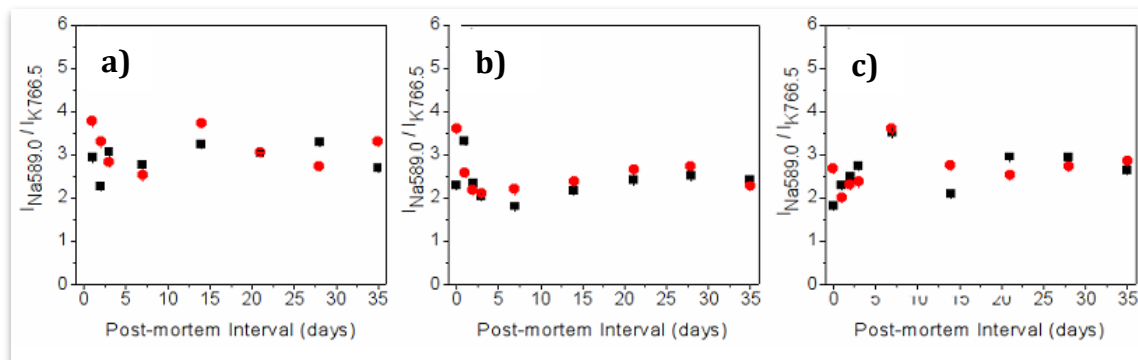


Figura 6.1.3.6: Relación de intensidad de emisión de Na I / K I dependiente del PMI ($I_{589.6} / I_{766.5}$) para muestras de tejido de cerdo almacenadas en (a) un recipiente abierto, (b) un recipiente abierto cubierto con una malla metálica y (c) un recipiente de plástico cerrado. (■) Cerdo 1. (■) Cerdo 2.

Si bien estos resultados preliminares demuestran el uso potencial de la técnica LIBS como un nuevo método instrumental para estimar el PMI, se deben realizar más estudios para determinar la precisión del método. Se necesitan estudios detallados que impliquen intervalos de tiempo más largos para evaluar la capacidad de predicción del método propuesto validando los resultados observados con valores de PMI conocidos. Un resultado alentador fue que ambas muestras de cerdos mostraron el mismo comportamiento para cada condición de almacenamiento, lo que sugiere que la variación de la intensidad de emisión para cada elemento sólo dependía del proceso de descomposición y no de la muestra porcina. Sin embargo, un estudio más exhaustivo es necesario para lograr una aplicación práctica de este método en la ciencia forense.

6.1.4. Conclusiones de la determinación del PMI.

La técnica LIBS evalúa las variaciones dependientes del tiempo de las intensidades de emisión de los elementos principales en las muestras de tejidos de cerdo para la estimación del intervalo *post mortem* (PMI). El análisis espectroscópico LIBS proporcionó la posibilidad de monitorear los cambios metabólicos *post mortem* a nivel elemental. La variación de la intensidad de emisión del Na I y el H_{α} mostró una correlación significativa con el PMI. Las condiciones de almacenamiento de la muestra mostraron un efecto significativo en la señal de emisión de cada elemento. Así, el H_{α} mostró una correlación lineal descendente después de los primeros cinco días desde el momento de la muerte cuando las muestras se

almacenaron en un recipiente de aire abierto, mientras que el Na I y el K I mostraron un comportamiento no lineal en ambas condiciones de almacenamiento. Por otra parte, el Mg II no mostró variación significativa con el PMI. Por lo tanto, el H_{α} es la línea espectral más adecuada para la determinación del PMI. El método permitió estimar el PMI con una incertidumbre del 7% (nivel de significación = 0,05) cuando las muestras de tejido se almacenaron en un recipiente abierto al aire, es decir, una situación típica en la escena del crimen y las investigaciones forenses.

Este trabajo es un estudio preliminar para evaluar la capacidad de LIBS en la estimación del PMI, basado en las variaciones dependientes del tiempo a nivel elemental. Sin embargo, el método basado en LIBS propuesto proporciona una manera rápida y económica para la estimación del PMI y, por lo tanto, una técnica suplementaria factible a los métodos convencionales en la ciencia forense.

6.1.5. Agradecimientos

Especial agradecimiento a todos los autores del artículo, S. Manzoor, S. Moncayo, F. Navarro-Villoslada, R.C. Izquierdo-Hornillos, J.O. Cáceres. Este trabajo es una contribución al proyecto CCG10-UCM / PPQ-4713, que contó con el apoyo de la Universidad Complutense de Madrid.

6.2. Dinámica del plasma producido mediante LIBS en muestras de tejido muscular

Este trabajo ha sido publicado en Applied Spectroscopy con la siguiente referencia bibliográfica:

“Plume Dynamics of Laser-Produced Swine Muscle Tissue Plasma”. Joaquin J. Camacho, Luis Diaz, Alicia Marin-Roldan, Samuel Moncayo, and Jorge O. Caceres. 70(7) (2016) 1228-1238.

Resumen

Este trabajo es un estudio sobre la dinámica de la pluma del plasma inducido por ablación láser de una muestra de tejido del músculo esquelético de cerdo en diferentes condiciones de vacío. Se ha realizado en colaboración con el Prof. Joaquín J. Camacho, de la UAM. Los pulsos procedentes de un láser de CO₂ atmosférico excitado transversalmente se enfocaron sobre una muestra diana y se permitió que el plasma inducido se expandiera en diferentes presiones de aire. Las características de expansión se estudiaron utilizando la fotografía rápida de la emisión visible global mediante el uso de un ICCD. Se observó expansión libre y división de plumas a diferentes niveles de presión. La expansión del frente de la pluma del plasma se analizó utilizando varios modelos de expansión y se estimó la velocidad del frente de la pluma. El efecto del número de disparos láser acumulados en el volumen del cráter a diferentes presiones de aire ambiente y un análisis elemental de la muestra se realizaron usando SEM acoplada con EDX. La morfología superficial de la superficie irradiada mostró que el aumento de la presión del gas ambiente disminuyó la masa ablacionada, o en otras palabras redujo significativamente el acoplamiento láser-objetivo.

6.2.1. Introducción al análisis de plasmas

Los plasmas producidos por láser (LPPs) son actualmente un tema de gran interés en áreas fundamentales y aplicadas de la investigación científica. Los plasmas producidos por láser son de naturaleza transitoria, con parámetros característicos que evolucionan rápidamente en el espacio y el tiempo. Existen diferentes técnicas diagnósticas para caracterizar LPPs, como la espectroscopia de emisión óptica, la sombografía y la fotografía rápida, la fluorescencia inducida por láser, el sondeo de Langmuir, la desviación del haz fototérmico, la espectrometría de masas, entre otros. Estos estudios son esenciales para la comprensión de diversos procesos en física de plasma fundamental. Existen muchas aplicaciones para los LPPs en una amplia variedad de campos de investigación básica y tecnología de materiales, como la fabricación de películas finas por deposición mediante láser pulsado¹⁵⁷, la producción de nanopartículas y clusters¹⁵⁸, las modificaciones superficiales¹⁵⁹, los análisis espectroquímicos de diversos materiales mediante LIBS¹⁶⁰, la fuente de iones¹⁶¹, la litografía⁶⁴, la microscopía¹⁶², y en la fabricación de dispositivos microelectrónicos.

Además de las aplicaciones tradicionales de LIBS, donde se estudian principalmente materiales inorgánicos, progresos recientes en la técnica permiten el análisis de agentes biológicos de guerra¹⁶³, tejidos animales¹⁶⁴, aerosoles biológicos¹⁶⁵ y la identificación de bacterias¹⁶⁶. Por otra parte, el láser de CO₂ ha sido ampliamente utilizado en los últimos 30 años en diversos campos de la medicina¹⁶⁷ y sigue siendo uno de los láseres médicos más útiles y eficaces disponibles en el mercado. Este láser se utiliza principalmente como una herramienta quirúrgica o cosmética, ya que puede cortar o vaporizar el tejido con bastante poco sangrado y un daño mínimo al tejido circundante. Se utiliza para eliminar las capas delgadas de la superficie de la piel sin entrar en las capas más profundas.

La interacción de una pluma con un gas ambiente conduce a una expansión que implica varios procesos complejos, tales como termalización, atenuación, deceleración, blindaje del plasma por el láser, difusión, recombinación de electrones, confinamiento, agrupamiento y formación de ondas de choque. En un estudio reciente¹²⁴ se han estudiado los espectros de emisión, la densidad de electrones y la temperatura de las plumas de ablación láser en los tejidos del músculo porcino desde el punto de vista espacial y temporal.

En este trabajo se presenta un análisis experimental de la ablación con láser del tejido muscular del esqueleto de cerdos utilizando la fotografía rápida. Esta muestra se seleccionó debido a su similitud con la composición fisiológica de tejidos musculares humanos.

Las imágenes de la pluma en expansión se registraron en diferentes condiciones de vacío. Las vistas de lado de la expansión de la pluma se realizaron registrando la emisión global visible desde el plasma. Esto es importante para comprender la hidrodinámica de la expansión de la pluma. La dinámica del frente de la pluma se comparó con varios modelos de expansión, encontrando generalmente un buen acuerdo. En comparación con el vacío, la presencia de gas ambiente afecta significativamente al acoplamiento de láser-objetivo y a la masa ablacionada. Se utilizó la técnica SEM para una alta ampliación de los cráteres producidos por el láser, y la espectroscopia EDX para hacer un microanálisis químico cuantitativo de algunas regiones de la muestra.

6.2.2. Procedimiento experimental

El estudio se realizó con muestras de carne de dos cerdos obtenidos de un matadero industrial autorizado con todos los certificados necesarios de conformidad con los requisitos formales de la Unión Europea. Los cerdos no fueron sacrificados sólo con el propósito de llevar a cabo este experimento, sino que fueron seleccionados al azar de las poblaciones sacrificadas para el consumo diario.

La heterogeneidad espacial de las diferentes concentraciones elementales en los tejidos biológicos es un fenómeno bien conocido, que se puede observar fácilmente mediante un análisis SEM-EDX. Con el fin de disminuir el impacto de la heterogeneidad espacial en las muestras y tener muestras biológicas inofensivas y estables, los tejidos fueron liofilizados. Un total de 250 mg de tejido se molieron utilizando un mortero de ágata y un mazo durante 5 min, y posteriormente, se comprimieron en una pastilla compacta utilizando una prensa hidráulica a 10 Ton/cm². El espesor y el diámetro de las pastillas eran de aproximadamente 2 mm y 13 mm, respectivamente. La densidad de la muestra fue 0,93 g/cm³.

Las pastillas se analizaron directamente sin preparación adicional. La instrumentación empleada para este experimento fue la descrita en el Capítulo 4, perteneciente a la UAM. Las condiciones de vacío se estudiaron mediante SEM (Hitachi S-3000N) equipado con un analizador EDX (Oxford Instruments INCAxsight).

Las profundidades de los cráteres de ablación se midieron utilizando un microscopio óptico Raman (Renishaw inVia). La emisión del plasma se recogió y se formó una imagen en la ranura abierta de un espectrógrafo de alta resolución con la rejilla de difracción en orden cero (espejo). Se insertó un prisma de cuarzo en la trayectoria óptica para girar la imagen de plasma en 90 °, proyectando la dirección de la expansión del plasma (eje z) sobre la ranura de entrada. El prisma Dove está situado entre dos lentes de cuarzo con longitudes focales de 80 mm y 40 mm. Se encontró que la ampliación de la imagen final formada por el sistema óptico era de 1:0,5. Las imágenes fueron grabadas por un ICCD (Andor iStar DH-734, 1024x1024 píxeles, 13 µm píxeles) en modo de imagen, que está sincronizado con el disparador del pulso láser.

6.2.3. Resultados

Efectos del Aire Ambiental en las Imágenes de la Pluma del Plasma

Cuando un láser pulsado de nanosegundos con suficiente energía se enfoca en una muestra, se produce la ablación del material, y, posteriormente, el plasma inducido por láser. La iniciación de un plasma sobre la superficie de la muestra comienza en el vapor caliente de la muestra. La pluma del plasma de vapor caliente interactúa con la atmósfera circundante de dos maneras¹⁶⁰:

1. La expansión del vapor de alta presión produce una onda de choque en la atmósfera.
2. La energía es transferida a la atmósfera por una combinación de conducción térmica, transferencia radiativa y calentamiento por la onda de choque.

La importancia relativa de estos procesos para determinar la evolución subsiguiente del plasma depende de la densidad de potencia láser, la composición de la muestra, el tamaño de las burbujas de plasma de vapor y el punto focal, la composición y la presión de los gases ambientales, la longitud de onda del láser y su perfil temporal. Con una alta irradiancia, como en este estudio (1.1 GWxcm^{-2}), el calentamiento de choque domina. A largas longitudes de onda del láser ($\lambda > 1 \text{ }\mu\text{m}$), como aquí, la iniciación de la ablación se asocia usualmente con la ionización en cascada ($h\nu + e + M \rightarrow e^* + M \rightarrow 2e + M^+$). El material ablacionado o el denso vapor de la pluma consta de electrones, iones, átomos, moléculas, *clusters* y radiación dispersa. Los *clusters* son producidos por efectos colectivos, y la formación de gotitas está relacionada con perturbaciones hidrodinámicas ya que grandes fragmentos de material son expulsados debido a la relajación del estrés. Las especies, que son expulsadas de la superficie, llevan consigo una cierta energía interna y cinética. Inicialmente, las especies producidas sufren colisiones en la región de alta densidad cerca de la superficie de la muestra, formando la llamada capa de Knudsen, que conduce a una expansión altamente direccional perpendicular a la muestra. La dinámica de expansión de la pluma LPP ha sido descrita en otra parte³². Después de la interacción del láser con el blanco, se produce una expansión isotérmica de la pluma del plasma. Esta pluma absorbe la energía del rayo láser, y su

temperatura y presión crecen. Se produce una expansión adiabática de la pluma del plasma cuando la temperatura puede estar relacionada con las dimensiones del plasma³².

La emisión del plasma comienza poco después de que el rayo láser alcance la muestra. Las imágenes de este estudio se registraron a diferentes tiempos de retraso (t_d) para un tiempo de tiempo de medida (t_w) típicamente de $0,1 \mu s$. Dado que el número de fotones detectados en una imagen de un solo disparo es relativamente bajo, la acumulación de ganancia de imágenes de un solo disparo permite formar una imagen más completa. La característica más significativa de este enfoque es el aumento generalmente grande en la relación señal-ruido que se realiza, debido a la disminución en el ruido de la proyección de la imagen. El tiempo de integración se selecciona correctamente para obtener imágenes de alta calidad, dependiendo de los diferentes parámetros del láser y del nivel de intensidad del plasma. Cada imagen representa un espectro integrado de la pluma del plasma. Después de un número adecuado de disparos láser, típicamente cinco, las imágenes resultantes se promedian en conjunto para producir una única imagen representativa. La Figura 6.2.3.1 muestra las imágenes ICCD resueltas en tiempo del plasma en expansión producido sobre una muestra sólida de tejido de cerdo a diferentes presiones de aire que van desde $7,5 \times 10^{-5}$ Torr hasta la presión atmosférica. Los tiempos en estas imágenes representan el tiempo después del comienzo del pulso láser. A bajas presiones ambientales (Figura 6.3.2.1, fila superior), debido a la baja densidad del gas de fondo, la interacción de la pluma es débil y, por lo tanto, la expansión es mayormente perpendicular a la superficie de la muestra. Está claro que no hay mucha influencia del aire ambiente en la expansión del plasma. La forma inicial del plasma es alargada ($t_d < 0,3 \mu s$) y posteriormente esférica, debido a que la expansión radial del plasma no está confinada por el gas ambiente. Cuando la presión se incrementa a $2,8 \times 10^{-2}$ Torr (Figura 6.3.2.1, fila media), el comportamiento es similar, aunque la forma alargada inicial del plasma dura más tiempo ($t_d < 1,5 \mu s$), debido al efecto de confinamiento inducido por la presión ambiental. A presión atmosférica (figura 6.3.2.1, fila inferior), la forma del plasma es principalmente alargada y se separa de la superficie de la muestra 200 ns después del inicio del pulso láser, produciendo un movimiento lento o un componente casi constante cerca del objetivo y otro componente que se mueve más rápido. Este componente rápido está ligeramente fuera del eje incidente del láser. En este caso, el comportamiento del plasma se caracteriza por una fuerte interpenetración e interacción del plasma y el gas ambiente a alta

presión. Se forma una región límite de contacto entre la pluma del plasma y la onda de choque en el gas. La emisión de este componente rápido existe hasta $\leq 5 \mu\text{s}$. Junto con la nitidez, el componente más rápido se divide de nuevo en dos nubes. La expansión de la pluma se observa hasta $5,5 \mu\text{s}$ en vacío ($7,5\text{-}10,5 \text{ Torr}$), pero a medida que aumenta la presión, la expansión dura más tiempo ($6 \mu\text{s}$ a $2,8 \times 10^{-2} \text{ Torr}$ y $10 \mu\text{s}$ a presión atmosférica). A medida que aumenta la presión, disminuye la penetración recíproca de la pluma y el aire ambiente, produciendo un confinamiento de la pluma y formando interfases. En esta condición, también aparece cierta turbulencia en el plasma en expansión junto con la desaceleración y un aumento en las colisiones. Esto conduce a una emisión de la pluma del plasma cada vez mayor y, por lo tanto, las plumas duran más tiempo a altas presiones.

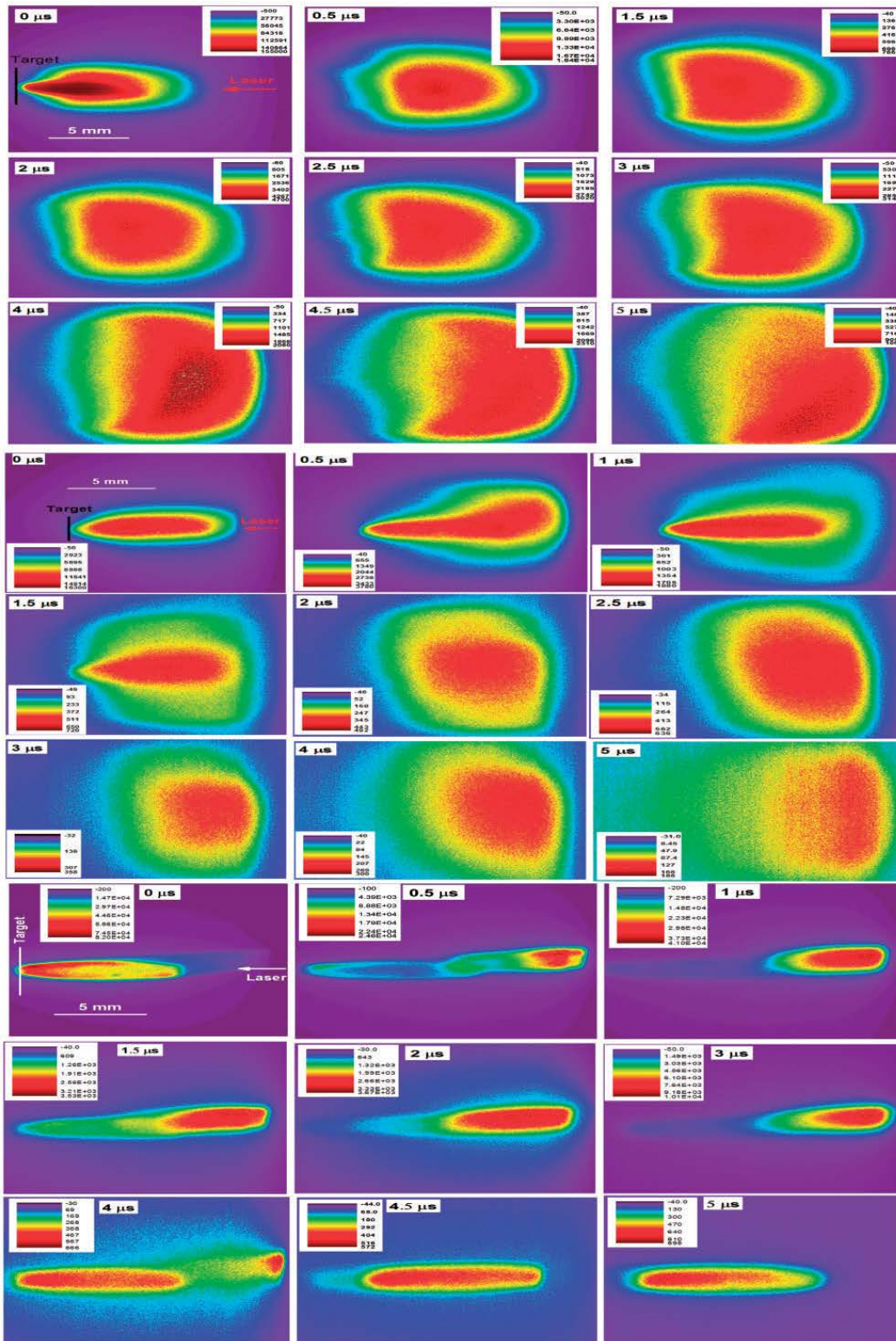


Figura 6.2.3.1: Imágenes ICCD resultas en tiempo de tejido de cerdo a diferentes presiones de fondo: $7,5 \times 10^{-5}$ Torr (fila superior); $2,8 \times 10^{-2}$ Torr (fila media); Presión atmosférica (fila inferior). El tiempo de exposición fue de $t_w = 100$ ns. Los tiempos en las imágenes representan el tiempo después del comienzo del pulso láser. Todas las imágenes se normalizan a su máxima intensidad siendo la escala de pseudo-color indicada para cada figura.

A estas presiones, la dinámica de expansión se rige por la naturaleza y presión del gas ambiente y el blindaje del plasma por del láser. El blindaje del plasma es un proceso en el que se impide que el haz láser alcance la muestra por varios procesos, tales como el *bremstrahlung* inverso, y la absorción iónica. La superficie ablacionada de la muestra se vuelve ópticamente densa a altas intensidades del láser, y la cola del pulso láser de CO₂ entrante puede interactuar con el plasma, siendo absorbidos o reflejados.

Modelo de onda de choque en el plasma en expansión

Las intensidades de emisión del área axial (FWHM) a 7.5×10^{-5} Torr y 2.8×10^{-2} Torr en función del retraso se dan en la Figura 6.2.3.2. Estos gráficos se obtienen a partir de las imágenes, y proporcionan información muy útil sobre la expansión y estructura interna de la pluma del plasma.

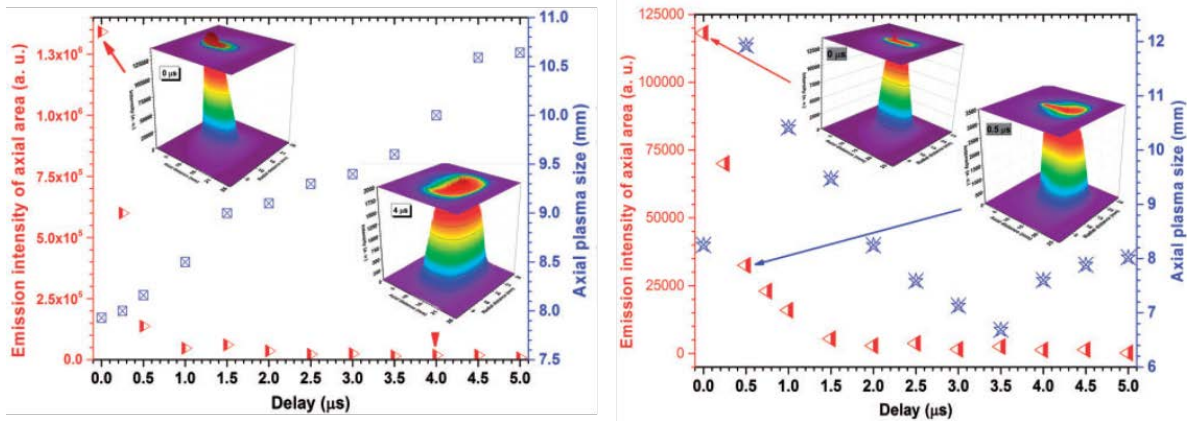


Figura 6.2.3.2: Intensidad de emisión del área axial y tamaño axial del plasma (FWHM) a: $7,5 \times 10^{-5}$ Torr (figura de la izquierda); $2,8 \times 10^{-2}$ Torr (figura de la derecha), como una función del tiempo de retraso desde el comienzo del pulso láser.

Cuando se compara el tiempo de retraso, las imágenes promediadas revelan que la intensidad de la emisión del plasma decae exponencialmente con el tiempo. El tamaño del plasma (tanto axial como radial) a $7,5 \times 10^{-5}$ Torr crece linealmente con el tiempo (Figura 6.2.3.2, izquierda), mientras que el tamaño del plasma a $2,8 \times 10^{-2}$ Torr sigue un comportamiento anómalo (Figura 6.2.3.2, derecha). A $2,8 \times 10^{-2}$ Torr, el tamaño del plasma axial aumenta rápidamente de 0 a 0,5 μ s, después disminuye linealmente hasta aproximadamente 3,5 μ s, y por último aumenta lentamente hasta 5 μ s. Esto se debe a diversas interacciones complejas que tienen lugar entre las especies del plasma en expansión y las especies del gas de fondo a diferentes niveles de presión. En comparación con el vacío

(Figura 6.2.3.1, fila superior y Figura 6.2.3.2, izquierda), la interacción del plasma con el aire ambiente se complica debido a nuevos procesos, como la formación de ondas de choque y agrupamientos, división de plumas, confinamiento, deceleración del plasma, termalización y difusión.

Midiendo el área de sección transversal axial y el tamaño axial del plasma (Figura 6.2.3.2, izquierda), se cuantificó la disminución de la intensidad y el crecimiento del tamaño del plasma en el intervalo de retrasos. Las intensidades de emisión a $7,5 \times 10^{-5}$ Torr en función de las distancias axiales y radiales se dan en la Figura 6.2.3.3 (izquierda). La inserción de la Figura 6.2.3.3 muestra los perfiles de intensidad radial normalizados. Para facilitar la comparación, cada perfil se ha normalizado a su máxima intensidad.

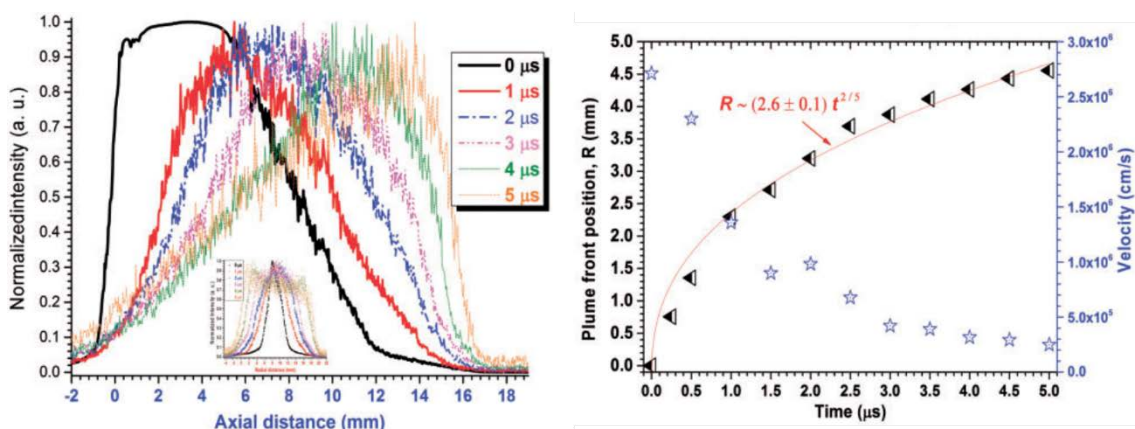


Figura 6.2.3.3: (Izquierda) Perfiles de intensidad axial normalizados a partir de las imágenes ICCD del plasma en vacío ($P_{\text{aire}} = 7,5 \times 10^{-5}$ Torr) en función del tiempo de retraso. La inserción muestra los perfiles de intensidad radial normalizados; (Derecha) y las velocidades obtenidas a partir de las imágenes ICCD del plasma en vacío ($P_{\text{aire}} = 7,5 \times 10^{-5}$ Torr) junto con el ajuste a un modelo de onda de choque.

La distancia axial cero corresponde a la posición objetivo. La radiación de baja intensidad se observa a distancias negativas, debido a la penetración del pulso láser en la muestra y a la reflexión de la luz desde la superficie de la misma. Los perfiles de intensidad de emisión axial ($7,5 \times 10^{-5}$ Torr) muestran una distribución de pico única para diferentes tiempos de retraso después de la formación del plasma, lo que indica una emisión uniforme a lo largo de la dirección de expansión. Las imágenes del LPP muestran una expansión de la pluma de hasta 20 mm en ambas direcciones, axial y lateral. Los perfiles de intensidad de emisión radial muestran una distribución de pico único para tiempos de retraso cortos ($t_d < 3,5 \mu\text{s}$) y una división en dos máximos simétricos en períodos largos.

La expansión del plasma en el fondo de vacío es adiabática y puede predecirse mediante modelos teóricos y simulaciones numéricas de dinámica de gases³². Los datos de imagen se usaron para generar gráficos de posición-tiempo del frente de plasma ($7,5 \times 10^{-5}$ Torr) y se dan los resultados en la Figura 6.2.3.3 (derecha). Se encuentra que la posición del límite frontal de choque de la pluma está bien definida en las sombragrafías⁶³, mientras que es difícil estimar en la grabación de imágenes ICCD debido a la intensa auto-emisión. Como se observó en Harilal et al.⁶³, tomamos la posición frontal de la pluma basándonos en una reducción del 90% en la intensidad máxima. Los datos obtenidos se representan en la Figura 6.2.3.3 (derecha), junto con un ajuste al modelo de choque. Dado que existe un umbral de distancia para la formación de ondas de choque, consideramos una onda de choque retardada¹⁶⁸. El frente de la pluma se comporta linealmente en los primeros tiempos ($t_d < 0,5 \mu s$), indicando la expansión libre de la pluma en el vacío. Las velocidades de expansión del frente del plasma se estimaron a partir de las pendientes de la gráfica posición-tiempo. Como podemos ver en las gráficas, no hay división de la pluma del plasma, y, a medida que el tiempo evoluciona, el máximo y la posición del frente de choque aumentan. En el vacío y hasta aproximadamente $1 \mu s$, la expansión del plasma es aproximadamente lineal y en tiempos posteriores, hay una desaceleración de la pluma. La velocidad inicial y máxima del plasma en expansión es aproximadamente 3×10^6 cm/s y después disminuye lentamente hasta $0,25 \times 10^6$ cm/s a $5 \mu s$.

De acuerdo con la teoría de Taylor-Sedov¹⁶⁸, para una onda expansiva que emana de una explosión de punto fuerte, la posición de choque R se define por:

$$R = \xi_0 \left(\frac{E_0}{\rho_b} \right)^{1/(n+2)} t^{2/(n+2)} \quad \text{Ecuación 6.2.3.1.}$$

donde ξ_0 es una constante dada por $\xi_0 = [(75/16\pi)(\gamma-1)(\gamma+1)^2/(3\gamma-1)]^{1/5} \gamma$ siendo el índice adiabático, E_0 la cantidad de energía liberada durante la explosión, ρ_b la densidad de gas de fondo y t el tiempo de retraso. El parámetro n es 1 para una onda de choque plana, 2 para una cilíndrica y 3 para una esférica. Este modelo descarta la viscosidad y es aplicable cuando la masa del material inyectado es pequeña en comparación con la masa del gas ambiente puesta en movimiento por la onda de choque. Por lo tanto, una ecuación general de la forma $R(t) = a t^{0.4}$ se emplea para modelar la dinámica de la onda de choque esférica donde a es una

constante. La Figura 6.2.3.3 (derecha) muestra una gráfica de R-t a 7.5×10^{-5} Torr, junto con el correspondiente ajuste $R \sim (2,6 \pm 0,1) t^{2/5}$ [mm/ $\mu\text{s}^{2/5}$]. El ajuste de la gráfica es mejor después de 1 μs de acuerdo con la Figura 6.2.3.1 (fila superior). La validez del modelo de onda de choque está restringida a una región de distancia donde la masa del gas que rodea a la onda de choque es mayor que la masa ablacionada, hasta distancias a las que la presión que impulsa el movimiento de la pluma es mayor que la presión del gas en reposo. La región espacial límite R, más allá del modelo de onda de choque, no es válida:

$$\left(\frac{3M_p}{4\pi\rho_b}\right)^{1/3} \ll R \ll \left(\frac{E_0}{P_b}\right)^{1/3} \quad \text{Ecuación 6.2.3.2.}$$

donde M_p es la masa de la pluma en expansión y P_b es la presión por delante del frente de la onda de choque¹⁶⁹. Según Zeldovich y Raiser¹⁶⁸, la formación de la onda de choque adquiere importancia cuando la masa del gas desplazado es comparable a la masa del plasma (M_p). Asumiendo una expansión hemisférica del plasma, M_p se puede estimar usando la siguiente expresión:

$$M_p = \frac{2}{3} \pi R_{sw}^3 \rho_b \quad \text{Ecuación 6.2.3.3.}$$

siendo R_{sw} el radio delantero.

Modelo de arrastre del plasma en expansión

En la Figura 6.2.3.4 (izquierda) se dan las intensidades normalizadas del área axial a 2.8×10^{-2} Torr, obtenidas a partir de las imágenes dadas en la Figura 6.2.3.1, en función de la distancia axial.

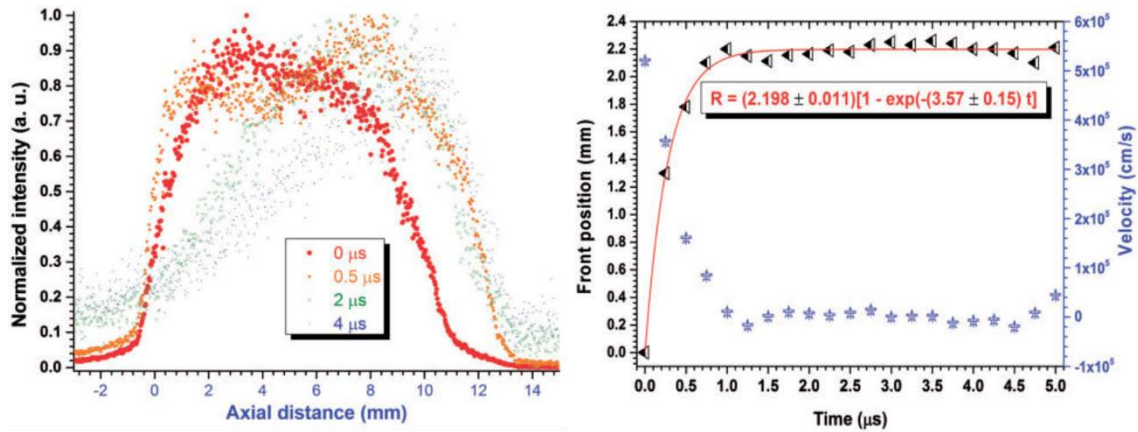


Figura 6.2.3.4: (Figura de la izquierda) Perfiles de intensidad axial normalizados a partir de las imágenes ICCD del plasma en medio vacío ($P_{aire} = 2,8 \times 10^{-2}$ Torr) en función del tiempo de retraso, y (Figura de la derecha) las velocidades obtenidas a partir de las imágenes ICCD del plasma en vacío ($P_{aire} = 2,8 \times 10^{-2}$ Torr), junto con el ajuste a un modelo de arrastre.

Los perfiles de intensidad de emisión axial muestran una distribución de pico única para diferentes tiempos de retraso después de la formación del plasma, lo que indica una emisión uniforme a lo largo de la dirección de expansión. Las imágenes LPP (Figura 6.2.3.1, fila del medio) muestran expansión de plumas de hasta 15 mm en ambas direcciones, axial y lateral. Los datos de formación de imágenes se utilizaron para generar gráficas posición-tiempo del frente del plasma a $2,8 \times 10^{-2}$ Torr. A esta presión, el modelo de arrastre¹⁶⁹ proporciona un mejor ajuste en un entorno con fondo de alta viscosidad, el cual viene dado por:

$$R = R_0 (1 - e^{-\beta t}) \quad \text{Ecuación 6.2.3.4.}$$

donde R_0 es la distancia de parada de la onda de choque del plasma (distancia a la cual la pluma se detiene) y β es el coeficiente de parada. Este modelo predice que la pluma se detendrá debido a la resistencia de las colisiones con el gas de fondo. A medida que el tiempo evoluciona, la pluma disminuye y las partículas expulsadas chocan con los átomos de gas ambientales y pierden su energía cinética. La pluma en expansión actúa como un pistón que comprime el gas ambiente. La posición frontal medida frente al retraso a $2,8 \times 10^{-2}$ Torr se representa en la Figura 6.2.3.4 (derecha), junto con un ajuste al modelo de arrastre.

La Figura 6.2.3.4 muestra que el modelo de arrastre coincide bien con nuestros datos, siendo los valores de los parámetros de ajuste $\beta = 3,57 \pm 0,15 \mu s^{-1}$ y $R_0 = 2,198 \pm 0,011$ mm.

Las velocidades de expansión del frente de plasma se estimaron a partir de las pendientes del gráfico de posición-tiempo. La Figura 6.2.3.4 muestra que la velocidad inicial de la pluma es de 5.2×10^5 cm/s y, posteriormente disminuye rápidamente hasta $0,1 \times 10^5$ cm/s a $1 \mu\text{s}$, siendo aproximadamente cero en tiempos más altos. Al comparar la velocidad de la pluma a un vacío más alto (Figura 6.2.3.3), la ralentización es obvia debido a la interacción de la pluma con las moléculas de aire que crean una fuerza de arrastre. Además, hay una disminución en la masa ablacionada (como se muestra en la siguiente sección) y, por lo tanto, en el plasma inducido por láser.

Las intensidades de emisión del área axial y algunas imágenes del plasma en 3D a presión atmosférica en función del tiempo de retraso se dan en la Figura 6.2.3.5 (izquierda).

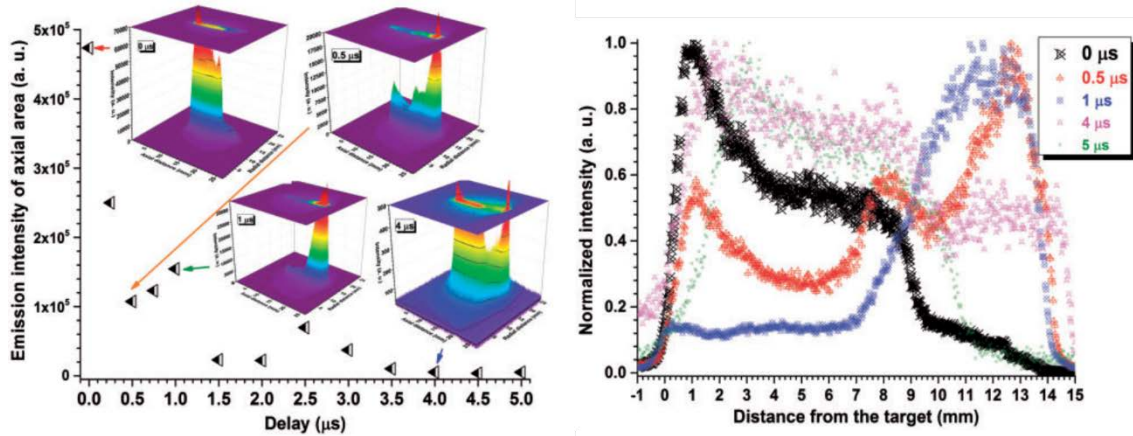


Figura 6.2.3.5: (Figura de la izquierda) Intensidad de emisión del área axial del plasma a presión atmosférica. Los insertos muestran cuatro imágenes a diferentes tiempos de retraso; (Figura de la derecha) perfiles de intensidad axial normalizados a partir de las imágenes ICCD del plasma a presión atmosférica en función del tiempo de retraso.

Las imágenes promediadas revelaron que la intensidad de emisión del plasma decayó exponencialmente con el tiempo, pero aparecen ciertas inestabilidades y división de plumas. La figura 6.2.3.5 (derecha) muestra los perfiles de intensidad axial normalizados de las imágenes ICCD del plasma a presión atmosférica en función del tiempo de retraso. Los perfiles de intensidad de emisión axial a presión atmosférica muestran una distribución de picos múltiples para diferentes tiempos de retraso después de la formación del plasma, indicando interacciones complejas entre el plasma generado en la muestra, el plasma generado en el aire de fondo, etc. A 1 atm, la pluma se separa de la superficie de la muestra después del inicio del pulso láser, produciendo un componente de movimiento lento o casi

constante cerca de la muestra y un componente móvil más rápido, fuera del eje incidente del láser. El comportamiento del plasma se describe por una fuerte interpenetración e interacción del plasma y el gas ambiente a alta presión. Se forma una región límite de contacto entre la pluma y la onda de choque en el gas. Como antes, las intensidades de imagen media a presión atmosférica (Figura 6.2.3.5) se deterioran exponencialmente con el tiempo. Sin embargo, si comparamos el plasma producido a $2,8 \times 10^{-2}$ Torr (Figuras 6.2.3.1 y 6.2.3.2, paneles centrales), hay un aumento en la intensidad de este plasma a presión atmosférica, a pesar de que la masa ablacionada es menor. El aumento de la intensidad de emisión del plasma en expansión en el gas de fondo puede atribuirse principalmente a las excitaciones debidas a colisiones con átomos del fondo y a la excitación/recombinación por impacto de electrones. Entre estos dos casos, los procesos de impacto de electrones deben desempeñar el papel dominante en la excitación, ya que las secciones transversales de la colisión átomo-átomo son dos órdenes de magnitud inferior a las colisiones electrón-átomo¹⁷⁰. La interacción entre la pluma en expansión y el gas ambiente puede causar la ionización del gas ambiente, lo que contribuye al aumento de la densidad electrónica. Además, se informa de una disminución de la intensidad del umbral de ruptura en el aire de 1 a $0,3 \text{ GW} \cdot \text{cm}^{-2}$ para presiones de aire entre 30 hPa y 500 hPa, seguido de un aumento de hasta $1,2 \text{ GW} \cdot \text{cm}^{-2}$ a presión atmosférica³³. Para presiones de aire inferiores a 10 hPa, no se observó descomposición de aire para un láser de TEA-CO₂ con una densidad de potencia máxima de $6,3 \text{ GW} \cdot \text{cm}^{-2}$. Un aumento en la densidad electrónica, y, por lo tanto, un aumento de la excitación del impacto de electrones, podría ser responsable de la mejora de la emisión a altas presiones. Otro factor, que explica la gran diferencia en la intensidad de emisión a $2,8 \cdot 10^{-2}$ Torr y a presión atmosférica, es el crecimiento en cascada de la densidad del número de electrones y del coeficiente de absorción del plasma en el medio ambiente. La condición para el crecimiento en cascada se expresa como¹⁷¹:

$$\left(\frac{d\varepsilon}{dt}\right) = \frac{4\pi^2 e^2 I v_{eff}}{m c \omega^2} - \frac{2 m v_{eff} I_p}{M_b} \quad \text{Ecuación 6.2.3.5.}$$

donde ε es la energía de los electrones libres, e y m son la carga y la masa del electrón, M_b es la masa de la partícula neutra del gas de fondo, I_p es la energía de la primera etapa de ionización del gas, v_{eff} es la frecuencia efectiva de la colisión electrón-neutral, I es la intensidad de la radiación láser, y ω es la frecuencia de la radiación láser. El primer término

en el lado derecho de la Ecuación 6.2.3.5 expresa la tasa de crecimiento de la energía por la absorción de fotones láser, mientras que el segundo término es la tasa máxima de pérdida de energía debido a las colisiones elásticas e inelásticas con partículas de gas neutro. Al comparar el aire a baja y alta presión, la condición para el crecimiento en cascada es más favorable a presiones más altas que a presiones más bajas [M_b ($4,67 \cdot 10^{-8}$ g/cm³ a $2,8 \cdot 10^{-2}$ Torr) \ll M_b (0.0011 g/cm³ a 760 Torr), considerando nitrógeno]. Esto indica que la temperatura y densidad electrónica de la pluma del plasma debería ser mayor a altas presiones en comparación con presiones bajas. Esto dará lugar a un aumento en la excitación de impacto electrónico, que es en gran parte dependiente de la temperatura y de la densidad electrónica. Debe observarse que la condición de crecimiento en cascada no debe ser favorecida a presiones más altas ($P > 1$ atm) debido al aumento de la pérdida de energía por las colisiones elásticas de los electrones con las partículas neutras del gas.

Efectos del aire ambiente en los perfiles de los cráteres

La interacción de un láser pulsado con un material de fase condensada produce una ablación de masa que se evapora parcialmente y se transfiere al plasma, donde las especies excitadas emiten radiación específica de elemento, utilizada para realizar análisis LIBS. Una fracción de la masa ablacionada deja la muestra como partícula, líquido o vapor. Posteriormente, este vapor se condensa en el entorno del punto láser. Las partículas eyectadas pueden ser arrastradas por el flujo de gas o propagarse de nuevo a la región de interacción láser-muestra, produciendo una deposición que forma gotitas o salpicaduras.

Debido a la complejidad de los procesos involucrados, es difícil estimar cuantitativamente la masa ablacionada. Sin embargo, la cantidad de masa eliminada se puede estimar mediante la densidad de la muestra y el volumen del cráter, suponiendo que los parámetros del plasma son homogéneos dentro del plasma y el material ablacionado es completamente vaporizado en el plasma. Debido a la baja dureza de la muestra de tejido, se observó formación de cráteres incluso después de un único pulso láser. Sin embargo, se irradiaron las muestras con varios disparos en cada punto para facilitar la medición de los parámetros físicos. La Figura 6.2.3.6 muestra una fotografía de los perfiles de cráter obtenidos después de 10, 25 y 50 pulsos láser acumulados en dos condiciones de vacío ($7,5 \cdot 10^{-5}$ y 0,03 Torr), y a presión atmosférica.

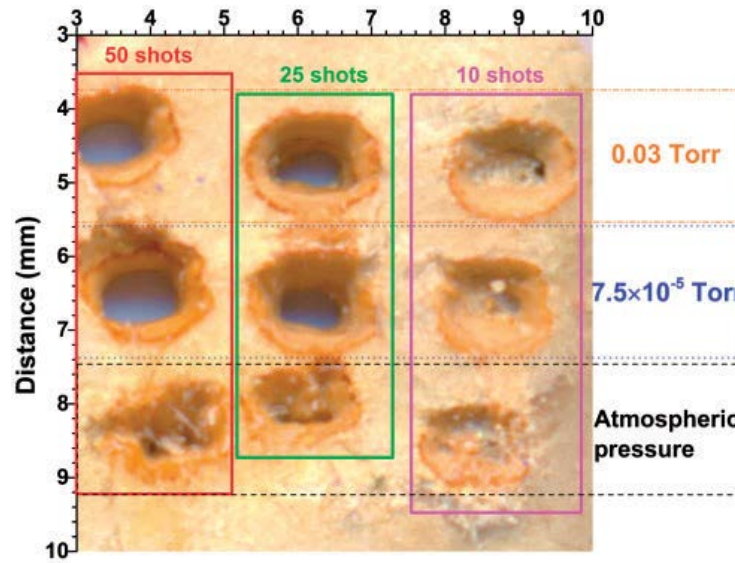


Figura 6.2.3.6: Fotografía que muestra las características superficiales del tejido muscular del cerdo después de irradiar 10, 25 y 50 pulsos láser en vacío ($7,5 \cdot 10^{-5}$ y 0,03 Torr), y presión atmosférica.

Es visible que la presión del gas ambiente influye en la cantidad de material ablacionado mediante láser, modificando tanto el acoplamiento de laser-muestra como el acoplamiento láser-plasma. En el vacío, la muestra, de 1,5 mm de espesor, se perforó cuando se irradiaba con 25 o 50 pulsos. Para cada presión específica, a medida que aumenta el número de pulsos, la profundidad del cráter y la masa ablacionada crecen linealmente. Los diámetros y la profundidad medidos en los diferentes cráteres muestran que estos parámetros disminuyen a medida que aumenta la presión del aire ambiente. La Figura 6.2.3.7 muestra las imágenes SEM de los cráteres producidos mediante 10 pulsos láser a dos presiones de aire (75 y 660 Torr).

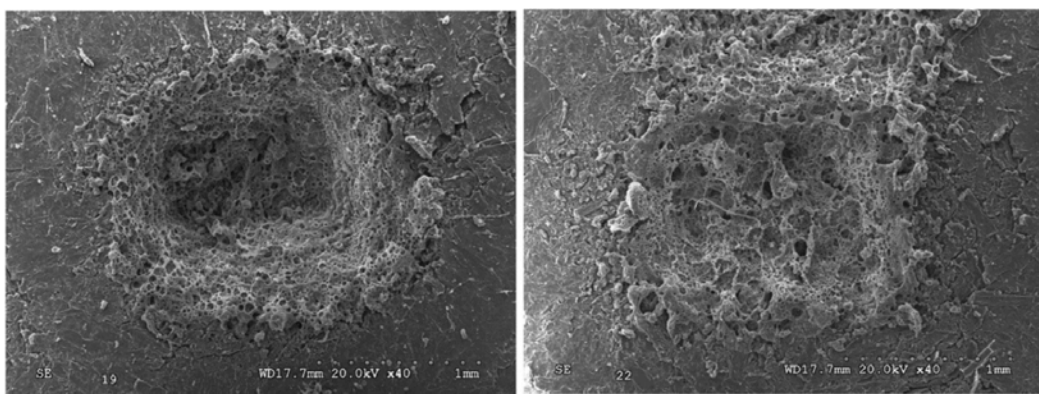


Figura 6.2.3.7: Micrografías electrónicas de barrido que revelan las características superficiales del tejido muscular del cerdo después de irradiar 10 pulsos láser en dos condiciones de vacío diferentes: 75 Torr (izquierda) y 660 Torr (derecha).

Los puntos láser muestran una región central de fusión intensa, donde se ha eliminado cierta cantidad de masa, y una región externa alrededor de la misma donde se observan microestructuras. Hay una re-solidificación del material fundido en forma de vórtice, gotitas, poros, y re-deposición de partículas. Como la intensidad del láser es más alta en el centro y disminuye hacia la periferia, genera un gradiente de temperatura que provoca el movimiento del material líquido, principalmente a lo largo de la dirección radial, dando lugar a la formación de elevación regular (ondulaciones) que se extienden hasta la periferia del pulso láser. Para calcular la masa ablacionada, se considera el cráter como un tronco elíptico cónico, y se miden los diámetros superiores y la profundidad, pudiendo así calcular los diámetros inferiores y el volumen. Por ejemplo, para los cráteres mostrados en la Figura 6.2.3.7, la masa ablacionada a 75 Torr es tres veces mayor que a 660 Torr (Tabla 6.2.3.1). La incertidumbre estimada en la determinación de la masa ablacionada es de aproximadamente el 30%. Además, a una presión más alta, se produce una sustancial salpicadura de material fundido en el cráter (Figura 6.2.3.7). A presiones más altas, el blindaje del plasma se hace dominante, lo que no sólo reduce la ablación de masa, sino que también absorbe la energía del láser entrante que resulta en un plasma de alta temperatura delante de la superficie de la muestra. Este plasma caliente puede aumentar la presión sobre la superficie fundida, lo que puede provocar salpicaduras y mejorar el movimiento del material desde el centro a la periferia del área analizada. Observaciones similares han sido reportadas por Farid et al⁶².

Tabla 6.2.3.1: Volumen y masa ablacionada por pulso de los cráteres de la Figura 6.2.3.7.

Eje, profundidad (mm)	Presión	Presión
	75 Torr	660 Torr
d1 (eje superior, elipse superior)	2.04	1.64
d2 (eje inferior, elipse superior)	1.64	1.10
d3 (eje superior, elipse inferior)	1.78	1.48
d4 (eje inferior, elipse inferior)	1.42	0.96
h (profundidad del cráter)	0.42	0.26
Volumen (mm ³)	0.966	0.328
Masa ablacionada (µg/pulso)	90	30

$$V = (h\pi/12) \times [(d1 \times d2) + (d3 \times d4) + (d1 \times d2 \times d3 \times d4)^{1/2}]$$

Microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopía de rayos X de dispersión de energía (EDX): Análisis elemental de la muestra

La Tabla 6.2.3.2 muestra el microanálisis químico realizado mediante SEM-EDX. Se observó una composición casi similar en la superficie original de la muestra y en el cráter formado después de la interacción con el láser. Otros elementos como el H (imposible de detectar por EDX), el Mg y el Ca fueron observados mediante LIBS⁷⁹. Las concentraciones de todos los elementos concuerdan con la composición del tejido animal deshidratado. El límite de detección mínimo de un analizador EDX es de aproximadamente 0,1% para elementos con $Z > 10$, y aproximadamente 1,0% en peso para los elementos más ligeros¹⁷². En EDX, la mayor parte de la emisión de rayos X se origina a partir de un volumen por debajo de la superficie de la muestra. En el análisis presentado aquí (Tabla 6.2.3.2 y Figura 6.2.3.8), la penetración de electrones calculada de los rayos X es de aproximadamente 7,3 μm .

Tabla 6.2.3.2: Datos del análisis composicional de la muestra de tejido muscular de cerdo.

Elemento	Series	Concentración	Concentración	Concentración	Concentración
		normalizada ^a (%peso)	atómica ^a (%peso)	normalizada ^b (%peso)	atómica ^b (%peso)
C	K α	54.48 1.92	61.19	52.88 1.77	59.3
N	K α	16.55 2.52	15.94	19.79 2.30	19.0
O	K α	25.38 1.23	21.40	24.23 1.15	20.4
Na	K α	0.35 0.08	0.21	0.36 0.07	0.21
Si	K α	0.05 0.04	0.02	-	-
P	K α	0.61 0.10	0.26	0.62 0.08	0.27
S	K α	0.83 0.10	0.35	0.72 0.08	0.30
Cl	K α	0.52 0.06	0.20	0.19 0.05	0.07
K	K α	1.23 0.08	0.43	1.22 0.08	0.42

^asin ablación láser.

^bDespués de la ablación láser (ver Figura 6.2.3.8).

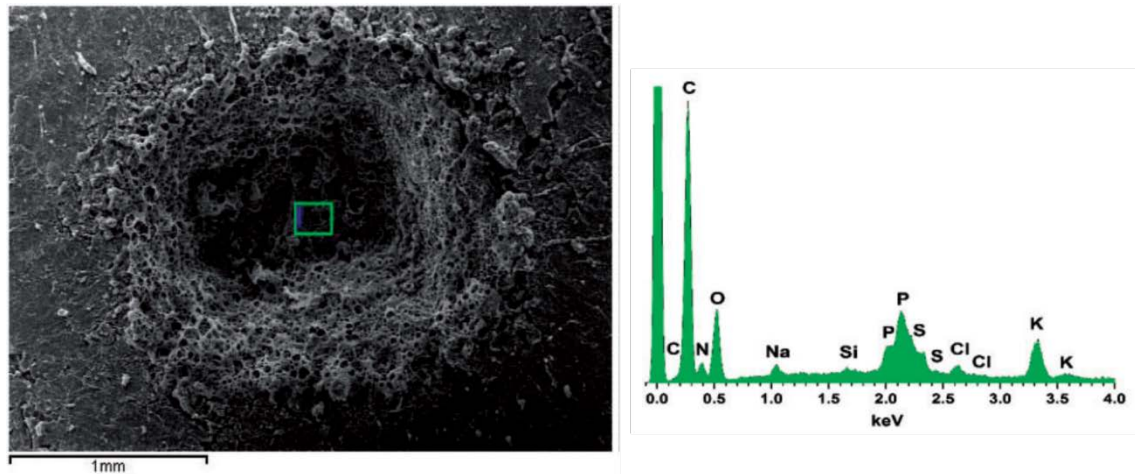


Figura 6.2.3.8: Micrografía electrónica de barrido que muestra características de la superficie ablacada en la muestra (75 Torr) y su correspondiente espectro de microanálisis EDX para el área indicada.

6.2.4. Conclusiones

Se ha investigado la dinámica de expansión de la pluma del plasma en una muestra de tejido de músculo porcino, ablacado por láser pulsado de CO₂ a 10.591 μm, a diferentes presiones de aire ambiente. Las mediciones se hicieron utilizando imágenes de fotografía de alta velocidad. La intensidad del láser se fijó a 1,1 GW·cm² y el aire ambiente circundante se varió desde vacío ($7,5 \cdot 10^{-5}$ Torr) a presión atmosférica. Los datos de imagen se utilizaron para generar gráficos de tiempo-posición 2D del frente del plasma luminoso. Se observaron efectos como la división de la pluma, el afilado y la detención en función de la presión del aire. La posición y la velocidad del frente de la pluma se determinaron y se ajustaron a una onda de choque o modelo de arrastre dependiendo de las condiciones de vacío. El perfil de la pluma dependía de la presión ambiental circundante. Se calculó la masa ablacada, aumentando a presiones bajas. También se estudió el efecto del número de disparos láser sobre el volumen del cráter a diferentes presiones de aire ambiente. Se examinaron los tejidos musculares de cerdo combinando SEM con EDX para visualizar y analizar diferentes regiones de la muestra.

6.2.5. Agradecimientos

Especial agradecimiento a todos los autores del artículo, Joaquín J. Camacho, Luis Díaz, Samuel Moncayo, y Jorge O. Cáceres. Este trabajo es una contribución al proyecto MICINN: CTQ2013-43086, que contó con el apoyo del DGICYT (España).

6.3. Caracterización resuelta en tiempo del plasma producido mediante LIBS.

Este trabajo está en proceso de escritura con la siguiente referencia bibliográfica:

“Time-resolved study of the laser-produced plasma from swine muscle tissue”. S. Moncayo, A. Marín-Roldán, J. J. Camacho, V. Motto-Ros & J.O. Cáceres.

Resumen

En este trabajo se investigan las características de emisión óptica del plasma producido por un láser de 1064 nm, con pulsos láser de 6-9 ns, en una muestra de tejido muscular de cerdo. Este estudio se ha realizado en colaboración con el Prof. Joaquín J. Camacho, de la UAM. Se utilizó una técnica complementaria para estudiar la morfología y la composición elemental de la muestra mediante SEM, combinada con EDX. La evolución temporal de la emisión óptica de la muestra liofilizada se estudió para comprender la dinámica de la formación del plasma, ablacionando con láser la muestra de músculo. El tejido del músculo esquelético de los cerdos ha sido seleccionado debido a su similitud en la composición fisiológica con tejidos musculares humanos. La evolución temporal de diferentes átomos y especies iónicas, tales como K, Mg, Mg⁺, H y O, así como las bandas moleculares del CN, ha sido investigada por espectroscopia de ablación láser resuelta en tiempo (LIBS) en condiciones de vacío medio (0,1 Pa). La densidad electrónica y la temperatura de vibración del CN han sido estudiadas en función del tiempo de retraso con respecto al pulso láser. La caracterización del plasma generado es el primer paso hacia el estudio de los elementos químicos fisiológicos del sistema humano musculo-esquelético.

6.3.1. Introducción a la caracterización resuelta en tiempo

En el campo de la aplicación médica, la composición fisiológica y química de los tejidos humanos ha tomado una gran importancia debido a su correlación con algunas patologías¹⁷³. La presencia de elementos inorgánicos en el tejido muscular puede considerarse como una indicación directa para el diagnóstico de una enfermedad eventual. Además, esta información proporciona pistas sobre los hábitos, la nutrición y otras condiciones ambientales de los individuos¹⁷⁴. En particular, el estudio químico del tejido del músculo esquelético es valioso en el análisis forense; donde algunos elementos pueden aportar evidencia para determinar el intervalo *post-mortem* (PMI) o la detección de elementos tóxicos en el organismo¹⁷⁵. Aunque existen diferentes técnicas analíticas capaces de obtener la composición elemental de muestras de tejido, como la espectroscopía de emisión atómica acoplada por inducción (ICP-AES)¹⁷⁶, la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) y la ablación con láser-ICP-MS¹⁷⁷, con una alta sensibilidad y bajos límites de detección, todas estas técnicas excepto LA-ICP-MS involucran procesos de química húmeda (disolución de la muestra) que requieren largos procedimientos de preparación de muestras. La espectroscopia de ablación láser (LIBS) proporciona ventajas significativas sobre los métodos convencionales: preparación de muestras mínima, análisis a presión atmosférica, mayor resolución espacial (rango μm), análisis mínimamente destructivo y sensibilidad a nivel de ppm¹⁸. Aunque la técnica LIBS se ha utilizado tradicionalmente para el estudio de materiales inorgánicos, el interés en analizar diferentes materiales orgánicos ha aumentado rápidamente debido a su posible aplicación en diferentes áreas de investigación, como microbiología, medicina forense³⁹, aerosoles biológicos, pólenes, cepas bacterianas⁷⁴, muestras de hongos¹⁷⁸ o agentes biológicos, entre otros. La dificultad para el análisis de materiales orgánicos surge del hecho de que estos compuestos son similares desde el punto de vista de la composición elemental. Cuatro elementos básicos, C, H, O y N, están siempre presentes y proporcionan la base común de los materiales orgánicos. Todavía se requiere una investigación detallada de las características del plasma de tejido muscular inducido por láser para optimizar las condiciones experimentales, lo que conduce a obtener mediciones adecuadas de emisión del plasma, apropiadas para el análisis LIBS.

La ablación láser depende de las propiedades termo-físicas de la muestra y de los parámetros del haz láser, y la física del proceso es bastante compleja y aún no está completamente entendida⁶¹. La formación, excitación y evolución del plasma no sólo dependen de las características químicas y físicas de la muestra, sino también de los parámetros láser (duración del pulso, longitud de onda y fluencia). En el trabajo anterior se estudió la evolución espacio-temporal del plasma de muestras de tejidos musculares inducido por un láser pulsado de CO₂ de alta potencia y con atmósfera excita transversal (TEA), en condiciones de vacío y se midieron parámetros plasmáticos tales como la densidad y temperatura electrónicas del análisis temporal de diferentes especies¹²⁴.

El presente trabajo tiene como objetivo discutir los procesos inducidos por la ablación láser mediante un láser pulsado de Nd:YAG sobre músculo esquelético de cerdo, para establecer los mecanismos responsables de la emisión del plasma, y compararlos con los espectros del plasma de CO₂. La radiación emitida por el plasma inducido por láser se ha caracterizado mediante la determinación de sus parámetros físicos, tales como la temperatura de excitación y la densidad electrónica. La expansión de la pluma y la formación de diversas especies atómicas, iónicas y moleculares se han estudiado con diferentes tiempos de retraso con respecto al comienzo de la ablación por láser. La densidad electrónica se calculó y se comparó con las intensidades de línea de una línea de oxígeno atómico y la emisión del H_α, por medio del ensanchamiento Stark. También se obtuvieron mediciones de la evolución temporal del magnesio y del potasio, haciendo un diagnóstico del plasma producido en términos de las especies químicas emisoras y evaluando los posibles mecanismos de excitación y formación del plasma. Finalmente, las emisiones moleculares de la banda CN también fueron estudiadas temporalmente, y la temperatura vibratoria efectiva fue calculada en función del tiempo de retraso. Para estudiar la morfología, la homogeneidad y la composición elemental del tejido se empleó la técnica de análisis SEM-EDX.

6.3.2. Procedimiento experimental

Preparación de las muestras y análisis inicial mediante SEM combinada con EDX

La preparación de la muestra ha sido previamente descrita en el epígrafe 6.2.2, por lo que sólo se presentan las condiciones experimentales relevantes para este estudio. Se utilizaron muestras de carne de dos cerdos, seleccionados aleatoriamente de la población de consumo diario, obtenida de un matadero industrial con licencia. Con el fin de disminuir el impacto de la heterogeneidad espacial en las muestras, se liofilizaron los tejidos⁷⁹, y se trituraron 250 mg de tejido en un mortero de ágata durante 5 min, y, posteriormente, se comprimieron en una pastilla compacta usando una prensa hidráulica a 10 Ton/cm². El grosor y el diámetro de las pastillas eran de aproximadamente 2 mm y 13 mm, respectivamente, con una densidad de 0,93 g/cm³. Las pastillas se analizaron directamente sin preparación adicional. La morfología y composición química elemental de la muestra de músculo porcino se estudiaron mediante SEM equipado con un analizador EDX. La heterogeneidad espacial de las diferentes concentraciones elementales en los tejidos biológicos es un fenómeno bien conocido que se puede observar fácilmente mediante el análisis SEM-EDX (Figura 6.3.2.1). El análisis mediante SEM se llevó a cabo utilizando un microscopio (Hitachi S-3000N). Los análisis EDX se realizaron con un analizador EDX adjunto (Oxford Instruments INCAx-sight). El límite de detección mínimo de un analizador EDX es aproximadamente 0,1% para elementos con $Z > 10$ y aproximadamente 1,0% en peso para elementos más ligeros¹⁷².

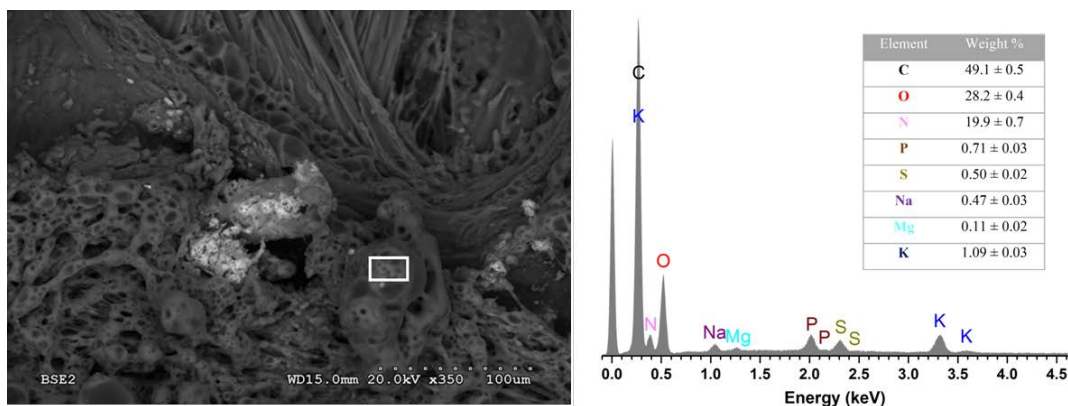


Figura 6.3.2.1: (izquierda) Vista ampliada de la muestra de cerdos liofilizados mediante SEM; (derecha) Espectro EDX de la muestra de músculo porcino y %peso del elemento (tabla insertada).

Configuración experimental LIBS

La configuración experimental y el equipo utilizado se han descrito en el Capítulo 4. Se utilizó un láser Nd: YAG de conmutación Q (Litron LPY707G-10) que funcionaba a 1064 nm con una duración de pulso de 6-9 ns y una frecuencia de repetición de 3 Hz típicamente para la ablación con láser y la formación de plasma. El haz láser se centró en la superficie de las muestras mediante una lente de enfoque de cuarzo de 20 cm de longitud focal. El diámetro estimado del cráter cuasi-circular producido por un pulso en la superficie de la muestra era aproximadamente de 300 μm . La muestra se montó en un posicionador de translación XY y rotación, que proporcionó una superficie nueva para cada disparo láser. Todas las mediciones LIBS se realizaron en una cámara de medio-alto vacío, con una presión base de 0,1 Pa ($7,5 \cdot 10^{-4}$ mmHg). La energía de salida del láser en la superficie de la muestra se atenuó (a 150 mJ), utilizando un atenuador óptico variable motorizado mediante un polarizador de cavidad extra y una placa de media onda. Se colocó un medidor de energía piroeléctrica antes y después de la lente para estimar las pérdidas de energía. La luz de la emisión del plasma se recogió perpendicularmente al haz láser incidente a una distancia fija a lo largo del eje del plasma. La emisión óptica de la pluma del plasma se visualizó mediante un sistema óptico de recogida sobre la ranura de entrada de diferentes espectrómetros. Para los estudios de emisiones ópticas integradas en el tiempo y resueltas en el tiempo, se utilizó un espectrómetro de triple malla de 0,5 m (2400, 1800 y 1200 líneas/mm) (Shamrock 500i). El sistema de detección fue acoplado a una cámara ICCD (Andor iStar DH734). Para las mediciones resueltas en tiempo, el detector ICCD se sincroniza con el disparador del pulso láser, ajustando los tiempos de medida y retraso. Además, se utilizó una lámpara halógena estándar para calibrar la respuesta de intensidad del sistema de detección.

6.3.3. Resultados

Resultados del análisis mediante SEM-EDX

Con el fin de obtener más información sobre la morfología y la composición elemental de la muestra de tejido de cerdo, también se realizó un análisis mediante SEM-EDX. El microanálisis EDX de esta muestra proporcionó la composición elemental en términos de porcentaje en peso de cada elemento. El músculo esquelético es un tejido blando

con una estructura estriada, formada por microtúbulos. Sin embargo, la Fig. 6.3.2.1 (izquierda) no representa la estructura estriada del músculo esquelético, ya que las muestras han sido sometidas a un proceso de liofilización y trituración, buscando la homogeneidad de la misma. Como se muestra en la imagen SEM, esta homogeneidad no es completa, evidenciando fibras estriadas, tubulares y multinucleadas. Como se observa en la Fig. 6.3.2.1 (derecha), en el espectro del microanálisis de la superficie indicada la mayor contribución fue de elementos como C, N y O, mientras que Na, Mg, P, S y K estaban presentes en pequeña concentración. La tabla insertada en la Fig. 6.3.2.1 (derecha) ilustra la composición elemental analizada de la muestra de músculo de tejido de cerdo. Estos resultados fueron consistentes con los espectros LIBS, en los que se observaron las emisiones de los elementos inorgánicos. Otros elementos, como el H (imposible de detectar por EDX), Si, Cl, Zn, etc., fueron detectados por LIBS y en diferentes regiones de la muestra. Las concentraciones de todos los elementos coinciden con la composición de un tejido blando animal deshidratado.

Resultados obtenidos mediante LIBS

La interacción entre la radiación láser enfocada y la muestra de tejido muscular depende de numerosas variables relacionadas con el láser y la muestra ablacionada. Estas variables incluyen la longitud de onda del láser, la forma temporal del pulso láser, la intensidad del láser (densidad de potencia o irradiancia), entorno del gas ambiente, absorción óptica, propiedades del tejido biológico, etc. Si la irradiancia del láser en el volumen focal del sistema formado por la muestra vaporizada y el entorno que lo rodea es mayor que el umbral de ablación, se forma una pluma de plasma.

- Comparación entre espectros obtenidos mediante láseres de Nd:YAG y CO₂:

Espectro de emisión de baja resolución típico (20 μ s) obtenido por irradiación láser de alta potencia a dos longitudes de onda, a $\lambda = 1064$ nm (Nd-YAG, 6-9 ns, energía 150 mJ, energía de pulso 19 MW, densidad de potencia o irradiancia 27 GW \cdot cm⁻², frecuencia de repetición 3 Hz, área focalizada 7.1 \cdot 10⁻⁴ cm²) y $\lambda = 10.591$ μ m (TEA-CO₂, 60-70 ns, energía 620 mJ, área del punto focalizado 7.9 \cdot 10⁻³ cm², densidad de potencia 1,2 GW \cdot cm⁻², frecuencia de repetición 1 Hz)¹²⁴ se comparan en la Fig. 6.3.3.1. En estas condiciones, aunque

el láser de TEA-CO₂ tiene mayor energía que el láser de Nd:YAG, la intensidad del láser o la irradiancia es menor debido a los diferentes puntos focales en la superficie de la muestra.

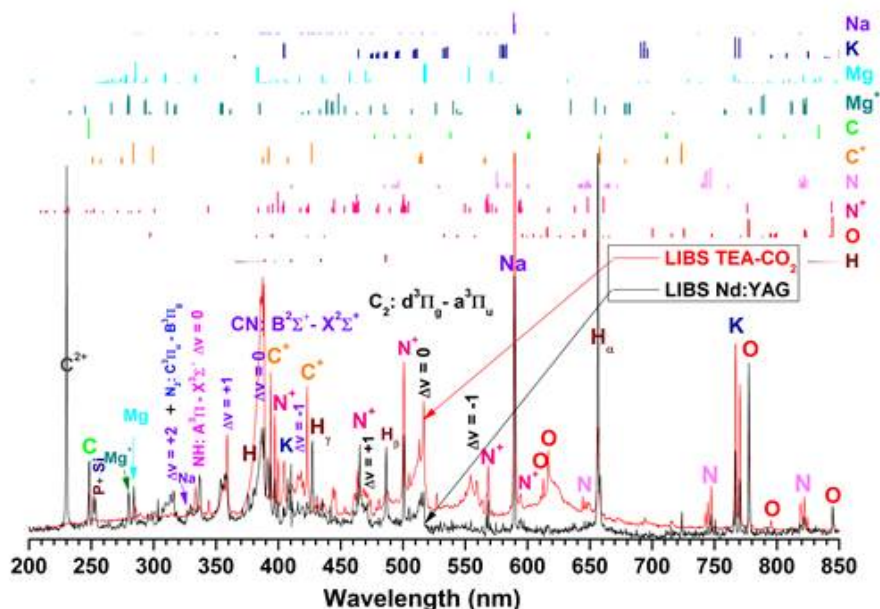


Figura 6.3.3.1: Espectros de emisión óptica de una muestra de músculo porcino liofilizado obtenidos mediante dos láseres diferentes (Nd:YAG a 1064 nm y TEA-CO₂ a 10.591 μ m) y comparación con las posiciones de línea atómica/iónica e intensidades relativas listadas en NIST.

Los espectros se comparan con las posiciones de la línea atómica/iónica y las intensidades relativas de Na, K, Mg, Mg⁺, C, C⁺, C²⁺, N, N⁺, O y H enumeradas en NIST⁹⁶. Un hecho notable es la baja influencia de la longitud de onda del láser en las líneas espectrales observadas y las bandas moleculares, como OH, NH, C₂ y CN. Este comportamiento es una consecuencia del origen de las colisiones electrónicas del fenómeno de descomposición inducido por láser. La coincidencia de diferentes posiciones de las líneas espectrales es muy alta. La intensidad de ciertas líneas iónicas (por ejemplo la línea C²⁺ a 229.687 nm) es mayor para el láser de Nd:YAG que para el láser de CO₂ debido a la mayor densidad de potencia láser utilizada. Los espectros del plasma del músculo porcino están dominados por la emisión de Na, K y H atómicos y excitados, y características moleculares de la banda CN (B² Σ^- - X² Σ^+)¹²⁴. La emisión medio-débil se debe principalmente a la excitación de átomos de C, O, Mg, N, y fragmentos iónicos de Mg⁺, Mg²⁺, C⁺, C²⁺, O⁺, O²⁺, N⁺, y características de las bandas moleculares C₂ (d³ Π_g - a³ Π_u), NH (A³ Π - X³ Σ), CH (B² Σ^- ; A² Δ - X² Π) y OH (A² Σ^+ - X² Σ^+). También se detectan otros sistemas de bandas moleculares débiles de N₂, N²⁺ y CaOH.

Con el fin de obtener más información sobre el plasma de la muestra producido por láser y obtener una asignación inequívoca de la emisión, hemos escaneado los espectros a alta resolución, lo cual fue suficiente para distinguir claramente entre casi todas las líneas observadas. Los espectros se han obtenido con exposiciones sucesivas en la cámara ICCD en el intervalo espectral 190 - 900 nm. Como ejemplo, la Figura 6.3.3.2 muestra un espectro integrado en el tiempo (20 μ s) registrado en el experimento de ablación de la muestra. Se observa una estructura bastante compleja, como consecuencia de la superposición entre diferentes líneas atómicas/iónicas.

- Evolución temporal de la emisión óptica desde el plasma:

La espectroscopia de ablación láser resuelta en el tiempo (TR-LIBS) es la técnica más conocida para reducir el nivel de ruido relacionado con las emisiones continuas de fondo, que se basa en el hecho de que el continuo de fondo se desintegra más rápidamente con el tiempo que las líneas espectrales⁶¹. En este método, los datos se adquieren con un tiempo de retraso específico (t_d) después del inicio del pulso láser, usando sistemas de detección cerrados, por ejemplo, un ICCD o un conjunto de fotodiodos intensificado. En el método TR-LIBS, la selección de un tiempo de medida y un tiempo de retraso apropiados para cada línea espectral depende en gran medida de la longitud de onda y la intensidad del láser, así como de las propiedades físicas y químicas de la muestra. Las condiciones experimentales durante la ablación con láser pueden reducir considerablemente la reproducibilidad de las mediciones⁶¹. La evolución temporal de la emisión óptica del plasma inducido en el tejido del músculo porcino se registró a diferentes tiempos de retraso después de la interacción láser-muestra en un ancho temporal de 0,1 μ s, con un tiempo de medida constante de 0,1 μ s. El aumento del pulso láser se consideró el origen de la escala de tiempo, $t = 0$ μ s. Se caracterizó el comportamiento temporal de varias líneas de emisión de Mg^+ , K, O y H. La Figura 6.3.3.2 muestra los espectros de alta resolución para Mg^+ en la región de 279 - 281 nm a un tiempo de retraso que varía de 0 a 0,8 μ s y una energía láser de 125 mJ. Este intervalo espectral se seleccionó para detectar especies de Mg^+ ionizadas ($3p^2P_{3/2,1/2} \rightarrow 3s^2S_{1/2}$). Los niveles bajos de Mg están relacionados con un mayor riesgo de un síndrome metabólico, diabetes mellitus tipo 2, hipertensión y arteriosclerosis¹⁷⁹. Como se observa, a tiempos de retraso cortos hay una contribución significativa del continuo en la emisión global. A

aproximadamente $0,3 \mu\text{s}$ el espectro está dominado por la emisión de las líneas espectrales de Mg^+ , ya que la emisión de continuo sufre una rápida reducción debido a la recombinación entre electrones libres e iones con una importante reducción de la emisión de *Bremsstrahlung*.

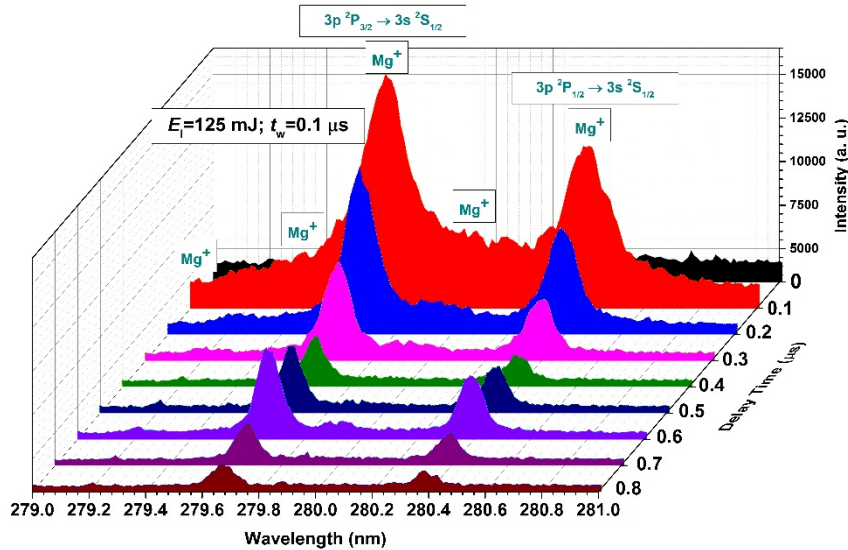


Figura 6.3.3.2: Espectro de emisión resuelto en tiempo para el doblete de la línea de Mg^+ en función del tiempo de retraso para un tiempo de medida fijo de $0,1 \mu\text{s}$.

A tiempos de retraso más tempranos ($t_d = 0 \mu\text{s}$), las líneas atómicas se ocultan bajo el continuo. Para retrasos más largos, las señales disminuyen debido al enfriamiento del plasma. En el medio, la relación señal/ruido se mejora y permite la detección de líneas de baja intensidad. La señal comienza a aparecer alrededor de $0,1 \mu\text{s}$, mientras que a $0,6 \mu\text{s}$ la muestra presenta la mejor relación señal/ruido.

La Figura 6.3.3.3 muestra la evolución temporal del plasma del espectro del tejido en dos regiones espectrales $765 - 771 \text{ nm}$ y $776,6 - 778 \text{ nm}$ a diferentes tiempos de retraso, con un tiempo de integración de $0,1 \mu\text{s}$ (energía láser 125 mJ). Estos rangos espectrales se seleccionaron para detectar la emisión de otros elementos importantes desde el punto de vista médico, como son el K y el O. La Figura 6.3.3.3 (izquierda) muestra en detalle la evolución dinámica de las líneas del doblete de K correspondientes a la transición electrónica $4p \text{ } ^2\text{P}^0_{3/2,1/2} \rightarrow 4s \text{ } ^2\text{S}_{1/2}$. La emisión de potasio aparece a $0,1 \mu\text{s}$ y su emisión disminuye fuertemente como consecuencia de la expansión y enfriamiento del plasma, y a $0,4 \mu\text{s}$

desaparece el *bremstrahlung*, detectándose la emisión hasta 3,0 μs . La Figura 6.3.3.3 (derecha) muestra el perfil temporal del doblete de oxígeno ($2s^2 2p^3 (^4S_0) 3p^5 P_{3,2} \rightarrow 2s^2 2p^3 (^4S_0) 3s^5 S_2$). En las primeras etapas del plasma ($<0,3 \mu\text{s}$) sólo se observa una línea de oxígeno ampliada debido a la alta densidad y temperatura electrónicas. Sin embargo, a tiempos de retraso superiores a 0,4 μs es posible observar la estructura fina de dos transiciones electrónicas como resultado de una menor densidad electrónica y el enfriamiento del plasma. La emisión del oxígeno disminuye fuertemente, siendo detectada sólo aproximadamente a un tiempo de retraso de aproximadamente 1,5 μs .

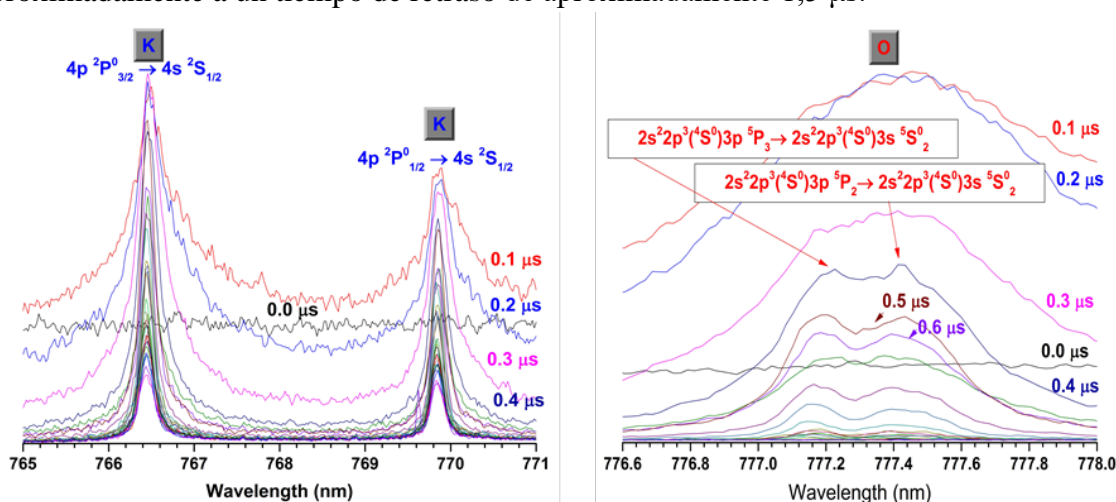


Figura 6.3.3.3: Espectro de emisión resuelto en tiempo a diferentes tiempos de retraso con un tiempo de medida fijo de 0,1 μs , para (izquierda) K; (derecha) O.

- Densidad electrónica:

El estudio temporal de la emisión del plasma en función del tiempo de retraso permite obtener la evolución de la densidad electrónica, tras la expansión y decaimiento del plasma. El conocimiento de la densidad electrónica es fundamental para entender los procesos de excitación e ionización. Utilizando la aproximación de equilibrio termodinámico local (LTE), cuando la distribución de electrones libres sigue las ecuaciones de Maxwell, suponiendo que las tasas de depoblación radiativa son despreciables comparadas con las tasas de depoblación colisionales, las densidades de población de los estados electrónicos de especies atómicas e iónicas son descritas por las distribuciones de Boltzmann, y la intensidad de las líneas espectrales es una medida de la población del nivel de energía correspondiente. La evolución temporal de los espectros en función del retraso mostró ensanchamiento de las líneas. Es bien sabido que el mecanismo de ensanchamiento Stark es el principal mecanismo responsable de la ampliación de la línea y del desplazamiento de la

longitud de onda del pico. Existen varios tipos de mecanismos que pueden ampliar una línea de emisión, siendo los más importantes el efecto Doppler (contribución ≈ 0.05 nm) y el ensanchamiento instrumental (contribución ≈ 0.01 nm). La anchura de línea Stark se extrajo del ancho experimental de la línea, restando el ensanchamiento de línea instrumental y Doppler. El ensanchamiento Stark se debe a la colisión de los átomos emisores con especies cargadas como el electrón y los iones. El ancho total a la mitad del máximo (FWHM) de la línea ampliada Stark $\Delta\lambda_{FWHM}^S$ está relacionado con la densidad electrónica (n_e en cm^{-3}). En este trabajo se calculó la densidad electrónica mediante dos métodos, utilizando el ensanchamiento Stark de la línea Balmer de Hidrogeno (H_α) a 656,3 nm (Ecuación 6.3.3.1) y con la ecuación de líneas no hidrogenoides, como la emisión a 777,4 nm (Figura 6.3.3.4 (derecha)) (Ecuación 6.3.3.2). La densidad electrónica n_e en cm^{-3} para la línea de Balmer del hidrógeno está relacionada con el ensanchamiento Stark lineal en $\Delta\lambda_{FWHM}^S$ en Å mediante la siguiente expresión:

$$n_e = 8.02 \times 10^{12} \left(\frac{\Delta\lambda_{FWHM}^S}{\alpha_{1/2}} \right)^{3/2} \quad \text{Ecuación 6.3.3.1}$$

donde $\alpha_{1/2}$ es la anchura a mitad del perfil reducido Stark en Å. Este parámetro $\alpha_{1/2}$ depende ligeramente de la temperatura de excitación y de la densidad electrónica. En este caso, los valores de $\alpha_{1/2}$ se tomaron de las tablas dadas por Griem⁹¹. Para los átomos o iones no similares al H, la FWHM de una línea ensanchada Stark está relacionado con la n_e en cm^{-3} por la expresión aproximada:

$$\Delta\lambda_{FWHM}^S = 2W \left(\frac{n_e}{n_{ref}} \right) \quad \text{Ecuación 6.3.3.2}$$

siendo W el parámetro de impacto electrónico en Å, también ligeramente dependiente de la temperatura de excitación. En la Ecuación 6.3.3.2, se omitió el efecto de ensanchamiento del impacto iónico. La densidad electrónica de referencia n_{ref} debe elegirse dependiendo de la especie considerada, siendo $n_{ref} = 1016 \text{ cm}^{-3}$ para los átomos y 1017 cm^{-3} para las especies ionizadas. La figura 6.3.3.4 muestra la evolución temporal de la densidad electrónica para diferentes retrasos (tiempo de medida de 0,1 μs) utilizando las dos líneas mencionadas H_α y

O. Las imágenes insertadas muestran dos espectros para O (777,4 nm) a 0,1 μs y 2,0 μs y el correspondiente ajuste a una función Voigt.

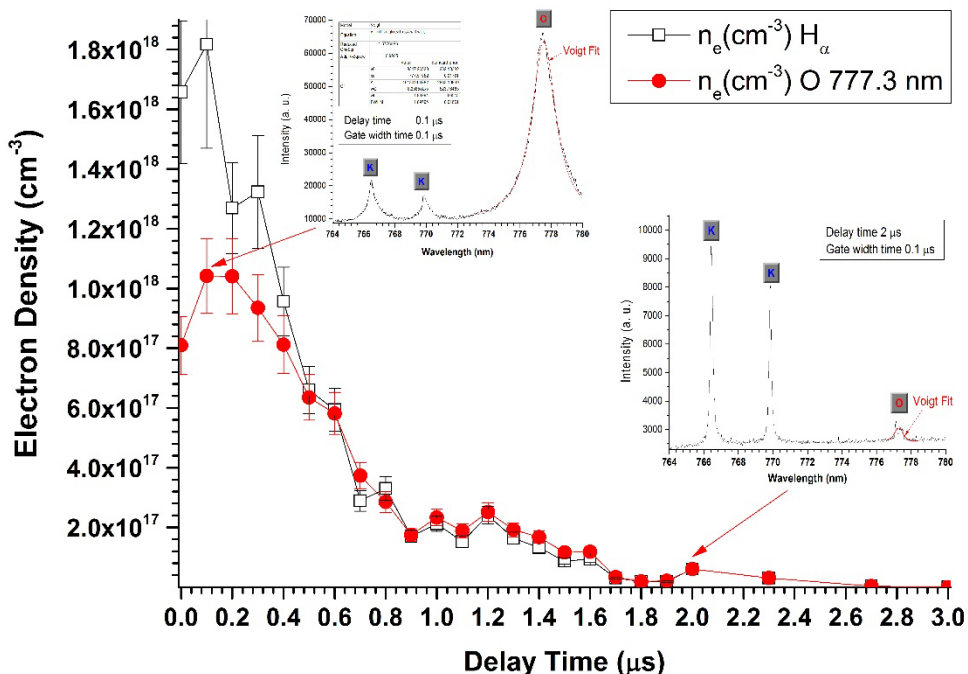


Figura 6.3.3.4: Densidad electrónica calculada mediante el ensanchamiento Stark de las líneas O y $\text{H}\alpha$ en función del retraso en la detección.

Los errores previstos para la n_e consideraron la incertidumbre en los parámetros de ensanchamiento por impacto y la ampliación de las líneas. Vemos que el triplete O ($2s^22p^3$ ($^4\text{S}_0$) $^5\text{P}_{3,2,1} \rightarrow 2s^22p^3$ ($^4\text{S}_0$) $^5\text{S}_0$) centrado a $777,4 \text{ nm}$ se resuelve parcialmente con retrasos elevados. Las mediciones se realizaron a partir de la región espectral $651\text{-}664 \text{ nm}$ para el $\text{H}\alpha$ (no mostrado) y de la región mostrada en la Figura 6.3.3.4 (derecha). La densidad electrónica inicial a $0,002 \mu\text{s}$ era de aproximadamente $8,0 \cdot 10^{17} \text{ cm}^{-3}$ para el ensanchamiento Stark del O, y $1,6 \cdot 10^{18} \text{ cm}^{-3}$ para el $\text{H}\alpha$. Después, la densidad aumenta hasta $1,0 \cdot 10^{18} \text{ cm}^{-3}$ (O) y $1,8 \cdot 10^{18} \text{ cm}^{-3}$ ($\text{H}\alpha$) hasta $0,1 \mu\text{s}$, y luego disminuye lentamente a medida que aumenta el tiempo. Para tiempos $> 0,5 \mu\text{s}$, las densidades electrónicas calculadas para las líneas de O y $\text{H}\alpha$ ensanchadas por Stark son muy similares y disminuyen rápidamente. La disminución de la n_e se debe principalmente a la recombinación entre electrones e iones en el plasma. La alta densidad obtenida a partir de la línea del H a bajos retrasos ($< 0,4 \mu\text{s}$) respecto a la línea del O puede deberse a una sobrestimación en el cálculo mediante la Ecuación 6.3.3.1.

Cabe mencionar que la densidad electrónica n_e de la pluma del plasma utilizando un láser Nd:YAG es mayor que la observada bajo la excitación con un láser de CO₂¹²⁴. La condición para la descomposición óptica se considera que ocurre cuando la densidad numérica de los electrones producidos es igual a la densidad crítica para la longitud de onda del láser. Cuando la intensidad del láser es lo suficientemente alta como para causar una pluma de plasma, el pulso láser se calienta, se funde, vaporiza, atomiza e ioniza el material en una capa justo encima de la superficie, calentando y ionizando parte del material evaporado. Cuando el plasma está débilmente ionizado, parte de la energía del láser continúa a través de la superficie y parte es absorbida en el plasma. A una energía suficientemente alta, el plasma puede volverse opaco al rayo láser y la superficie está protegida, mientras que el frente de plasma crece hacia el láser. Esto ocurre cuando la frecuencia del plasma es mayor que la frecuencia del láser, o en términos de la densidad electrónica crítica n_e^{cri} :

$$n_e^{cri} [cm^{-3}] = \frac{m\varepsilon_0\omega^2}{e^2} \approx \frac{1.1 \cdot 10^{21}}{\lambda^2 [\mu m]} \quad \text{Ecuación 6.3.3.3}$$

donde m es la masa de un electrón, e es la carga del electrón, ε_0 es la permitividad en el vacío y ω es la frecuencia del láser, que es igual a la frecuencia del plasma electrónico. Todos los procesos anteriores requieren irradiación láser en la superficie de la muestra más grande que el umbral de ablación. Cuando la densidad electrónica excede la n_e^{cri} , la muestra no es transparente al láser. Para el láser de CO₂, que trabaja a $\lambda = 10,6 \mu m$ ($\omega = 1,78 \cdot 10^{14} s^{-1}$) $n_e^{cri} = 1019 cm^{-3}$, mientras que para el Nd:YAG a $1,064 \mu m$ ($\omega = 1,78 \cdot 10^{15} s^{-1}$) $n_e^{cri} = 1021 cm^{-3}$. En consecuencia, la densidad electrónica crítica para el láser de Nd:YAG a $1.064 \mu m$ es dos órdenes de magnitud mayor que para el láser de CO₂. Sin embargo, el área del punto óptico del láser de CO₂ a $10,6 \mu m$ en la superficie de la muestra es mayor que para el láser de Nd:YAG a $1,064 \mu m$ y, por lo tanto, para una misma energía láser, la irradiación es menor. Estos contrastes en las propiedades de los láseres pueden explicar las diferencias en las densidades electrónicas medidas.

- Temperatura vibracional:

Los espectros de emisión de moléculas diatómicas revelan una estructura relativamente compleja, que se debe a la combinación de transiciones electrónicas de diferentes estados

rovibracionales¹⁸⁰. Con el fin de identificar aún más algunas propiedades del tejido del músculo porcino, se han estimado las temperaturas vibracionales en función del tiempo de retraso. Se analizaron las intensidades de emisión de la secuencia de la banda CN ($B^2\Sigma^+ - X^2\Sigma^+$, $\Delta v = 0$) para calcular la temperatura vibratoria molecular (T_{vib}). Para el plasma en LTE, la intensidad $I_{v'-v''}$ de una banda vibratoria individual $v'-v''$ viene dada por:

$$\ln \left(\frac{I_{v'-v''} \cdot \lambda_{v'-v''}^4}{q_{v'-v''}} \right) = A - \frac{G(v') h c}{k_B T_{vib}} \quad \text{Ecuación 6.3.3.4}$$

donde A es una constante, $\lambda_{v'-v''}$ es la longitud de onda de emisión correspondiente a la cabeza de la banda, $q_{v'-v''} = \left| \int_0^\infty \Psi_{v'}(R) \Psi_{v''}(R) dR \right|^2$ es el factor de Franck-Condon, $\frac{G(v') h c}{k_B}$ es la energía vibracional normalizada del nivel de vibración superior (v'), K_B es la constante de Boltzmann, h es la constante de Planck y c la velocidad de la luz³³. El valor del término $G(v')$ (en cm^{-1}) corresponde al nivel vibracional del estado electrónico superior ($B^2\Sigma^+$), y se puede calcular utilizando la siguiente relación:

$$G(v) = \frac{E_{vib}}{hc} = \omega_e \left(v + \frac{1}{2} \right) - \omega_e x_e \left(v + \frac{1}{2} \right)^2 + \omega_e y_e \left(v + \frac{1}{2} \right)^3 + \dots \quad \text{Ecuación 6.3.3.5}$$

donde E_{vib} es la energía vibracional y ω_e , $\omega_e x_e$, $\omega_e y_e$, etc., son las constantes espectroscópicas vibratorias. En el siguiente conjunto de experimentos, se ha estudiado la variación temporal de las propiedades del plasma del tejido del tejido muscular de cerdo, producido en las mismas condiciones experimentales que se discutió anteriormente. La Figura 6.3.3.5 muestra el sistema de la banda CN ($B^2\Sigma^+ - X^2\Sigma^+$, $\Delta v = 0$) registrado a diferentes tiempos de retraso (t_d) de 0,1 a 3 μs para un tiempo de medida constante (t_w) de 0,1 μs , recogido a una distancia de la muestra de 2 mm y la energía láser de 150 mJ. El ajuste lineal a $\ln \left(\frac{I_{v'-v''} \cdot \lambda_{v'-v''}^4}{q_{v'-v''}} \right)$, en función de la energía de vibración electrónica normalizada superior $\frac{G(v') h c}{k_B}$ tiene una pendiente igual a $-1/T_{vib}$. A tiempos anteriores ($t_d \leq 0,1 \mu\text{s}$) se detectan emisiones del sistema de banda violeta CN ($B^2\Sigma^+ - X^2\Sigma^+$, $\Delta v = 0$), y no se observa emisión alguna de Mg. A medida que el tiempo evoluciona ($t_d > 0,1 \mu\text{s}$), la emisión del CN aumenta hasta un máximo de 0,5 μs y después de eso, la intensidad disminuye. La emisión molecular del CN disminuye rápidamente para tiempos de retraso más altos ($t_d > 3 \mu\text{s}$), detectándose

hasta $\approx 6 \mu\text{s}$ (energía láser 125 mJ). También se detectaron algunas líneas atómicas de Mg pero no se observaron en 0,1 μs , siendo su máximo en 0,5 μs . Como antes, a corto plazo hay una importante contribución de la emisión de continuo en la emisión global, que se descompone con el tiempo. A aproximadamente 1 μs , la emisión de continuo es prácticamente insignificante.

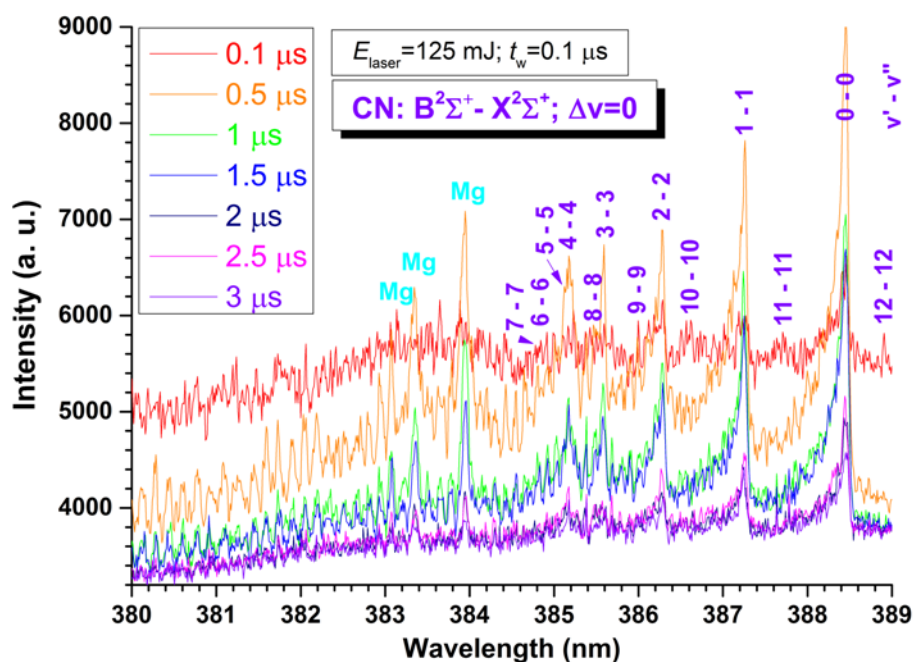


Figura 6.3.3.5: Evolución temporal del sistema B-X ($\Delta v = 0$) de la banda CN.

El gráfico de Boltzmann de las intensidades de la banda CN B-X ($\Delta v = 0$) frente a la energía vibratoria normalizada (energía láser de 125 mJ y a 2 mm de la muestra) se da en la Figura 6.3.3.6. Además, se muestra un ajuste lineal a los datos, los factores de Franck-Condon para esta secuencia de bandas y el espectro integrado en el tiempo utilizado en el cálculo. La temperatura de vibración media estimada fue de 3800 ± 200 K.

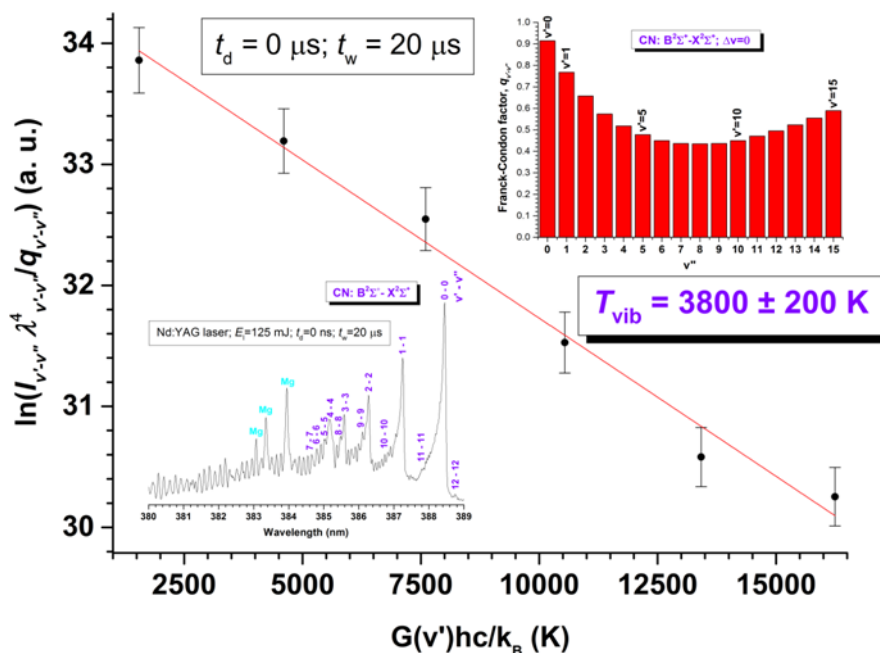


Figura 6.3.3.6: Gráfica de Boltzmann de la intensidad de la banda CN B-X ($\Delta v = 0$) frente a la energía normalizada del nivel de vibración superior. La gráfica también muestra el ajuste lineal de los datos, los factores Franck-Condon correspondientes y el espectro integrado en el tiempo utilizado para el cálculo.

La Figura 6.3.3.7 muestra la evolución temporal de la temperatura vibracional del CN, junto con la densidad electrónica para diferentes tiempos de retraso con respecto a la incidencia del pulso láser. Las barras de error estimadas se deben a la incertidumbre en las intensidades de banda, las energías vibracionales y los factores de Franck-Condon para las temperaturas vibracionales, y la incertidumbre en los anchos experimentales y el parámetro de impacto electrónico para la densidad de electrones. La temperatura de vibración medida fue $3900 \pm 500 \text{ K}$ a $0,1 \mu\text{s}$. A $0 \mu\text{s}$ fue imposible estimar la temperatura vibracional del CN debido al intenso continuo. La temperatura vibracional muestra dos máximos a $0,4 \mu\text{s}$ ($T_{\text{vib}} = 7000 \pm 700 \text{ K}$) y $1 \mu\text{s}$ ($T_{\text{vib}} = 7200 \pm 700 \text{ K}$). Los diferentes componentes de la distribución de la temperatura vibracional para el CN pueden deberse a diferentes mecanismos de formación. Teniendo en cuenta la naturaleza orgánica del tejido del músculo porcino (que contiene el enlace CN nativo), como se esperaba, se observó emisión de CN en los primeros tiempos, correspondiente al primer máximo. La segunda podría estar asociada a la formación de CN en fase gaseosa a través de las reacciones $\text{C} + \text{N}_2 \leftrightarrow \text{CN} + \text{N}$, $\text{C}_2 + \text{N} \leftrightarrow \text{CN} + \text{C}$, entre otras, debido a la existencia de enlaces CN y a los *clusters* de carbono evaporados directamente desde la muestra. Estos procesos de formación podrían ser responsables de la

brecha entre la densidad electrónica y la temperatura vibracional (Figura 6.3.3.7). Además, se obtuvieron las temperaturas rovibracionales de las moléculas CN excitadas electrónicamente mediante la simulación de los espectros experimentales a diferentes tiempos de retraso. Los valores de temperatura estimados fueron muy similares a los obtenidos con el método de Boltzmann (Figura 6.3.3.8). Las evoluciones temporales de la densidad electrónica y la temperatura vibracional son de gran importancia, ya que muchos procesos dependen directa o indirectamente de estos parámetros.

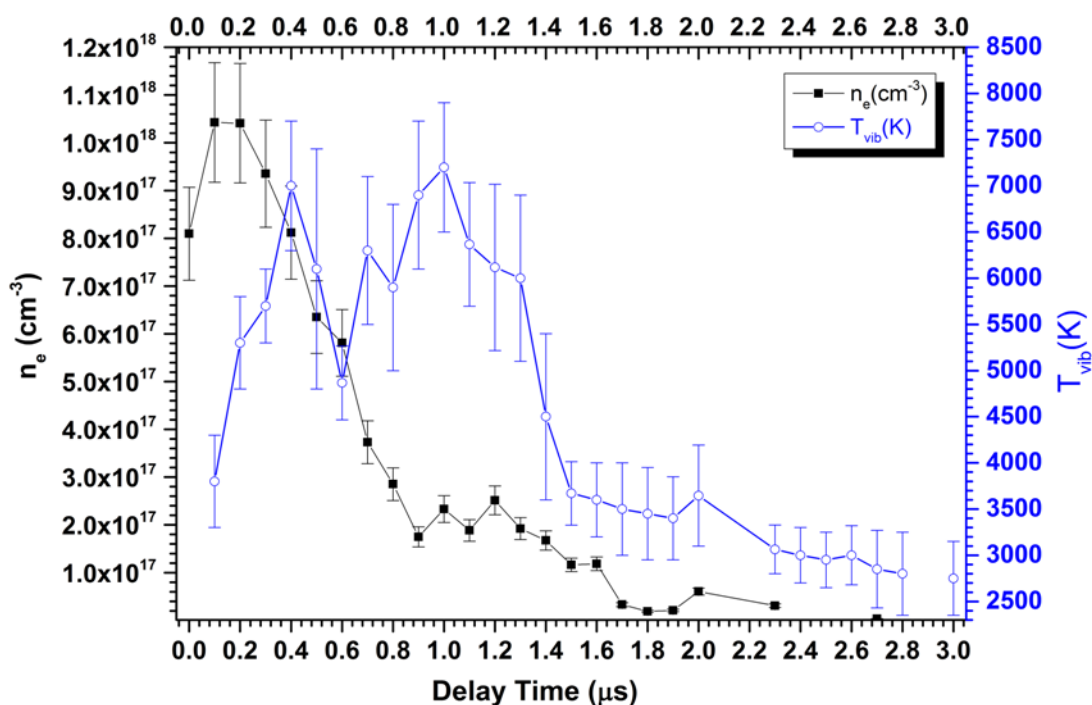


Figura 6.3.3.7: Evolución temporal de la temperatura vibracional y la densidad electrónica para diferentes tiempos de retraso, para la ignición del plasma a una energía del láser de 125 mJ.

Se observó un aumento en la intensidad de la emisión iónica y molecular con el aumento de la energía del láser. A altas energías del láser, el plasma es más energético y está más ionizado. En estas condiciones, la mayor absorción en el plasma de la muestra es causada por un *bremstrahlung* inverso, donde la sección transversal es proporcional a $\lambda^3 [1 - \exp(-h c / \lambda k_B T)]^{-1}$ o aproximadamente λ^2 , siendo T la temperatura electrónica durante la avalancha de electrones o crecimiento en cascada del plasma y λ la longitud de onda de excitación del láser.

6.3.4. Conclusiones

Se ha realizado un análisis resuelto en tiempo del plasma inducido por láser en muestras de músculo porcino en condiciones de vacío medio. La ablación de la muestra permite medir simultáneamente la emisión elemental y molecular para comprender los cambios temporales en las propiedades del plasma. Las emisiones observadas se deben principalmente a la relajación electrónica de los átomos excitados Na, K, H, C, O, Mg y N; los fragmentos iónicos Mg^+ , Mg^{2+} , Mg^{3+} , C^+ , C^{2+} , O^+ , O^{2+} , N^+ y las características moleculares de CN ($B^2\Sigma^+ - X^2\Sigma^+$), C_2 ($d^3\Pi_g - a^3\Pi_u$), NH ($A^3\Pi - X^3\Sigma^-$), $X^2\Pi$, $A^2\Delta - X^2\Pi$) y OH ($A^2\Sigma^+ - X^2\Sigma^+$). También se identifican otros sistemas de bandas débiles de N_2 , N_2^+ y CaOH. El plasma producido se formó usando un láser de Nd:YAG y se realizó una comparación con un láser de TEA-CO₂. Aunque en ambos espectros las especies son prácticamente iguales, las intensidades cambian debido a las diferentes condiciones de excitación. Se empleó SEM-EDX como técnica complementaria para proporcionar información sobre la morfología, homogeneidad y composición elemental de la muestra. Los principales esfuerzos de este trabajo se han concentrado en el estudio temporal del plasma producido por el láser de Nd:YAG. La determinación de la temperatura vibracional se ha realizado mediante el método de Boltzmann, utilizando bandas moleculares del CN, mientras que la estimación de la densidad electrónica se realizó utilizando el método de ensanchamiento Stark. Para los retrasos después del pulso láser a $t_d < 0,5 \mu s$, a 2 mm de la posición focal, el plasma se caracterizó por altas densidades electrónicas [$(18-6,0) \cdot 10^{17} \text{ cm}^{-3}$]. La densidad electrónica se calculó usando las líneas de H_α y O en diferentes tiempos de retraso. Se midieron los valores más altos de la densidad electrónica del plasma en el láser Nd:YAG con respecto al láser de CO₂.

6.3.5. Agradecimientos

Agradecemos el apoyo recibido en parte por el proyecto de la DGICYT (MINECO, España) CTQ2016-75880-P para esta investigación.

6.4. Estudio preliminar de estacionalidad en muestras dentales de fauna mediante LIBS

Este trabajo ha sido aceptado por la revista DigitAR, con la siguiente referencia bibliográfica:

“Estudio preliminar de estacionalidad utilizando dientes de fauna mediante análisis por espectroscopia de plasma inducido por láser”, A. J. Sánchez Flores, A. Marín-Roldán, J. Yravedra, J. O. Caceres, Proceeding, DigitAR, (en revisión).

Resumen

Los estudios de estacionalidad se han desarrollado durante mucho tiempo, con diferentes métodos, sin que ninguno de ellos haya demostrado ser resolutivo. El objetivo de este estudio preliminar es el de proporcionar una alternativa a los métodos directos estacionales con la aplicación de una nueva y pionera técnica láser: LIBS (*Laser Induced Breakdown Spectroscopy*). Se relata aquí la primera aplicación con respecto a la estacionalidad utilizando 54 DP4 de cerdos.

6.4.1. Introducción a la estacionalidad

Los estudios de estacionalidad aplicados al análisis de emplazamientos arqueológicos se centran en responder a cuestiones relativas al momento del año en el que se ocupó un yacimiento. Para ello, algunos autores⁶⁵ han sido divididas las técnicas de estudio de la estacionalidad en dos bloques: métodos indirectos y métodos directos.

- Métodos indirectos. Entre ellos, cabe destacar los siguientes:
 - 1) El análisis químico del suelo, que consiste en el estudio del sedimento para encontrar los rastros químicos de cualquier sustancia (excrementos, grasas animales, etc.) que dé información sobre marcadores estacionales particulares.
 - 2) La etología de los herbívoros y sus movimientos estacionales, como, por ejemplo, la movilidad que experimentan buscando pastos de montaña en verano y pastos en valles en invierno.
- Métodos directos. Se basan en el análisis de los restos de fauna presentes en el yacimiento:

- 1) Cornamentas de cérvidos
- 2) Erupción de piezas dentarias
- 3) Fusión de epífisis
- 4) Desgaste dentario
- 5) Crecimiento de la fauna (otolitos en los peces, las conchas de los moluscos o el cemento dentario).

Sin embargo, todas estas técnicas presentan limitaciones, ya que en algunos casos solo son aplicables a ciertos rangos de edad (emergencia de dientes y sustitución de piezas dentarias en individuos inmaduros; o cementocronología para individuos adultos) o bien solo sirven para ciertos sexos. Además, los resultados que ofrecen siguen mostrando una gran amplitud estacional (verano-otoño, invierno-primavera). Por tanto, aunque los estudios de estacionalidad se han desarrollado durante mucho tiempo, ninguno de ellos haya demostrado ser lo suficientemente resolutivo.

6.4.2. Procedimiento experimental

El análisis se ha llevado a cabo mediante un láser de Nd: YAG con Q-switch activo (Quantel, modelo Brio) que opera a 1064 nm, con una duración del pulso de 4 ns, un diámetro de haz de 4 mm y divergencia de 0,6 mrad. Las muestras se colocaron sobre un posicionador micrométrico X-Y-Z manual con una etapa de 0,5 mm de desplazamiento en cada coordenada para asegurar que cada pulso del láser incidía con precisión sobre el área seleccionada de la superficie dental. La energía del pulso se ajusta a 20 mJ, y la frecuencia a 1 Hz. El intervalo de longitudes de onda utilizado fue 180 a 940 nm mediante dos espectrómetros (Avantes Dual). El tiempo de integración del detector se ajustó a 20 ms. Además, para evitar la detección de bremsstrahlung, el detector se activa con un tiempo de retardo de 0.8 ms entre el pulso de láser y la adquisición del espectro.

6.4.3. Muestras

Las muestras utilizadas son dientes inferiores de cerdos (*Sus scrofa domestica*) infantiles que aún estaban insertas en el hueso alveolar. Se trata de muestras provenientes de cerdos criados en la comarca de La Moraña (Ávila). Las mandíbulas fueron sometidas a un

proceso de descarnación en el matadero. A continuación, se dejaron limpiar mediante métodos naturales de exposición al aire libre durante un periodo de seis meses y luego se procedió a su estudio en el laboratorio.

El periodo que abarcan las muestras transcurre desde noviembre de 2013 a octubre de 2014, a excepción del mes de junio de 2014 (único mes en el que no se mataron cerdos en el matadero). Cada mes incluía cinco muestras de individuos diferentes (excepto marzo, que sólo incluía cuatro individuos), y de cada uno de ellos se extrajo el cuarto premolar (DP4). El motivo es que es el único diente lo suficientemente desarrollado como para llevar a cabo un análisis viable, debido a que el resto está en proceso de erupción. Una vez extraídos, fueron analizados directamente a temperatura ambiente y sin preparación alguna mediante la técnica LIBS. El número total de dientes analizados asciende a 54.

6.4.5. Temperatura ambiental

Las gráficas de temperaturas muestran los datos anuales y mensuales (2013 y 2014), así como del periodo concreto de muestreo (noviembre 2013 - octubre 2014) de los datos registrados en la comarca de La Moraña, proporcionados por la AEMET (Agencia Estatal de Meteorología).

6.4.6. Resultados

Asignación de líneas espectrales

Utilizando la base de datos del NIST, se identificaron las siguientes líneas espectrales, correspondientes a los elementos más representativos de la muestra (Figura 6.4.6.1): Mg II (279,55 nm y 280,27 nm), Na I (589,29 nm y 589,99 nm), H α (656,28 nm) y Ca I (422,67 nm). Esta última línea fue utilizada como patrón interno, realizándose todas las relaciones elementales con respecto a ella (Mg/Ca, Na/Ca, H α /Ca).

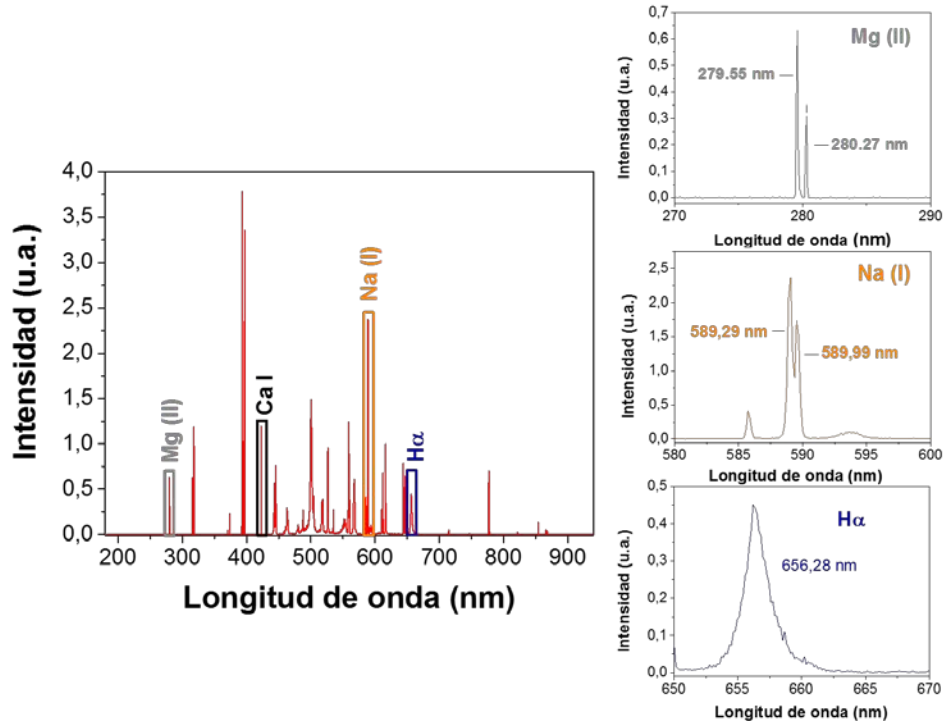


Figura 6.4.6.1: Espectro típico de uno de los promedios de pulsos obtenidos, con la identificación de los elementos elegidos para el análisis: Mg II (gris), Na I (naranja) e H_{α} (azul) y Ca I (negro), este último usado únicamente como patrón interno. A la derecha, ampliación de los mismos elementos con sus respectivas longitudes de onda.

Optimización de parámetros

Para ello se utilizó un M1 escogido al azar. Se realizaron 3 espectros de promedios de cinco, diez y quince pulsos (3x5, 3x10, 3x15), precedidas siempre por tres pulsos de limpieza. Tras calcular la desviación estándar de cada serie, se observó que el error en todos era mínimo y despreciable. Por tanto, para todos los análisis posteriores se recogieron espectros de promedios de cinco pulsos con tres pulsos de limpieza previos. Este análisis también demostró el idéntico comportamiento de las líneas pertenecientes a los dobletes de Mg II y Na I (Figura 6.4.6.2).

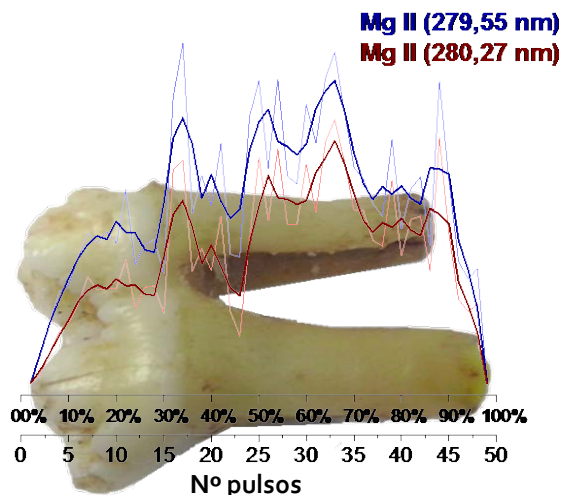


Figura 6.4.6.2: Gráfica del M1.

Análisis LIBS

Estas gráficas (Figura 6.4.6.3) muestran la superposición de las temperaturas a la relación elemental. Para hacer comparables los datos de los distintos individuos, debido a su diferente longitud, se ha realizado la división del diente en partes porcentuales. Dicha relación elemental corresponde al espectro del porcentaje mostrado para cada individuo y para todos los meses del periodo de estudio.

Como puede observarse, existe una variación de los elementos del diente a lo largo del año. Es decir, cuando la temperatura asciende, estos elementos parecen seguir la misma tendencia, y viceversa. En relación con la temperatura, esta correlación se hace más precisa según el elemento que se elija. A este respecto, de los tres elementos analizados, el Mg II (279,55 nm) parece ser el más fiable, seguido del $H\alpha$ (656,28 nm) y del Na I (589,29 nm). Además, dentro de cada elemento, la relación en esta variación es más exacta dependiendo de la parte del diente que se analiza. Así, dentro del Mg II, las partes más diagnósticas parecen ser las correspondientes al 60%, 80% y 50% (Figura 6.4.6.3).

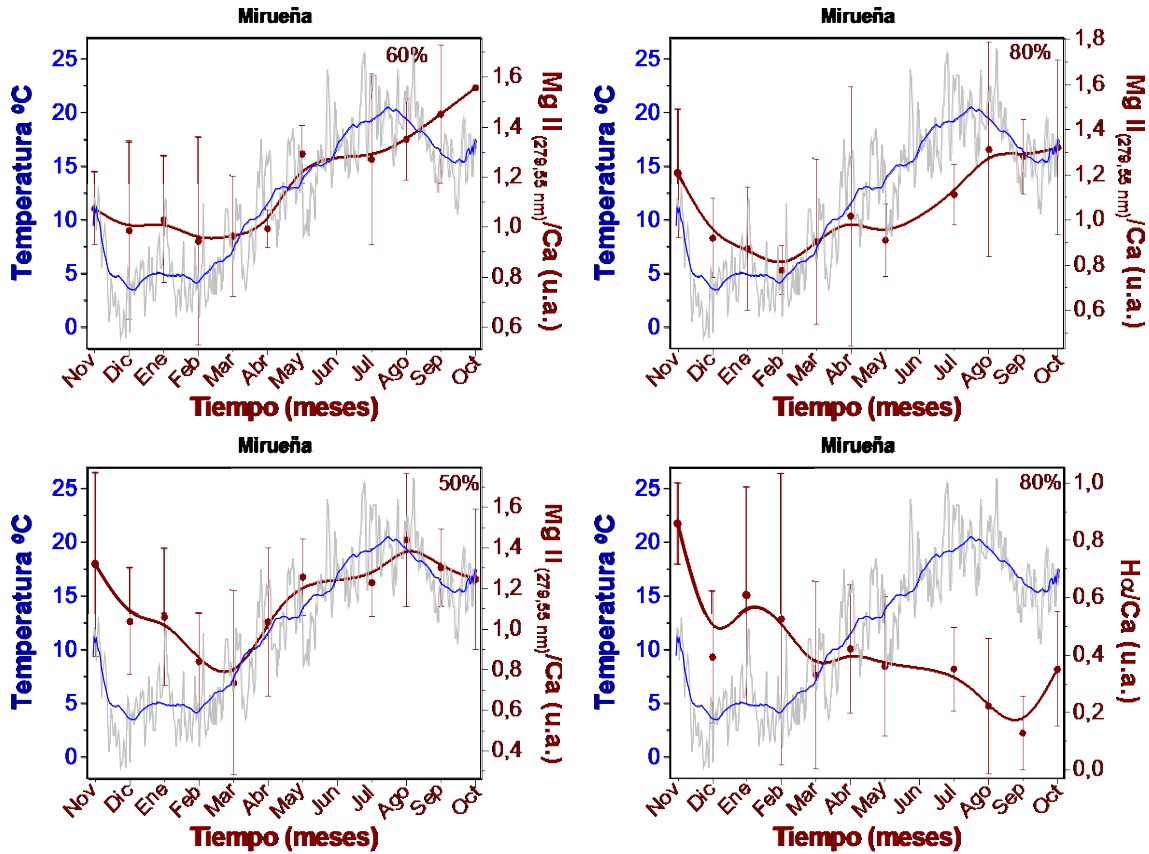


Figura 6.4.6.3: Relaciones elementales y temperatura frente al tiempo del periodo de estudio: las tres primeras gráficas muestran los porcentajes del 60%, el 80% y el 50% del Mg II, la cuarta muestra el porcentaje del 80% del H α (ordenadas de mayor a menor índice de correlación (R²)).

Sin embargo, también se puede observar que la superposición de ambas líneas no es perfecta, y que de hecho existe un aparente desplazamiento a la derecha de la línea de los elementos sobre la de la temperatura. Esto podría estar indicando la posible absorción retardada de los elementos químicos por el animal.

Por otro lado, las gráficas de los índices de correlación muestran un índice no mayor del 0,65 (Figura 6.4.6.4). Aunque a priori pudiera parecer que este índice es algo insignificante, hay que tener en cuenta que, por un lado, son muestras biológicas a las que afectan factores internos y externos que desconocemos y que no están bajo nuestro control (hormonas, estado reproductivo, sexo, etc.). Además, no se conoce ningún precedente de este análisis, la única referencia a un caso similar está en los índices de correlación entre el Sr/Ca y las temperaturas obtenidos por García Escárzaga et al.³⁵ para moluscos marinos, los cuales

no fueron superiores al 0,7 en el mejor de los casos, por lo que el índice del 0,65 se puede considerar como un buen dato.

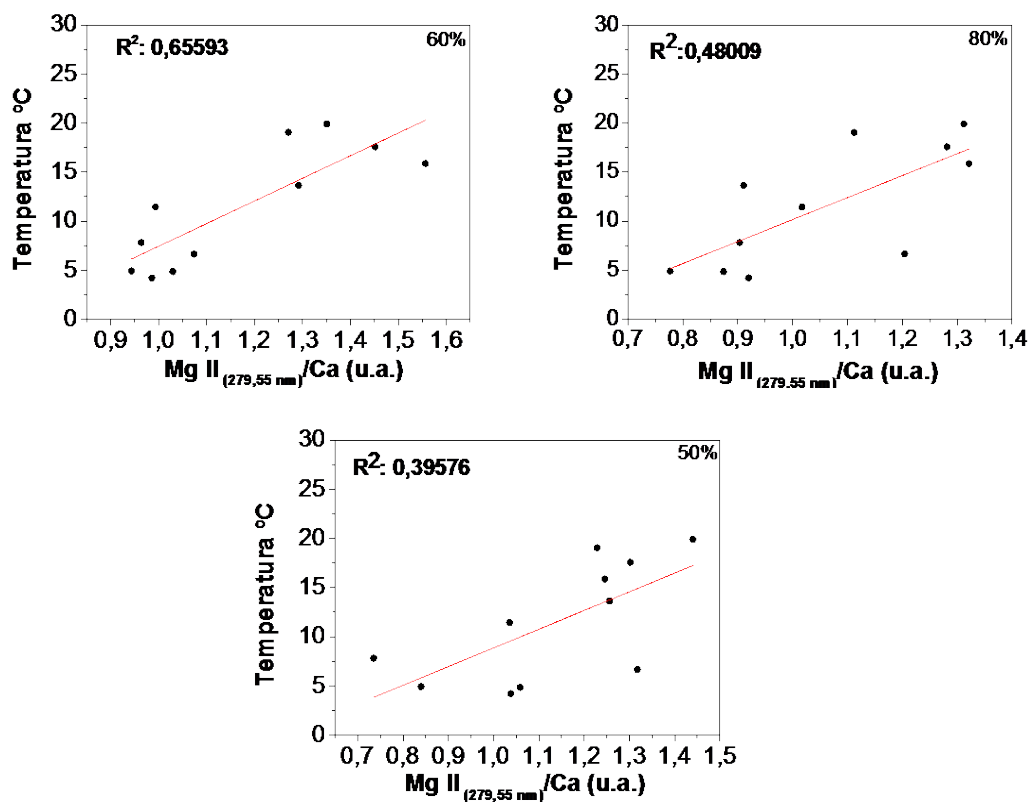


Figura 6.4.6.4: Índices de correlación del 60%, 80% y 50% para el Mg II, ordenados de mayor a menor.

Además, puede que los índices de correlación estén indicando que la relación entre la temperatura y las relaciones elementales sea de naturaleza no lineal.

6.4.7. Conclusiones del análisis de piezas dentales

Se ha observado que existe cierta variabilidad dependiente de la estacionalidad, siendo el Mg II (279,55 nm) el elemento más representativo. Sin embargo, existen partes del diente más diagnósticas que otras. Los índices de correlación indican una posible relación no lineal. La técnica LIBS es totalmente viable, válida y funcional para los estudios de estacionalidad proporcionando un nuevo método alternativo a los métodos tradicionales.

6.5. Discriminación de restos óseos faunísticos para estudios arqueológicos

Debido a que este trabajo se continúa realizando en nuestro laboratorio en colaboración con el Prof. José Yravedra Sáinz de los Terreros, del Departamento de Prehistoria de la Universidad Complutense de Madrid, los resultados mostrados aquí son preliminares.

Resumen

Los conjuntos faunísticos que aparecen en los sitios arqueológicos suelen estar compuestos por varios huesos de diferentes individuos de diferentes especies mezclados. Usando varias unidades de cuantificación, los investigadores pueden establecer qué especies son más representadas, a través del número de restos (NR) o del el número mínimo de individuos (MNI) en el yacimiento. El problema es que la MNI no establece ni relaciona si los diversos huesos de un taxón pertenecen a un mismo individuo en particular. A través del análisis genético, podría ser posible aislar entre sí y asociar el individuo pertenece cada resto, pero ese análisis es costoso y difícil de implementar debido a las muestras de hueso a menudo no permiten analizar el ADN. Se propone la aplicación de una nueva técnica para poder discriminar a que individuo pertenece cada resto. Para ello se ha utilizado la técnica LIBS y NN para diferenciar diferentes huesos de diferentes individuos de ciervos silvestres y asignar al individuo al que pertenecen. La composición elemental de los huesos proporciona suficiente información para obtener una discriminación correcta de diferentes individuos. La correlación espectral ha superado el 85%. No ha habido falsos positivos y negativos.

6.5.1. Introducción

Los sitios arqueológicos de los diferentes períodos culturales como el Paleolítico, el Neolítico, la Edad del Hierro, Romano, etc., presentan una gran diversidad de materiales. Los conjuntos óseos de estos sitios son muy comunes y los huesos usualmente pueden mezclarse, mostrando huesos de diferentes animales y diferentes especies en el mismo espacio. A través de estudios bio-arqueológicos, se pueden cuantificar los restos y los individuos. Los métodos de cuantificación han sido muy diferentes y desde el cuarto fin del siglo XX se han realizado

varios intentos para alcanzar el sistema de cuantificación más preciso¹⁸¹. En algunos casos, incluso ha cuantificado utilizando sistemas similares con nombres diferentes, o utilizar diferentes metodologías utilizando la misma nomenclatura, produciendo cierta confusión⁶⁹. En cualquier caso, el sistema más utilizado para cuantificar las muestras zoo-arqueológicas de un sitio con representatividad son actualmente el Número de Restos (NR) y el Número Mínimo de Individuos (MNI).

Aunque esta técnica y otras, como el número mínimo de Elementos MNE¹⁸², pueden ayudar a establecer una representación mínima del número de individuos y huesos que aparecen en un sitio, estas técnicas no permiten reagrupar los huesos que pertenecen a un mismo individuo. En sitios arqueológicos pueden aparecer huesos de diferentes individuos, el problema está en relacionar cada hueso con el individuo correcto.

Cuando hay huesos de diferentes especies, podría ser posible relacionar una especie u otra, pero si hay varios individuos de cada especie y todos tienen una edad similar, es difícil relacionar individualmente al individuo al que pertenecen. Hasta ahora, en cualquier sitio arqueológico se ha conseguido identificar el número de elementos presentados por cada individuo. Por lo tanto, sería interesante desarrollar una técnica que permitiera aislar los huesos de cada individuo. Esto permitiría concretar al máximo la cuantificación de los restos, y valorar con exactitud cómo afecta la fracturación a cada elemento y a cada resto.

Tal vez el análisis de ADN se debe realizar para resolver el problema, pero la cantidad de muestras que se analizarían, con su coste posterior, hace que este método sea inviable para los proyectos arqueológicos. Por este motivo, en este trabajo se aplica una nueva técnica para resolver este problema.

La técnica de espectroscopía de ablación láser (LIBS) es un análisis rápido, multi-elemental y micro-destructivo. Se basa en el uso de un pulso láser de radiación de alta energía, que vaporiza una fracción de la muestra, que genera un plasma, cuya composición depende de los elementos presentes en la muestra. El plasma emite radiación característica de los elementos constituyentes, lo que permite un análisis espectroscópico. La posibilidad de combinar LIBS con métodos quimiométricos, como las redes neuronales (NN) extrae información significativa para clasificar diferentes muestras³⁹. Aunque las diferencias en la

composición elemental de estas muestras entre individuos son insignificantes, algunos oligoelementos pueden estar relacionados con la dieta y el medio ambiente³⁸, proporcionando variaciones en el espectro LIBS. Estas diferencias permiten la discriminación cuando se realiza un análisis quimiométrico, como ya se ha demostrado en un estudio previo³⁹, en el que se desarrolló un método de Espectroscopia de Ablación Láser (LIBS) y Redes Neuronales (NN) aplicado a la clasificación y discriminación de huesos humanos y fragmentos de dientes. Las composiciones elementales de muestras de huesos y dientes proporcionaron información suficiente para lograr una correcta identificación de diferentes restos humanos, una con correlación espectral superior al 95%, sin tener en cuenta el tipo de hueso o muestra de diente analizada.

A pesar de la prolífica información en trabajos anteriores, se están realizando más investigaciones para entender la variabilidad de los individuos de ciervos salvajes, avanzando el estado del conocimiento sobre la distribución de animales en yacimientos arqueológicos. Por lo tanto, los nuevos datos presentados aquí pueden ser útiles en futuras investigaciones arqueológicas. La asignación específica de cada hueso a cada individuo podría permitir especificar con mayor precisión el número de individuos que aparecen en un sitio. También puede ayudar a identificar procesos de comportamiento humano no identificados en cuanto a la práctica de compartir alimentos. De esta manera, sería posible saber si después de ser cazados, los animales sacrificados eran piezas dispersas entre las personas de un grupo, o unidades familiares como lo hacen hoy en día diversos grupos humanos¹⁸³.

6.5.2. Procedimiento experimental

Equipo LIBS

La técnica LIBS y la metodología utilizada han sido descritas anteriormente (Capítulo 4). Aquí se discuten los parámetros más relevantes. La velocidad de repetición del láser se ajustó a 2 Hz. El tiempo de integración del detector fue fijado a 10 ms, obteniendo información espectral para iones, átomos y moléculas. Se ajustó un tiempo de retraso de 0,8 μ s para activar el detector, con el fin de evitar la detección del *bremsstrahlung*.

Muestras arqueológicas

Se recolectaron nueve huesos modernos (Figura 6.5.2.1) de tres ciervos salvajes actuales de Toledo, España en 2014. Este experimento no implicó ninguna especie en peligro o protegida y ningún animal fue dañado o sacrificado durante el presente proyecto. Las muestras se cepillaron para eliminar los tejidos blandos y el suelo, se lavaron con agua tibia sin usar jabón para evitar la contaminación química superficial y se aclararon varias veces con agua destilada. Las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente antes de la medición mediante LIBS.



Figura 6.5.2.1: Todos los huesos de ciervo recolectados

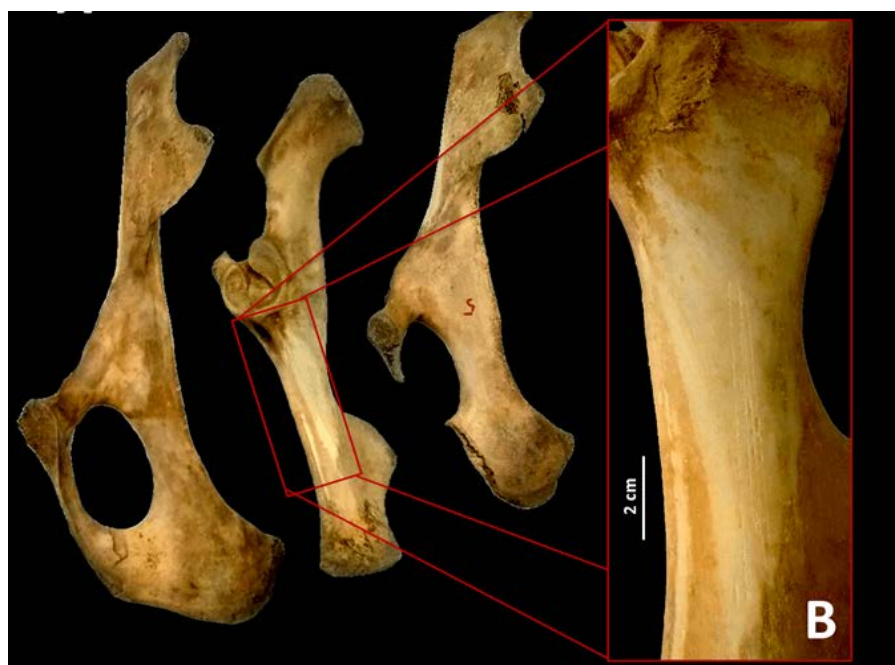


Figura 6.5.2.2: Huesos coxales y extensión de la zona de medición, donde se pueden observar los cráteres producidos por los pulsos láser.

La Tabla 6.5.2.1 muestra la nomenclatura y el tipo de hueso utilizado en el estudio. La nomenclatura utilizada tiene dos letras y un número: la primera letra (L) indica "biblioteca", mientras que la segunda (C, F o T) indica el tipo de hueso (hueso coxal, fémur o tibia). El número indica el individuo.

Tabla 6.5.2.1: Nomenclatura y tipo de huesos.

<i>Individuo</i>	<i>Identificación de la muestra</i>	<i>Descripción</i>
1	L3C	Coxal
	L3F	Femur
	L3T	Tibia
2	L4C	Coxal
	L4F	Femur
	L4T	Tibia
3	L5C	Coxal
	L5F	Femur
	L5T	Tibia

Las muestras de hueso se han analizado utilizando espectroscopia de láser (LIBS) después de pasar una película abrasiva ligera sobre la superficie para minimizar posibles contaminantes. La Figura 6.5.2.2 muestra los huesos de la cadera utilizados en este experimento preliminar y una imagen mejorada de la zona analizada, donde se pueden observar los cráteres producidos por el láser.

Medidas LIBS

Las medidas se realizaron directamente al aire a presión atmosférica y temperatura ambiental. En cada posición, se irradiaron diez pulsos láser para obtener cada espectro. Los primeros cinco pulsos láser se irradiaron para limpiar la superficie de la muestra y eliminar cualquier traza de impurezas. Se promediaron los siguientes cinco pulsos para obtener un espectro, con el fin de reducir la heterogeneidad intra-muestra debido a que la tasa de deposición ósea no es la misma para todas las estructuras. Esto mejora la precisión de la medición mediante LIBS. Posteriormente, la muestra se desplazó 500 µm en el plano X-Y para irradiar una nueva área, evitando la interferencia con regiones previamente analizadas.

Se registró un conjunto de doscientos espectros promedio para cada hueso, que se dividió en dos conjuntos de 100 espectros cada uno, donde se usó un conjunto para calibrar el modelo de la NN y el segundo a su vez también se dividió en dos conjuntos de 50 espectros cada uno (a,b) utilizados en las pruebas (*test*). Para evitar variaciones debidas a cambios en las condiciones experimentales y al efecto matriz, cada espectro se normalizó usando la intensidad de una línea específica del espectro (Ca I 430,16 nm). Entre las líneas espectrales observadas, se seleccionaron las regiones espectrales que contenían las líneas de emisión de los elementos Ca, Sr y Mg. El calcio es el principal elemento presente en los huesos, mientras que el magnesio y el estroncio son indicativos del consumo de verduras³⁸. La integración del estroncio en la cadena alimentaria es producida por las plantas, reduciendo su concentración según se aumenta en la pirámide alimenticia. Por otra parte, el magnesio es abundante en verduras. Aunque no desplazan la matriz cristalina del hueso, los iones pueden ser retenidos en la superficie de la hidroxiapatita.

Análisis estadístico

Con el fin de observar las posibles relaciones entre las diferentes muestras de hueso, se realizó un análisis de componentes principales (PCA), ya que es capaz de mejorar la predicción de variables que no contribuyen significativamente a la varianza. El uso de PCA en el presente estudio es un paso previo para reducir la dimensión de los datos de entrada en la red neuronal (NN), disminuyendo el tiempo de entrenamiento y mejorando la precisión.

El PCA produce un gráfico bidimensional que representa el 95% de la varianza de la muestra (Figura 6.5.2.3). El primer componente explica el 87% de la varianza y el segundo componente el 9%. El PCA claramente no puede separar los datos de los tres individuos diferentes, que se superponen. Además, se pueden observar puntos anómalos, pertenecientes a espectros anómalos.

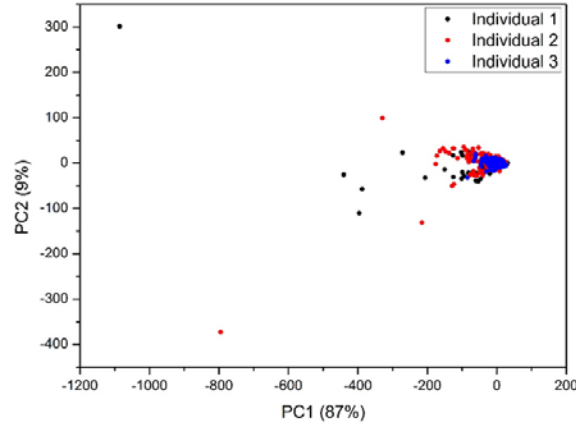


Figura 6.5.2.3: Distribución de muestras en el gráfico PCA de dos componentes.

Con el fin de mejorar los resultados obtenidos mediante la aplicación de PCA, se procedió a la eliminación de los espectros anómalos para cada hueso. Para ello se calculó una elipse con un 95% de confianza para cada una de ellas. La Figura 6.5.2.4 muestra las puntuaciones de PCA para la muestra L3C y su correspondiente elipse. Los anómalos son datos que se encuentran fuera de dicha elipse, por lo que es necesario eliminarlos del modelo.

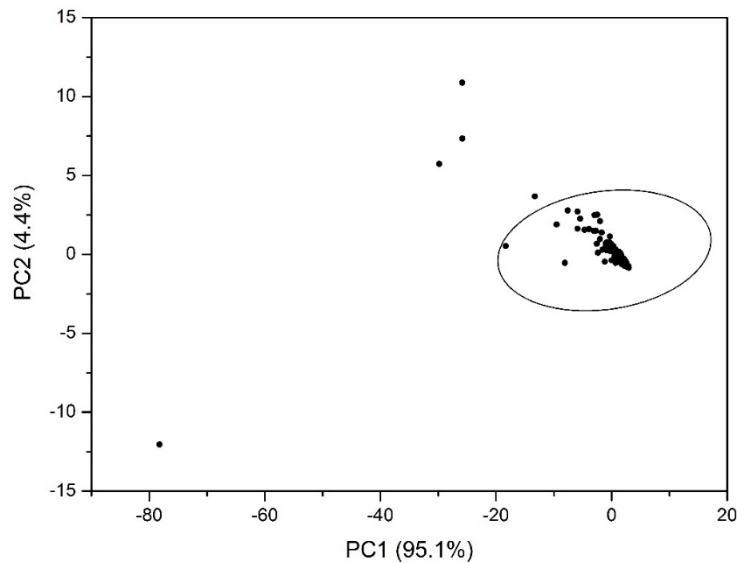


Figura 6.5.2.4: Gráfico de PCA para la muestra L3C y su correspondiente elipse.

Posteriormente, los datos fueron procesados por el algoritmo matemático "Red Neural (NN)", con el fin de realizar la clasificación de los restos óseos. Anteriormente, el modelo de clasificación NN proporcionó resultados exitosos en la identificación y discriminación de los huesos humanos³⁹.

Entrenamiento de la NN

Una descripción detallada del proceso de cálculo ha sido descrita previamente (Capítulo 3). Se utilizaron tres bibliotecas espectrales (una para cada cadera) como referencia para entrenar la red neuronal (100 espectros x 3 individuos). Durante el proceso de entrenamiento, cada muestra se utilizó como identificador de referencia asociado con un número en la capa de salida. Cero se utilizó siempre para indicar y clasificar como desconocido. Como parte del proceso de formación de la red neuronal, un conjunto de datos se dividió aleatoriamente en dos subconjuntos: 50% para la formación y 25% para la validación del modelo (a, b). Por lo tanto, el modelo fue validado con bibliotecas espectrales no utilizadas en el proceso de entrenamiento. Todos los datos de aprendizaje se dividieron como parte del proceso de aprendizaje en tres partes: entrenamiento (80%), autovalidación (10%) y test (10%). Esta división se produce dentro de la NN, y no tiene nada que ver con la división aleatoria hecha anteriormente.

Validación de la NN

La prueba de validación del modelo red neuronal se realizó para evaluar su calidad y su capacidad para predecir la pertenencia de muestras no introducidas en el proceso de formación (discriminar a los individuos). El modelo se evaluó en términos de su precisión o tasa de discriminación positiva, utilizando el parámetro de correlación espectral, que se define como el porcentaje de espectros clasificados correctamente. Considerar una muestra debidamente clasificada se fijó arbitrariamente un límite mínimo del 80% en el valor de la correlación espectral:

$$\textit{Correlación espectral} = \frac{\textit{Espectros clasificados correctamente}}{\textit{Número total de espectros}}$$

6.5.3. Resultados

Espectros de huesos

La Figura 6.5.3.1 muestra un espectro LIBS típico de una muestra de hueso. Las líneas de emisión de los elementos principales, a sus longitudes de onda particulares (nm), identificadas con los espectros atómicos de la base de datos NIST⁹⁶, fueron Mg II (279,55

nm + 280,27 nm), Sr I (407,77 nm), Ca II (393,37 nm + 396,85 nm) Ca I (422,67 nm) y Mg II (526,44 nm). La línea de emisión más intensa corresponde al Ca II, debido a la composición de la muestra (principalmente hidroxiapatita y fosfato cálcico).

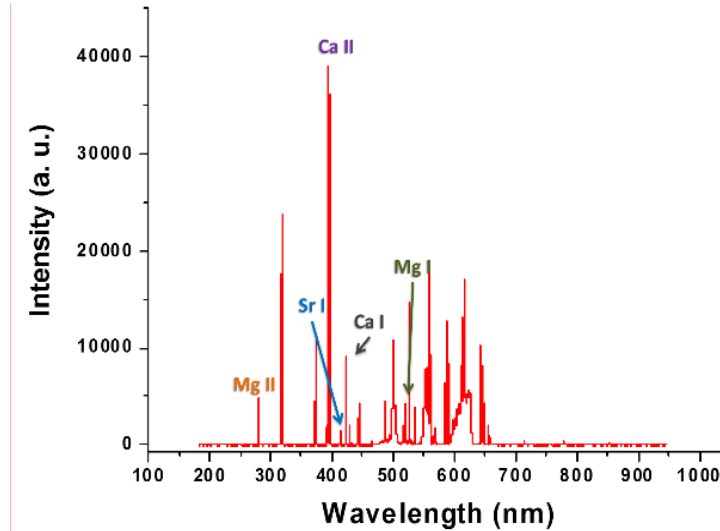


Figura 6.5.3.1: Un espectro LIBS típico de una muestra ósea.

Discriminación individual

Para aumentar la capacidad de la NN para discriminar, se redujo el número de variables de entrada. Así, se seleccionaron cuatro intervalos de longitudes de onda, que incluyen las principales líneas de emisión descritas en el epígrafe anterior. Los intervalos fueron: 271 - 291 nm, 390 - 410 nm, 420 - 480 nm y 516 - 532 nm. En total, se utilizaron 116 variables para el entrenamiento del modelo, con 3 capas ocultas de neuronas y tres individuos en la capa de salida.

La Figura 6.5.3.2 muestra el resultado de la auto-validación del modelo de la red neuronal durante el proceso de entrenamiento. A pesar de las pequeñas oscilaciones en los valores de salida de la red neuronal, todos los espectros se asignan correctamente. Una vez que se ha estimado un modelo de la red neuronal, la predicción se lleva a cabo introduciendo bibliotecas espectrales no incluidas en el proceso de entrenamiento para la prueba (*test*). El modelo de la NN realiza la identificación de la muestra comparando las características espectrales de la muestra desconocida con los espectros utilizados en el proceso de entrenamiento.

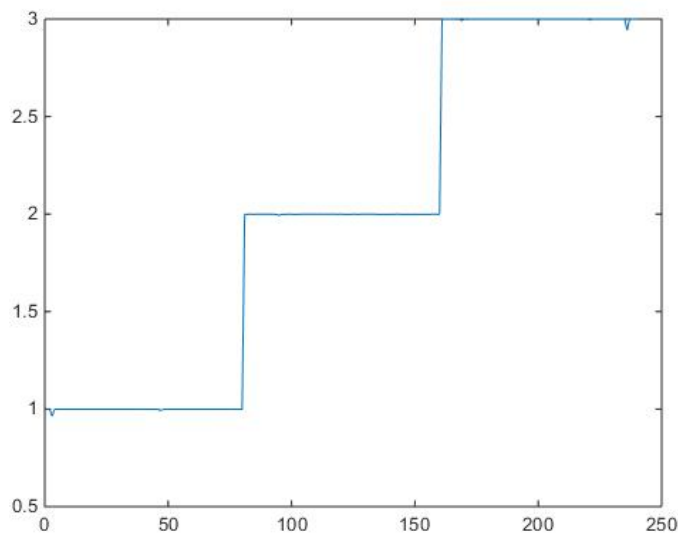


Figura 6.5.3.2: Resultado de la salida del entrenamiento de la red neuronal para las muestras de hueso.

La Tabla 6.5.3.1 muestra los resultados de la red neuronal para el reagrupamiento de huesos por individuos. Todas las muestras fueron identificadas y discriminadas con una correlación espectral superior al 85%, lo que demuestra la capacidad de generalización de la red neuronal. A pesar de las diferencias inter- e intra-individuales, el modelo es capaz de identificar huesos desconocidos con su clase individual. Los espectros que no se clasifican correctamente no se asignan a otro individuo, sino como desconocido para el modelo (sin falsos positivos). Por lo tanto, a pesar de las pequeñas diferencias en la composición elemental inter- e intra-individuales, estos resultados demuestran que la composición elemental de los huesos permite la discriminación, a pesar del comportamiento gregario de los ciervos y estilo de vida similar. Una vez ha sido estimado un modelo adecuado, es validado con librerías espectrales de prueba con muestras no incluidas en el entrenamiento. El modelo de la NN realiza la identificación de la muestra comparando las características espectrales de la muestra desconocida con las de los espectros usados en el proceso de entrenamiento.

Tabla 6.5.3.1: Resultados de la clasificación de muestras de hueso mediante la red neuronal.

<u>Muestra</u>	<u>Individuo</u>			
	1	2	3	Desconocido
<i>L1Ca</i>	98	0	0	2
<i>L1Cb</i>	98	0	0	2
<i>L2Ca</i>	0	88	0	12
<i>L2Cb</i>	0	100	0	0
<i>L3Ca</i>	0	0	100	0
<i>L3Cb</i>	0	0	100	0

6.5.4. Conclusiones de la discriminación de restos óseos

Se ha utilizado con éxito un método basado en LIBS y NN, utilizado para la discriminación de restos óseos. La metodología LIBS-NN es capaz de identificar y discriminar a cada individuo correctamente, sin necesidad de realizar análisis de ADN para agrupar los restos. A pesar de los diferentes elementos observados en LIBS (calcio, magnesio y estroncio) que forman una matriz compleja, la selección de sólo unas pocas señales en los espectros fue suficiente para discriminar a los individuos con alta precisión. Además, las condiciones ambientales, la dieta y la preservación de los restos no afectan a la sensibilidad/precisión de LIBS-NN y la destrucción de las muestras es mínima.

Para incrementar estos resultados iniciales, se requieren análisis detallados adicionales, aunque se espera que esta metodología basada en LIBS-NN nos permita alcanzar resultados positivos en futuros estudios. LIBS-NN sirve como una herramienta eficaz para llamar la atención sobre el estudio de la conducta y la organización social de los homínidos, contribuyendo a arrojar más luz sobre el comportamiento de las sociedades humanas pasadas.

Un mayor análisis con muestras arqueológicas de diferentes sitios de diferentes cronologías podría permitir probar esta técnica y ver su implementación. De manera similar, su aplicación puede permitir ver si ciertas alteraciones tafonómicas como la diagénesis, la mineralización o la preservación ósea, interfieren o no en la aplicabilidad del método al

registro fósil. Este estudio presenta resultados optimistas y trabajos previos³⁹ con poblaciones humanas han mostrado resultados satisfactorios.

En consecuencia, las posibilidades de esta técnica pueden ser de gran importancia, ya que permite identificar cada hueso y asignarlo a individuos específicos. Esto puede ayudar a estimar con precisión el número de individuos de los animales en un yacimiento. Además, podría contribuir a reconocer la distribución de presas entre diferentes unidades familiares una vez desarticulada, y dependiendo de las características de cada sitio, identificar diferentes comportamientos sociales. Por ejemplo, estimar el momento en la historia de la humanidad en que comenzó a compartir la presa, y diferenciar el comportamiento competitivo que describe a los carnívoros gregarios al acceder a una presa.

6.6. Implicación del ensamblaje de huesos de fauna mediante LIBS-NN en el comportamiento humano temprano

Debido a que este trabajo se continúa realizando en nuestro laboratorio en colaboración con el Prof. José Yravedra Sáinz de los Terreros, del Departamento de Prehistoria de la Universidad Complutense de Madrid, los resultados mostrados aquí son preliminares.

Resumen

El ser humano es el único primate que consume carne de una forma regular, por lo que, sin duda, fue algo clave en nuestra evolución. Por un lado, permitió la supervivencia en momentos estacionales de escasez de recursos vegetales, y, por otro, la ingesta de alimento de alto valor energético permitió disponer del combustible suficiente como para mantener las necesidades metabólicas que necesita un gran cerebro. El consumo de carne motivó nuestro ingenio y propicio la realización de herramientas. Además, fue un factor importante que afectó a la expansión temprana del homínido, la organización social y el movimiento geográfico, por lo que la distribución de la caza es la clave para entender la organización social de los individuos¹⁸⁴. Los estudios tafonómicos han demostrado que el ser humano tenía capacidades cinegéticas al menos hace 2 m.a., pero a pesar de cazar no sabemos qué pasos siguieron antes de procesar las carcasas que conseguían. Otros grupos de investigación

centraron su análisis en estudios tafonómicos, pero no mostraron el comportamiento homínico¹⁸⁵. En este trabajo se han utilizado la técnica analítica de Espectroscopía de ablación láser (LIBS) y el algoritmo matemático Redes Neuronales (NN) para la discriminación de los huesos arqueológicos procedentes de la Garganta de Olduvai. La composición elemental de los huesos proporciona suficiente información para obtener una discriminación correcta de diferentes individuos. La correlación espectral ha superado el 85%. No ha habido falsos positivos y negativos.

Esta metodología ha sido desarrollada para reconstruir el comportamiento humano ancestral, especialmente sus patrones de subsistencia, dado que aún quedan demasiadas cuestiones abiertas, que no se han revelado hasta ahora a través de análisis tafonómicos de conjuntos arqueofaunísticos, y que podrían alterar profundamente nuestra comprensión de la evolución humana.

6.6.1. Introducción al análisis de muestras arqueológicas

El comportamiento social y la organización de los primeros homínidos ha sido un tema ampliamente discutido por más de 30 años, a través de los estudios paleoantropológicos por un lado, y el análisis de estrategias de subsistencia por el otro, que aún están en estudio, como el bipedalismo, la capacidad craneal, la planificación y fabricación de herramientas, el dimorfismo sexual o el cambio en la dieta. Estos últimos han demostrado la capacidad de los primeros seres humanos para la caza, lo que implica características como la cooperación, planificación y solidaridad, frente a una actitud más oportunista e individualista del carroñero. A pesar de todos los trabajos realizados las últimas décadas, aún hay aspectos que no han sido suficientemente analizados, por ejemplo, como se gestionan los recursos cinegéticos después de ser adquiridos. Aunque hay diversos tipos de estudios ninguna ha conseguido verificar que sucede con una presa tras su adquisición. No sabemos con seguridad si las piezas eran transportadas completa o incompletas, y tampoco sabemos cómo se repartía el alimento ni cómo se organizaba el consumo. A través de nuestro análisis trataremos de paliar y responder estas y otras cuestiones.

Los restos típicos que se encuentran en un sitio arqueológico son las carcasas de animales, los restos materiales de la cultura humana y en ocasiones, los propios fósiles

humanos, que representan evidencia *in situ* de ocupación¹⁸⁶. Se pueden distinguir cuatro acciones principales: adquisición, método de transporte de la carcasa, técnicas de procesamiento y consumo, y posterior eliminación de los restos¹⁸⁷. Los patrones de orientación de las asociaciones fósiles podrían utilizarse para inferir las preferencias de hábitat de los primeros homínidos¹⁸⁸. Trabajos experimentales recientes muestran que la forma y textura del hueso juegan un papel importante en el transporte óseo. Además, la alimentación preferencial facilita la comprensión de algunos patrones de comportamiento relacionados con la adquisición de alimentos. Por lo tanto, la identificación correcta de las carcasas recolectadas es importante, porque en un yacimiento arqueológico se recogen muchas muestras, y como son fósiles mineralizados, sólo se puede realizar el análisis de ADN para reagrupar los restos del mismo individuo. Sin embargo, a veces es extremadamente difícil, por lo que sólo puede establecerse el número mínimo de individuos (MNI). Las metodologías clásicas revelan información sobre la causa de la muerte y el depredador, probando la estrategia de adquisición de cadáveres por homínidos y la competencia por recursos con otros carnívoros, revelando donde se compartieron los alimentos de carcasas carnudas y los patrones de comportamiento social, de gran importancia en los estudios de evolución humana¹⁸⁹. La tafonomía es la disciplina principal que los arqueólogos utilizan para tratar el estudio del comportamiento homínido, centrándose en la acumulación y el reagrupamiento de huesos de presa en yacimientos arqueológicos. La distribución de la carne disponible repetidamente transportada al sitio es una interacción social, y con frecuencia implica un ritual elaborado, regido por reglas sociales estrictas, pero aún no es posible establecer la organización homínida temprana¹⁸⁶.

A pesar de la prolífica información en trabajos anteriores, se está trabajando para entender la variabilidad de los individuos de muestras arqueológicas, avanzando el estado de conocimiento sobre la distribución de presas cuando la cacería ha terminado. Hasta donde sabemos, nadie ha publicado resultados de experimentos de fauna de herbívoros utilizando LIBS en combinación con NN, por lo que es necesario llenar esa brecha para explicar los patrones de ocupación humana¹⁹⁰. Por lo tanto, los nuevos datos presentados aquí pueden ser útiles en futuras investigaciones tafonómicas.

6.6.2. Procedimiento experimental

Equipo LIBS

La técnica LIBS y la metodología utilizadas ya han sido descritas en el trabajo anterior, pues al tratarse de muestras de tejido óseo, se ha seguido con el mismo protocolo de medición. Así, la velocidad de repetición del láser se ajustó a 2 Hz, el tiempo de integración del detector fue fijado a 10 ms, y el tiempo de retraso del detector a 0,8 μ s, para evitar la detección del *bremsstrahlung*.

Muestras arqueológicas

Se recolectaron cinco fragmentos de huesos arqueológicos (Figura 6.6.2.1) de tres ciervos provenientes del yacimiento de la Garganta de Olduvai, en Tanzania. Las muestras simplemente se cepillaron para eliminar los restos de sedimento.



Figura 6.6.2.1: Todos los huesos arqueológicos procedentes de la Garganta de Olduvai.

La Tabla 6.6.2.1 muestra la nomenclatura y el tipo de hueso utilizado en el estudio. La nomenclatura utilizada tiene dos letras y un número: la primera letra (L) indica "librería", mientras que los números indican el individuo y el hueso, respectivamente.

Tabla 6.6.2.1: Nomenclatura y tipo de huesos.

<i>Individuo</i>	<i>Identificación de la muestra</i>	
	<i>Laboratorio</i>	<i>Yacimiento</i>
<i>1</i>	L11	bk3-1032-10
	L12	bk3-1031-10
	L13	bk3-1035-10
<i>2</i>	L21	bk12-1739-L4b
<i>3</i>	L31	bk09-2981

Las muestras de hueso se han analizado utilizando espectroscopia de ablación láser (LIBS) sin preparación de muestra.

Medidas LIBS

Las medidas se realizaron directamente al aire a presión atmosférica y temperatura ambiental. En cada posición, se irradiaron diez pulsos láser para obtener cada espectro. Los primeros cinco pulsos láser se irradiaron para limpiar la superficie de la muestra y eliminar cualquier traza de impurezas. Se promediaron los siguientes cinco pulsos para obtener un espectro, con el fin de reducir la heterogeneidad intra-muestra debido a que la tasa de deposición ósea no es la misma para todas las estructuras. Esto mejora la precisión de la medición mediante LIBS. Posteriormente, la muestra se desplazó 500 μm en el plano X-Y para irradiar una nueva área, evitando la interferencia con regiones previamente analizadas. Se registró un conjunto de cien espectros promedio para cada hueso, que se dividió en dos conjuntos, el primero de 80 espectros que se usó para calibrar el modelo de la NN y el segundo de 20 espectros utilizado en las pruebas (*test*). Para evitar variaciones debidas a cambios en las condiciones experimentales y al efecto matriz, cada espectro se normalizó usando la intensidad de una línea específica del espectro (Ca I 430,16 nm). Además, para realizar el análisis mediante NN las librerías de espectros se obtuvieron utilizando los sectores del espectro que mostraban los elementos característicos de una muestra ósea, Ca, Mg y Sr: 276,62-287,68 nm para el Mg; 390-410 nm para el Ca y el Sr; 420-480 para el Ca y 516-532 nm para el Sr.

Entrenamiento de la NN

Una descripción detallada del proceso de cálculo ha sido descrita previamente (Capítulo 3). Se utilizaron tres bibliotecas espectrales (una para cada individuo) como referencia para entrenar la red neuronal (80 espectros x 3 individuos). Durante el proceso de entrenamiento, cada muestra se utilizó como identificador de referencia asociado con un número en la capa de salida. Cero se utilizó siempre para indicar y clasificar como desconocido. Además, el modelo fue validado con bibliotecas espectrales no utilizadas en el proceso de entrenamiento, realizando el test de generalización.

6.6.3. Resultados preliminares

Espectros de huesos

La Figura 6.6.3.1 muestra un espectro LIBS típico de una muestra de hueso. Las líneas de emisión de los elementos principales, a sus longitudes de onda particulares (nm), identificadas con los espectros atómicos de la base de datos NIST, fueron Mg II (279,55 nm + 280,27 nm), Sr I (407,77 nm), Ca II (393,37 nm + 396,85 nm) Ca I (422,67 nm) y Mg II (526,44 nm). La línea de emisión más intensa corresponde al Ca II, debido a la composición de la muestra (principalmente hidroxiapatita y fosfato cálcico).

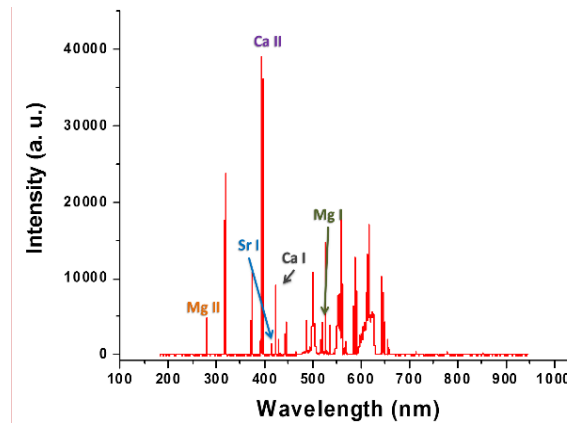


Figura 6.6.3.1: Un espectro LIBS típico de una muestra ósea.

Discriminación individual

Para aumentar la capacidad de la NN para discriminar, se redujo el número de variables de entrada. Así, se seleccionaron cuatro intervalos de longitudes de onda, que

incluyen las principales líneas de emisión descritas en el epígrafe anterior. Los intervalos fueron: 271 - 291 nm, 390 - 410 nm, 420 - 480 nm y 516 - 532 nm.

La Tabla 6.6.3.1 muestra los resultados de la red neuronal para el reagrupamiento de fragmentos de huesos arqueológicos por individuos. Todas las muestras fueron identificadas y discriminadas con una correlación espectral superior al 75%, lo que demuestra la capacidad de generalización de la red neuronal. A pesar de las diferencias inter- e intra-individuales, el modelo es capaz de identificar huesos desconocidos con su clase individual. Los espectros que no se clasifican correctamente no se asignan a otro individuo, sino como desconocido para el modelo (sin falsos positivos). Por lo tanto, a pesar de las pequeñas diferencias en la composición elemental inter- e intra-individuales, estos resultados demuestran que la composición elemental de los huesos permite la discriminación, a pesar de estar mineralizados, al ser restos fósiles. Una vez ha sido estimado un modelo adecuado, es validado con librerías espectrales de prueba con muestras no incluidas en el entrenamiento. El modelo de la NN realiza la identificación de la muestra comparando las características espectrales de la muestra desconocida con las de los espectros usados en el proceso de entrenamiento.

Tabla 6.6.3.1: Resultados de la clasificación de muestras de hueso mediante la red neuronal.

<u>Muestra</u>	<u>Individuo</u>			
	1	2	3	Desconocido
<i>L11</i>	100	0	0	0
<i>L12</i>	81	36	2	19
<i>L13</i>	77	41	10	23
<i>L21</i>	0	100	0	0
<i>L31</i>	0	0	100	0

6.6.4. Conclusiones de la discriminación de muestras arqueológicas

Se ha utilizado con éxito un método basado en LIBS y NN, utilizado para el reagrupamiento de fragmentos de restos óseos arqueológicos procedentes de la Garganta de Olduvai. La metodología LIBS-NN ha demostrado ser capaz de identificar y discriminar a

cada individuo correctamente, incluso cuando las muestras óseas están mineralizadas. A pesar de los diferentes elementos observados en LIBS (calcio, magnesio y estroncio) que forman una matriz compleja, la selección de sólo unas pocas señales en los espectros fue suficiente para discriminar a los individuos con alta precisión. Además, el estado fósil de las muestras de tejido óseo no afecta a la generalización mediante LIBS-NN; y la destrucción de las muestras es mínima, ya que, al estar mineralizadas, la dureza de las muestras es elevada.

Aunque se requieren análisis detallados adicionales con muestras arqueológicas de diferentes sitios de diferentes cronologías, se espera que esta metodología basada en LIBS-NN nos permita alcanzar resultados positivos en futuros estudios. En consecuencia, las posibilidades de esta técnica pueden ser de gran importancia, ya que permite reagrupar huesos de diferentes individuos fósiles en un yacimiento arqueológico.

Conclusiones

De acuerdo con el objetivo principal de esta tesis, que es el desarrollo de una metodología analítica basada en LIBS para el estudio de muestras de origen geológico, forense y arqueológico, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos y las conclusiones presentadas en cada capítulo, se pueden extraer las siguientes conclusiones finales:

- Se han obtenido indicadores paleoclimáticos (relaciones elementales Mg/Ca y Sr/Ca) mediante la técnica LIBS, analizando la estratigrafía interanual de muestras de espeleotemas, con la finalidad de obtener patrones de variabilidad paleoclimática. Se ha demostrado el potencial de la técnica LIBS para la investigación ambiental en la determinación de patrones climáticos mediante ensayos de repetibilidad y homogeneidad. La técnica LIBS ha demostrado presentar ventajas significativas frente a otras técnicas, como la reducción del tiempo de análisis y los costes y, lo que es más importante, una pérdida mínima de material geológico.
- También se ha realizado la formación de imágenes multielementales de gran tamaño (megapíxeles) mediante la técnica LIBS en muestras de espeleotemas, con una alta sensibilidad con un único pulso, y alcanzando una resolución lateral de 15 μm , para realizar análisis paleoclimáticos de mayor precisión interanual.
- Se ha desarrollado una metodología basada en la técnica LIBS para el estudio de tejido blando muscular con el objetivo de determinar el intervalo *post mortem*. El análisis espectroscópico mediante LIBS proporcionó la posibilidad de monitorear los cambios metabólicos *post mortem* a nivel elemental, sin que las condiciones de almacenamiento de la muestra afectaran significativamente a la señal de emisión de cada elemento. Los resultados han mostrado una correlación significativa con el PMI de ciertos elementos presentes en el tejido, como Na, H α , K, Mg, determinándose

como más adecuada la línea espectral perteneciente al H_{α} para la determinación del PMI, con un error del 7%.

- Con el fin de optimizar la realización de los análisis de tejido, tanto blando como óseo, se han estudiado en profundidad las características de la técnica. Para ello, se ha investigado la dinámica de expansión de la pluma del plasma por láser pulsado de CO_2 a $10.591 \mu m$, a diferentes presiones de aire ambiente, observándose efectos como la división de la pluma, el afilado y la detención en función de la presión del aire. También se estudió el efecto del número de disparos láser sobre el volumen del cráter a diferentes presiones de aire ambiente. Todos estos estudios fueron realizados en colaboración con el Prof. Joaquín J. Camacho, de la UAM.
- Además, se ha realizado un análisis resuelto en tiempo del plasma inducido por láser en muestras de músculo porcino en condiciones de vacío medio para la mejor comprensión del plasma. El plasma producido se formó usando un láser de Nd:YAG y se realizó una comparación con el láser de TEA- CO_2 utilizado en el experimento anterior. Se determinaron tanto la temperatura vibracional como la densidad electrónica para diferentes tiempos de retraso del pulso láser. Además, como técnica complementaria, se empleó SEM-EDX para proporcionar información sobre la morfología, homogeneidad y composición elemental de la muestra. Todos estos estudios también fueron realizados en colaboración con el Prof. Joaquín J. Camacho, de la UAM.
- Se ha empleado la técnica LIBS para el estudio de muestras de tejido óseo, con el fin de realizar estudios de estacionalidad en muestras dentales faunísticas. Se ha demostrado que existe cierta variabilidad dependiente de la estacionalidad, siendo el Mg II ($279,55 \text{ nm}$) el elemento más representativo. Además, existen partes del diente más diagnósticas que otras.
- Se ha empleado una metodología basada en LIBS y NN para realizar la correcta identificación y discriminación de restos óseos actuales procedentes de fauna. Se trata de un estudio preliminar antes de analizar muestras fósiles mineralizadas, puesto que

supone un grado más de dificultad con respecto a estudios previos realizados con huesos humanos, ya que los ciervos están tabulados y sólo tienen diferencias a nivel metabólico. Sin embargo, ha permitido el reagrupamiento de restos óseos actuales sin necesidad de realizar análisis de ADN, con el consiguiente ahorro de tiempo de análisis y costes asociados. A pesar de la complejidad de la matriz ósea, formada principalmente por calcio, magnesio y estroncio, la selección de sólo unas pocas señales en los espectros fue suficiente para discriminar a los individuos con alta precisión. Además, las condiciones ambientales, la dieta y la preservación de los restos no afectan a la sensibilidad/precisión de LIBS-NN y la destrucción de las muestras es mínima.

- Se ha desarrollado y aplicado, por primera vez, una metodología que combina la espectroscopía de ablación láser con redes neuronales artificiales para realizar la correcta identificación de restos óseos de carácter arqueológico procedentes de la Garganta de Olduvai. La metodología LIBS-NN ha demostrado ser capaz de identificar y discriminar a cada individuo correctamente, incluso cuando las muestras óseas están mineralizadas. Dada la rapidez y precisión de los resultados de las mediciones obtenidas, esta metodología podría considerarse una técnica alternativa, sencilla y rentable para realizar estudios de reagrupamientos y discriminación de restos fósiles en yacimientos arqueológicos.

El objetivo principal de esta tesis fue desarrollar una metodología basada en LIBS, suficientemente eficiente y robusta, para el análisis de muestras de carácter tanto geológico como arqueológico. Aunque es necesario seguir investigando en ambos campos para completar algunos retos, la técnica LIBS ha demostrado que puede utilizarse en todas las aplicaciones estudiadas para colaborar en estudios multidisciplinarios, con procedimientos experimentales simples, reduciendo significativamente el tiempo y el coste de los análisis actuales.

La técnica LIBS ha demostrado su potencial para la reconstrucción de series paleoclimáticas, lo que permite la modelización de escenarios climáticos futuros y la adecuada adaptación a los efectos del cambio climático, así como al reconocimiento

temprano de perturbaciones ambientales relacionadas, lo que permitirá en última instancia, planificar políticas de adaptación al cambio climático. LIBS permite obtener numerosos análisis de relaciones elementales de una misma muestra, e incluso permite establecer mapas de distribución de elementos. Esta técnica ofrece varias ventajas: es rápida, multielemental, puede realizarse a presión atmosférica, posee resolución lateral en el intervalo de μm y es poco destructiva. Esta metodología logra una mejor comprensión de cómo los elementos se distribuyen en una muestra y, por tanto, la forma en que la precipitación y la temperatura afectan a la correlación entre los elementos y el crecimiento de estas muestras.

Por otro lado, la técnica LIBS es algo novedoso en el campo de la arqueología a nivel de reagrupamiento de huesos, donde hasta ahora sólo podía conocerse el número mínimo de individuos en un yacimiento y la especie animal. Aunque se requieren análisis detallados adicionales con muestras arqueológicas de diferentes sitios de diferentes cronologías, se espera que esta metodología basada en LIBS-NN permita, de manera rápida y eficiente, reagrupar huesos de diferentes individuos fósiles en un yacimiento arqueológico. Esto podría ayudar a dilucidar la organización social de los homínidos, contribuyendo a arrojar más luz sobre el comportamiento de las sociedades humanas pasadas. Además, podría contribuir a reconocer la distribución de presas entre diferentes unidades familiares una vez desarticulada tras la caza, y diferenciar el comportamiento competitivo que describe a los carnívoros gregarios al acceder a una presa.

Esta tesis me ha permitido adquirir los conocimientos y la experiencia necesarios para desarrollar metodologías de análisis basadas en espectroscopia de ablación láser y métodos quimiométricos. Además, también me ha permitido realizar análisis de carácter multidisciplinar, realizando estudios de problemas paleoclimáticos mediante el análisis de muestras geológicas, de degradación de tejidos y mecanismos *post mortem*, de dinámica del plasma y caracterización resuelta en tiempo del mismo para la optimización de parámetros, de estacionalidad con muestras dentales y de carácter arqueológico mediante el análisis de restos óseos de hasta 1,5 millones de años. Por otra parte, como se ha mostrado en los capítulos 6 y 5, este trabajo no es el final de una investigación, sino que se trata de la piedra fundamental de una línea o líneas de trabajo sobre la cual nuevas investigaciones continuarán construyendo el conocimiento iniciado durante el desarrollo de esta tesis.

Conclusions

According to the main objective of this thesis, which is the development of an analytical methodology based on LIBS for the study geological and archaeological samples, taking into account the results obtained and the conclusions presented in each chapter, it can be extracted the following remarkable conclusions:

- Paleoclimatic indicators (elemental ratios such as Mg/Ca and Sr/Ca) were obtained using LIBS technique, analysing the inter-annual stratigraphy of speleothems samples, in order to obtain patterns of paleoclimatic variability. The potential of LIBS technique for environmental research in the determination of climatic patterns has been demonstrated through repeatability and homogeneity tests. The LIBS technique has been shown to have significant advantages over other techniques, such as reduced analysis time and costs and, more importantly, minimal loss of geological material.

- Large-scale multi-element images (megapixels) have also been developed using the LIBS technique in speleothems samples, with a high sensitivity with a single pulse, and reaching a lateral resolution of 15 μm , in order to perform higher precision paleoclimatic inter-annual analyses.

- A methodology based on LIBS technique has been developed for the study of soft muscle tissue, with the aim of determining the *post-mortem* interval. Spectroscopic analysis using LIBS provided the possibility of monitoring *post-mortem* metabolic changes at the elemental level, without the storage conditions of the sample significantly affect the emission signal of each element. The results have found a significant correlation with the PMI of the elements in the tissue, such as Na, H α , K, Mg, determining the spectral line of H α for PMI determination to be more convenient, with a 7% error.

- In order to optimize the performance of tissue analysis, both soft and bone, the characteristics of the technique have been thoroughly studied. For this purpose, it has been investigated the dynamics of the extension of the plume of the plasma by a pulsed CO₂ laser

at 10,591 μm , at various pressures of ambient air, observing diverse effects such as the division of the plume, sharpening and detention as function of air pressure and the effect of the number of shots in the crater volume in different ambient air pressures. All these studies were carried out in collaboration with Prof. Joaquín J. Camacho, from the UAM.

- A time-resolved analysis of the laser-induced plasma in swine muscle samples under medium vacuum conditions has also been performed for better understanding of the plasma. The plasma produced was formed with an Nd:YAG laser and a comparison was made with the TEA-CO₂ laser used in the above experiment. Determination of the vibrational temperature and the electron density for different times of delay of the laser pulse. In addition, as a complementary technique, SEM-EDX was used to provide information on the morphology, homogeneity and elemental composition of the sample. All these studies were also carried out in collaboration with Prof. Joaquín J. Camacho, from the UAM.

- The LIBS technique has been used for the study of bone tissue samples, in order to perform seasonal studies on faunal dental samples. It has been shown that there is some variability dependent on seasonality, with Mg II (279.55 nm) being the most representative element. In addition, there are parts of the teeth more diagnostic than others.

- A methodology based on LIBS and NN was used to correctly identify and discriminate current bone remains from fauna. This is a preliminary study before analysing mineralized fossil samples, since it involves a greater degree of difficulty compared to previous studies with human bones, since deer are tabulated and only have differences in the metabolism. However, it has allowed the reassemble of current bone remains without the need of DNA analysis, with the consequent saving of analysis time and associated costs. Despite the complexity of the bone matrix, consisting mainly of calcium, magnesium and strontium, the selection of only a few signals in the spectra was sufficient to discriminate individuals with high precision. In addition, environmental conditions, diet and preservation of the remains do not affect the sensitivity/precision of LIBS-NN method and destruction of the samples is minimal.

- A methodology that combines laser ablation spectroscopy with artificial neural networks has been developed and applied for the first time to correctly identify

archaeological bone remains from the Olduvai Gorge. The LIBS-NN methodology has been shown to be able to identify and discriminate each individual correctly, even when the bone samples are mineralized. Given the speed and precision of the results of the measurements obtained, this methodology could be considered an alternative technique, simple and reliable to carry out studies of reassembling and discrimination of fossil remains in archaeological sites.

The main objective of this thesis was to develop a methodology based on LIBS, sufficiently efficient and robust, for the analysis of geological and archaeological samples. Although further research is needed in both fields to complete some challenges, the LIBS technique has shown that it can be used in all applications studied to collaborate in multidisciplinary studies with simple experimental procedures, significantly reducing the time and cost of current analyses.

The LIBS technique has demonstrated its potential for the reconstruction of paleoclimatic series, allowing for the modelling of future climate scenarios and adequate adaptation to the effects of climate change, as well as the early recognition of related environmental disturbances, which will ultimately allow planning and adapting to climate change. LIBS allows to obtain numerous analyses of elementary ratios of the same sample, and even multielemental images. This technique offers several advantages: it is fast, multielemental, it can be realized at atmospheric pressure, it has lateral resolution in the interval of μm and it is minimum destructive. This methodology achieves a better understanding of how the elements are distributed in a sample and therefore the way in which precipitation and temperature affect the correlation between the elements and the growth of these samples.

On the other hand, the LIBS technique is novel in archaeological field for reassembling bones, where until now only the minimum number of individuals in a site and the animal species could be known. Although additional detailed analyses are required with archaeological samples from different sites of different chronologies, it is expected that this methodology based on LIBS-NN will quickly and efficiently reassemble bones of different fossil individuals in an archaeological site. This may help elucidate the social organization

of hominids, contributing to shed more light on the behaviour of past human societies. In addition, it could help to recognize the distribution of prey between different households once disarticulated after hunting, and to differentiate the competitive behaviour that describes the gregarious carnivores when accessing a prey.

This thesis has allowed me to acquire the necessary knowledge and experience to develop methodologies of analysis based on laser ablation spectroscopy and chemometric methods. In addition, it has also allowed me to perform multidisciplinary analyses, realizing paleoclimatic studies through the analysis of geological samples, tissue degradation and *post mortem* mechanisms, dynamics and time resolved characterization of the plasma for optimization of parameters, seasonality studies with faunal teeth samples and even the analysis of fossils remains of up to 1,5 million years.

Referencias bibliográficas

1. Hahn DW, Omenetto N: Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS), Part I: Review of Basic Diagnostics and Plasma-Particle Interactions: Still-Challenging Issues Within the Analytical Plasma Community. *Applied Spectroscopy* 64:335A-366A, 2010.
2. Cremers DA, Radziemski LJ: Handbook of laser-induced breakdown spectroscopy (ed 2nd Ed). Oxford - UK, Wiley-Blackwell, 2013.
3. Manzoor S, Moncayo S, Navarro-Villoslada F, et al: Rapid identification and discrimination of bacterial strains by laser induced breakdown spectroscopy and neural networks. *Talanta* 121:65-70, 2014.
4. Phelps A: Fundamentals of plasma physics - Bittencourt,ja. *Nature* 326:209-209, 1987.
5. Tanaka K, Ohde S, Sakaguchi A, et al: Pb/Ca in Thailand Coral Determined by LA-ICP-MS: Anthropogenic Pb Input of River Run-off into a Coral Reef from Urbanised Areas. *Water, Air, & Soil Pollution* 211:211-218, 2010.
6. Jochum KP, Scholz D, Stoll B, et al: Accurate trace element analysis of speleothems and biogenic calcium carbonates by LA-ICP-MS. *Chemical Geology* 318:31-44, 2012.
7. Borsato A, Frisia S, Fairchild IJ, et al: Trace element distribution in annual stalagmite laminae mapped by micrometer-resolution X-ray fluorescence: Implications for incorporation of environmentally significant species. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 71:1494-1512, 2007.
8. Cuif J-P, Dauphin Y, Doucet J, et al: XANES mapping of organic sulfate in three scleractinian coral skeletons. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 67:75-83, 2003.
9. Treble PC, Chappell J, Shelley JMG: Complex speleothem growth processes revealed by trace element mapping and scanning electron microscopy of annual layers. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 69:4855-4863, 2005.
10. Ortega R, Devès G, Maire R: Nuclear microprobe analysis of uranium-rich speleothems: Methodological aspects. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 210:455-458, 2003.
11. Roberts MS, Smart PL, Baker A: Annual trace element variations in a Holocene speleothem. *Earth and Planetary Science Letters* 154:237-246, 1998.
12. Meibom A, Cuif JP, Hillion F, et al: Distribution of magnesium in coral skeleton. *Geophysical Research Letters* 31, 2004.
13. Frisia S, Borsato A, Fairchild IJ, et al: Variations in atmospheric sulphate recorded in stalagmites by synchrotron micro-XRF and XANES analyses. *Earth and Planetary Science Letters* 235:729-740, 2005.
14. Ma QL, Motto-Ros V, Lei WQ, et al: Multi-elemental mapping of a speleothem using laser-induced breakdown spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 65:707-714, 2010.
15. Cruz JA, Turrero MJ, Cáceres JO, et al: Long-term hydrological changes in northern Iberia (4.9–0.9 ky BP) from speleothem Mg/Ca ratios and cave monitoring (Ojo Guareña Karst Complex, Spain). *Environmental Earth Sciences*:1-13, 2015.
16. Vadillo JM, Vadillo I, Carrasco F, et al: Spatial distribution profiles of magnesium and strontium in speleothems using laser-induced breakdown spectrometry. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 361:119-123, 1998.

17. Anabitarte F, Cobo A, Lopez-Higuera JM: Laser-Induced Breakdown Spectroscopy: Fundamentals, Applications, and Challenges. *ISRN Spectroscopy* 2012:1-12, 2012.
18. Noll R: Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. Fundamentals and Applications.
19. Winefordner JD, Gornushkin IB, Pappas D, et al: Novel uses of lasers in atomic spectroscopy. Plenary Lecture. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 15:1161-1189, 2000.
20. Bäuerle DW: *Laser Processing and Chemistry*, Springer, 2011.
21. Michael A. Lieberman AJL: *Principles of plasma discharges and materials processing* (ed 2), Wiley, 2005.
22. Bracewell RN, Budden KG, Ratcliffe JA, et al: The ionospheric propagation of low-frequency and very-low-frequency radio waves over distances less than 1000 km. *Proceedings of the Institution of Electrical Engineers-London* 98:221-236, 1951.
23. Cowling TG: STELLAR ENERGY AND STELLAR EVOLUTION. *Nature* 180:479-479, 1957.
24. Fowler TK, Hua DD: Model predictions for auxiliary heating in spheromaks. *Plasma Physics Reports* 23:719-722, 1997.
25. Kruer WL: Laser plasma interactions with intensities from 10(12)-10(21) W/cm(2). *Physics of Plasmas* 10:2087-2092, 2003.
26. De Giacomo A, Dell'Aglio M, Gaudiuso R, et al: Effects of the background environment on formation, evolution and emission spectra of laser-induced plasmas. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 78:1-19, 2012.
27. Gamaly EG, Rode AV: Physics of ultra-short laser interaction with matter: From phonon excitation to ultimate transformations. *Progress in Quantum Electronics* 37:215-323, 2013.
28. Aguilera JA, Aragón C, Peñalba F: Plasma shielding effect in laser ablation of metallic samples and its influence on LIBS analysis. *Applied Surface Science* 127-129:309-314, 1998.
29. *Laser Processing of Materials. Fundamentals, Applications and Developments*, in Schaaf P (ed), Vol 139 Springer, 2010.
30. Joaquín J. Camacho LD, Alicia Marin-Roldan., Samuel Moncayo aJOC: Plume Dynamics of Laser-Produced Swine Muscle Tissue Plasma. *Applied Spectroscopy* 70:10, 2016.
31. Colonna G, Casavola A, Capitelli M: Modelling of LIBS plasma expansion. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 56:567-586, 2001.
32. Singh RK, Narayan J: Pulsed-laser evaporation technique for deposition of thin-films - physics and theoretical-model. *Physical Review B* 41:8843-8859, 1990.
33. Camacho JJ, Díaz L, Santos M, et al: Time-resolved optical emission spectroscopic measurements of He plasma induced by a high-power CO2 pulsed laser. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 66:57-66, 2011.
34. Clegg SM, Wiens R, Misra AK, et al: Planetary Geochemical Investigations Using Raman and Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. *Applied Spectroscopy* 68:925-936, 2014.
35. Garcia-Escarzaga A, Moncayo S, Gutierrez-Zugasti I, et al: Mg/Ca ratios measured by laser induced breakdown spectroscopy (LIBS): a new approach to decipher environmental conditions. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 30:1913-1919, 2015.

36. M. J. Turrero AG, L. Sánchez, A. I. Ortega, J. Martín-Chivelet, P. Gómez, A. Escribano: Variations in Trace Elements of Drip Waters in Kaite Cave (N Spain): Significance in Terms of Present and Past Processes in the Karst System. *Hydrogeological and Environmental Investigations in Karst Systems* 1:8, 2015.
37. Cuñat J, Palanco S, Carrasco F, et al: Portable instrument and analytical method using laser-induced breakdown spectrometry for in situ characterization of speleothems in karstic caves. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 20:295-300, 2005.
38. Andrew Sillen MK: Strontium and paleodietary research: a review. *American Journal of Physical Anthropology* 25:67 - 90, 1982.
39. Moncayo S, Manzoor S, Ugidos T, et al: Discrimination of human bodies from bones and teeth remains by Laser Induced Breakdown Spectroscopy and Neural Networks. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 101:21-25, 2014.
40. Santos D, Samad RE, Trevizan LC, et al: Evaluation of Femtosecond Laser-Induced Breakdown Spectroscopy for Analysis of Animal Tissues. *Applied Spectroscopy* 62:1137-1143, 2008.
41. Ali B, Bulajic D, Corsi M, et al: mu-LIBS/mu-Raman spectroscopic analysis of pigments in a roman fresco, in Salimbeni R (ed): *Laser Techniques and Systems in Art Conservation*, Vol 4402. Bellingham, Spie-Int Soc Optical Engineering, 2001, pp 25-31.
42. Burgio L, Clark RJH, Stratoudaki T, et al: Pigment identification in painted artworks: A dual analytical approach employing laser-induced breakdown spectroscopy and Raman microscopy. *Applied Spectroscopy* 54:463-469, 2000.
43. Khater MA, van Kampen P, Costello JT, et al: Time-integrated laser-induced plasma spectroscopy in the vacuum ultraviolet for the quantitative elemental characterization of steel alloys. *Journal of Physics D-Applied Physics* 33:2252-2262, 2000.
44. Baker A, Smith CL, Jex C, et al: Annually Laminated Speleothems: a Review. *International Journal of Speleology* 37:193-206, 2008.
45. Huang P, Ke Y, Lu Q, et al: Analysis of postmortem metabolic changes in rat kidney cortex using Fourier transform infrared spectroscopy. *Spectroscopy* 22:21-31, 2008.
46. Zhou C, Byard RW: Factors and processes causing accelerated decomposition in human cadavers – An overview. *Journal of Forensic and Legal Medicine* 18:6-9, 2011.
47. Kaliszán M, Hauser R, Kernbach-Wightón G: Estimation of the time of death based on the assessment of post mortem processes with emphasis on body cooling. *Legal Medicine* 11:111-117, 2009.
48. Byrd JH, Peace MR: Entomotoxicology: Drugs, Toxins, and Insects, in *Forensic Chemistry Handbook* (ed 1st ed), Vol Ch 14. New York - USA, John Wiley & Sons, 2012.
49. Cina SJMD: Flow Cytometric Evaluation of DNA Degradation: A Predictor Postmortem Interval?, in *Am. J. Foren. Med. Path.*, Vol 15, 1994, pp 300-302.
50. Bauer M, Gramlich I, Polzin S, et al: Quantification of mRNA degradation as possible indicator of postmortem interval—a pilot study. *Legal Medicine* 5:220-227, 2003.
51. Bauer M, Polzin S, Patzelt D: Quantification of RNA degradation by semi-quantitative duplex and competitive RT-PCR: a possible indicator of the age of bloodstains? *Forensic Science International* 138:94-103, 2003.
52. Sabucedo AJ, Furton KG: Estimation of postmortem interval using the protein marker cardiac Troponin I. *Forensic Science International* 134:11-16, 2003.

53. Kang S, Kassam N, Gauthier ML, et al: Post-mortem changes in calmodulin binding proteins in muscle and lung. *Forensic Science International* 131:140-147, 2003.
54. J. J. Camacho LD: Time-and space-resolved spectroscopic characterization of laser-induced swine muscle tissue plasma. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy* 111:92-101, 2015.
55. Diaz L, Camacho JJ, Sanz M, et al: Temporal evolution study of the plasma induced by CO₂ pulsed laser on targets of titanium oxides. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 86:88-93, 2013.
56. Martinez-Ramirez S, Diaz L, Camacho JJ: CW CO₂-Laser-Induced Formation of Fulgurite on Lime-Pozzolan Mortar. *Journal of the American Ceramic Society* 96:2824-2830, 2013.
57. Camacho JJ, Diaz L, Cid JP, et al: Time-resolved study of the plasma-plume emission during the nanosecond ablation of lithium fluoride. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 88:203-210, 2013.
58. Camacho JJ, Díaz L, Cid JP, et al: Time-resolved spectroscopic diagnostic of the CO₂ plasma induced by a high-power CO₂ pulsed laser. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 66:698-705, 2011.
59. Camacho JJ, Díaz L, Santos M, et al: Time-resolved optical emission spectroscopy of laser-produced air plasma. *Journal of Applied Physics* 107:083306, 2010.
60. Camacho JJ, Díaz L, Santos M, et al: Temporal evolution of the laser-induced plasma generated by IR CO₂ pulsed laser on carbon targets. *Journal of Applied Physics* 106:033306, 2009.
61. Lin QY, Wang X, Niu GH, et al: Angular-based spatially resolved laser-induced breakdown spectroscopy: a new technique for the effective enhancement of signals without an external time delay system. *Chinese Science Bulletin* 59:3377-3384, 2014.
62. Farid N, Harilal SS, Ding H, et al: Emission features and expansion dynamics of nanosecond laser ablation plumes at different ambient pressures. *Journal of Applied Physics* 115:9, 2014.
63. Harilal SS, Miloshevsky GV, Diwakar PK, et al: Experimental and computational study of complex shockwave dynamics in laser ablation plumes in argon atmosphere. *Physics of Plasmas* 19:11, 2012.
64. Harilal SS, Sizyuk T, Hassanein A, et al: The effect of excitation wavelength on dynamics of laser-produced tin plasma. *Journal of Applied Physics* 109:9, 2011.
65. Mateos Cachorros A: Apuntes sobre estacionalidad y subsistencia de los grupos humanos del Cantábrico Occidental en torno al 13000 B.P. *Trabajos de Prehistoria* 59:14, 2002.
66. Monks GG: *Seasonality Studies*, in *Advances in Archaeological Method and Theory*, Vol 4. New York, Academic Press, 1981, p 63.
67. Bökönyi S: A new method for the determination of the number of individuals in animal bone material. *American Journal of Archaeology* 74:2, 1970.
68. Grayson DK: Minimal numbers and sample size in vertebrate faunal analysis. *American Antiquity* 43:12, 1978.
69. Casteel RW, Grayson DK: Terminological Problems In Quantitative Faunal Analysis. *World Archaeology* 9:235-242, 1977.
70. Ducos P: La contribution de l'archéozoologie a l'estimation des quantites de Neurriture. Evaluation du Nombre Initial d'individuos, in Clutton Brock JG (ed): *Animals en Archaeology 3. Early Herdes and their Flocks*, Vol BAR, 1984, pp 13-27.

71. Gautier A: How I do count, let me count the ways?, in Grigson C. & Clutton-Brock J (ed): *Animals and Archaeology IV: Husbandry in Europe*, Vol 227. Oxford, BAR, 1984, pp 237-252.
72. Lyman RL: Quantitative units and terminology in zooarchaeology. *American Antiquity* 59:36-71, 1994.
73. Rogers AR: Analysis of bone counts by maximum likelihood. *Journal of Archaeological Science* 27:111-125, 2000.
74. Manzoor S, Moncayo, S., Navarro-Villoslada, F., Ayala, J.A., Izquierdo-Hornillos, R., Manuel de Villena, F.J., Caceres, J.O.: Rapid identification and discrimination of bacterial strains by laser induced breakdown spectroscopy and neural networks. *Talanta* 121:5, 2014.
75. Anzano JM, Villoria MA, Ruíz-Medina A, et al: Laser-induced breakdown spectroscopy for quantitative spectrochemical analysis of geological materials: Effects of the matrix and simultaneous determination. *Analytica Chimica Acta* 575:230-235, 2006.
76. Cremers DA, Radziemski LJ: *Handbook of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy* (ed Chichester - UK), John Wiley & Sons, 2006.
77. Griem HR: *Principles of Plasma Spectroscopy*, Cambridge University Press, 2005.
78. Ciucci A, Corsi M, Palleschi V, et al: New Procedure for Quantitative Elemental Analysis by Laser-Induced Plasma Spectroscopy. *Applied Spectroscopy* 53:960-964, 1999.
79. Marin-Roldan A, Manzoor S, Moncayo S, et al: Determination of the postmortem interval by Laser Induced Breakdown Spectroscopy using swine skeletal muscles. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 88:186-191, 2013.
80. Lasheras RJ, Bello-Gálvez C, Anzano J: Identification of polymers by LIBS using methods of correlation and normalized coordinates. *Polymer Testing* 29:1057-1064, 2010.
81. Senesi GS, Dell'Aglio M, Gaudiuso R, et al: Heavy metal concentrations in soils as determined by laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS), with special emphasis on chromium. *Environmental Research* 109:413-420, 2009.
82. Alvira FC, Orzi DJO, Bilmes GM: Surface treatment analyses of car bearings by using laser-induced breakdown spectroscopy. *Applied Spectroscopy* 63:192-198, 2009.
83. Cardone MJ, Palermo PJ, Sybrandt LB: Potential error in single-point-ratio calculations based on linear calibration curves with a significant intercept. *Analytical Chemistry* 52:1187-1191, 1980.
84. Radziemski LJ, Loree TR, Cremers DA, et al: Time-resolved laser-induced breakdown spectrometry of aerosols. *Analytical Chemistry* 55:1246-1252, 1983.
85. Mao XL, Shannon MA, Fernandez AJ, et al: Temperature and Emission Spatial Profiles of Laser-Induced Plasmas during Ablation Using Time-Integrated Emission Spectroscopy. *Applied Spectroscopy* 49:1054-1062, 1995.
86. Lochte-Holtgreven W, Richter J: *Plasma diagnostics*. Edited by W. Lochte-Holtgreven. Contributors: J. Richter [and others]. Amsterdam, North-Holland Pub. Co, 1968.
87. Griem HR: *Spectral Line Broadening by Plasmas*. New York, Academic Press, 1974.
88. Aguilera JA, Aragón C: Multi-element Saha-Boltzmann and Boltzmann plots in laser-induced plasmas. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 62:378-385, 2007.
89. McWhirter RWP: *Plasma Diagnostic Techniques* (ed First edition). New York, NY, Academic Press, 1995.
90. Ageev B, Ponomarev Y, Sapozhnikova V: Laser Photoacoustic Detection of CO₂ in Old Disc Tree-Rings. *Sensors* 10:3305-3313, 2010.

91. Pardini L, Legnaioli S, Lorenzetti G, et al: On the determination of plasma electron number density from Stark broadened hydrogen Balmer series lines in Laser-Induced Breakdown Spectroscopy experiments. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 88:98-103, 2013.
92. Zhigilei LV, Lin Z, Ivanov DS: Atomistic Modeling of Short Pulse Laser Ablation of Metals: Connections between Melting, Spallation, and Phase Explosion†. *The Journal of Physical Chemistry C* 113:11892-11906, 2009.
93. Grant KJ, Paul GL: Electron Temperature and Density Profiles of Excimer Laser-Induced Plasmas. *Applied Spectroscopy* 44:1349-1354, 1990.
94. Moon H-Y, Herrera KK, Omenetto N, et al: On the usefulness of a duplicating mirror to evaluate self-absorption effects in laser induced breakdown spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 64:702-713, 2009.
95. De Giacomo A, Dell'Aglio M, De Pascale O, et al: Laser induced breakdown spectroscopy on meteorites. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 62:1606-1611, 2007.
96. NIST Atomic Spectra Database. (http://physics.nist.gov/PhysRefData/ASD/lines_form.html), 2015.
97. Marcos-Martinez D, Ayala JA, Izquierdo-Hornillos RC, et al: Identification and discrimination of bacterial strains by laser induced breakdown spectroscopy and neural networks. *Talanta* 84:730-737, 2011.
98. Moncayo S, Manzoor S, Navarro-Villoslada F, et al: Evaluation of supervised chemometric methods for sample classification by Laser Induced Breakdown Spectroscopy. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 146:354-364, 2015.
99. Brown SD, Tauler R, Walczak B: *Comprehensive Chemometrics: Chemical and Biochemical Data Analysis*. Amsterdam, Netherlands, Elsevier, 2009.
100. Kowalski BR: Chemometrics - Views and propositions. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* 15:201-203, 1975.
101. Vandeginste BGM, Sielhorst C, Gerritsen M: The NIPALS algorithm for the calculation of the principal components of a matrix. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 7:286-287, 1988.
102. Ballabio D, Todeschini R: Multivariate Classification for Qualitative Analysis, in Sun D-W (ed): *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*, Vol. San Diego - USA, Academic Press, 2009, pp 83-104.
103. Max W: Fisher Linear Discriminant Analysis, in Technical report, University of Toronto, Kings College Road, Toronto, M5S 3G5, Canada (ed University of Toronto), Vol. Toronto Canada, 2000.
104. Boser BE, Guyon IM, Vapnik VN: A Training Algorithm for Optimal Margin Classifiers, 1992, 1992 (available from ACM)
105. Bro R, Smilde, A.K.: Principal component analysis. *Anal Methods* 6:19, 2014.
106. Pearson K: On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philosophical Magazine* 2:559-572, 1901.
107. Erikssen: Mega- and multivariate analysis.
108. Bouchaffra D, Cheriet, M., Jodoin, P.M., Beck, D.: Machine learning and pattern recognition models in change detection. *Pattern Recognit* 48:2, 2015.
109. Sporns O: Cerebral cartography and connectomics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 370:42-53, 2015.

110. Vogel AC, Church, J.A., Power, J.D., Miezin, F.M., Petersr, S.E., Schlaggar, G.L.: Functional network architecture of reading-related regions across development. *Brain Lang* 125:12, 2013.
111. Gelenbe E, Finkel D, Tripathi SK: Availability of a distributed computer-system with failures. *Acta Informatica* 23:643-655, 1986.
112. Gelenbe E: LEarning in the recurrent random neural network. *Neural Computation* 5:154-164, 1993.
113. Berglund M, Raiko, T., Cho, K.: Measuring the usefulness of hidden units in Boltzmann machines with mutual information. *Neural Netw* 64:6, 2015.
114. Block HD: A review of "perceptrons: An introduction of computational geometry". *Inf Control* 17:21, 1970.
115. Ding S, Li, H., Su, C., Yu, J., Jin, F.: Evolutionary artificial neural networks: a review. *Artif Intell Rev* 39:9, 2011.
116. Runge EF: 10th Ottawa Symposium on Applied Spectroscopy, in, Vol, 1963.
117. Falco ID, Cippa, A.D., Natale, P., Tarantino, E. : Soft computing in engineering design and manufacturing Springer, 1998.
118. Rumelhart DE, Hinton, G.E., Williams, R.J.: Learning representations by back-propagating errors. *Nature* 323:3, 1986.
119. Fritsch J, Dr P, Waibel A, et al: Modular Neural Networks for Speech Recognition, 1996.
120. Sanger TD: Optimal unsupervised learning in a single-layer linear feed-forward neural network. *Neural Netw* 2:14, 1989.
121. Townes CH, Bášov, N. Prójorov, P.: Presentation speech for Nobel prize in Physics, Proceedings, Nobel Prize, 1964 (available from
122. Coherent I: Lasers: Understanding the basic, Photonics Handbook.
123. Overton G, Nogee A, Holton C: Lasers forge 21st century innovations. *Laser Focus World* 50:38+, 2014.
124. Camacho JJ, Diaz L, Martinez-Ramirez S, et al: Time- and space-resolved spectroscopic characterization of laser-induced swine muscle tissue plasma. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 111:92-101, 2015.
125. Telle HH, Ureña AG, Donovan RJ: Laser Chemistry: Spectroscopy, Dynamics and Applications (ed 1), Wiley, 2007.
126. Arai A, Harada Y, Tateno R: Czerny-turner spectroscope, in, Vol Shimadzu Corporation, 2003.
127. Hiliard RL: Imaging spectrograph for multiorder spectroscopy, in, Vol.
128. J. J. Camacho LD: Plume dynamics of laser-produced swine muscle tissue plasma. *Applied Spectroscopy*, 2016.
129. Motto-Ros V, Negre E, Pelascini F, et al: Precise alignment of the collection fiber assisted by real-time plasma imaging in laser-induced breakdown spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 92:60-69, 2014.
130. Turrero MJ, Garralon A, Gomez P, et al: Geochemical evolution of drip-water and present-growing calcite at Kaite cave (N Spain). London, Taylor & Francis Ltd, 2007.
131. Tremaine DM, Froelich PN: Speleothem trace element signatures: A hydrologic geochemical study of modern cave dripwaters and farmed calcite. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 121:522-545, 2013.
132. Day CC, Henderson GM: Controls on trace-element partitioning in cave-analogue calcite. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 120:612-627, 2013.

133. Fairchild IJ, Treble PC: Trace elements in speleothems as recorders of environmental change. *Quaternary Science Reviews* 28:449-468, 2009.
134. Fortes FJ, Vadillo I, Stoll H, et al: Spatial distribution of paleoclimatic proxies in stalagmite slabs using laser-induced breakdown spectroscopy. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 27:868-873, 2012.
135. C. L. Blattler LRK, W. W. Fischer, G. Paris, J. J. Kasbohm & J. A. Higgins: Constraints on ocean carbonate chemistry and pCO₂ in the Archaean and Palaeoproterozoic. *Nat Geosci* 10, 2016.
136. Myers TS: Palaeoclimate CO₂ and late Palaeozoic glaciation. *Nature Geoscience* 9:803-804, 2016.
137. Salzer MW, Hughes MK: Bristlecone pine tree rings and volcanic eruptions over the last 5000 yr. *Quaternary Research* 67:57-68, 2007.
138. Dai JH, Mosleythompson E, Thompson LG: Ice core evidence for an explosive tropical volcanic-eruption 6 years preceding Tambora. *Journal of Geophysical Research-Atmospheres* 96:17361-17366, 1991.
139. Moberg A, Sonechkin DM, Holmgren K, et al: Highly variable Northern Hemisphere temperatures reconstructed from low- and high-resolution proxy data. *Nature* 433:613-617, 2005.
140. Sancey L, Motto-Ros V, Busser B, et al: Laser spectrometry for multi-elemental imaging of biological tissues. *Scientific Reports* 4:6065, 2014.
141. Pinon V, Mateo MP, Nicolas G: Laser-Induced Breakdown Spectroscopy for Chemical Mapping of Materials. *Applied Spectroscopy Reviews* 48:357-383, 2013.
142. Rau GC, Cuthbert MO, Andersen MS, et al: Controls on cave drip water temperature and implications for speleothem-based paleoclimate reconstructions. *Quaternary Science Reviews* 127:19-36, 2015.
143. Genty D, Baker A, Vokal B: Intra- and inter-annual growth rate of modern stalagmites. *Chemical Geology* 176:191-212, 2001.
144. Baker AJ, Matthey DP, Baldini JUL: Reconstructing modern stalagmite growth from cave monitoring, local meteorology, and experimental measurements of dripwater films. *Earth and Planetary Science Letters* 392:239-249, 2014.
145. V. Motto-Ros FP: Intelligent Optical Collection System, in, Vol, 2015.
146. Muñoz-García MB, Cruz J, Martín-Chivelet J, et al: Comparison of speleothem fabrics and microstratigraphic stacking patterns in calcite stalagmites as indicators of paleoenvironmental change. *Quaternary International* 407, Part A:74-85, 2016.
147. Wilhelm W, Noll TG, Ieee: A new mapping technique for automated design of highly efficient multiplexed FIR digital filters. New York, I E E E, 1997.
148. Miziolek AW, Palleschi V, Schechter I: Laser Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) (ed 1). New York - USA, Cambridge University Press, 2008.
149. Zhang J, Ma G, Zhu H, et al: Accurate quantitative analysis of metal oxides by laser-induced breakdown spectroscopy with a fixed plasma temperature calibration method. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 27:1903-1908, 2012.
150. Tognoni E, Hidalgo M, Canals A, et al: Combination of the ionic-to-atomic line intensity ratios from two test elements for the diagnostic of plasma temperature and electron number density in Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 62:435-443, 2007.
151. P.J. Linstrom WGM: NIST Standard Reference Database Number 69. (<http://webbook.nist.gov>).

152. Nordstrom RJ: Study of Laser-Induced Plasma Emission Spectra of N₂, O₂, and Ambient Air in the Region 350 nm to 950 nm. *Applied Spectroscopy* 49:1490-1499, 1995.
153. Massart: Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Volume Part A (ed 1). Amsterdam, The Netherlands, Elsevier Science, 1997.
154. Anzano J, Lasheras R-J, Bonilla B, et al: Classification of polymers by determining of C1:C2:CN:H:N:O ratios by laser-induced plasma spectroscopy (LIPS). *Polymer Testing* 27:705-710, 2008.
155. Querido D: Double logarithmic, linear relationship between plasma sodium/potassium concentration ratio and postmortem interval during the 6–96-h postmortem period in rats. *Forensic Science International* 44:125-134, 1990.
156. Singh D, Prashad R, Parkash C, et al: Linearization of the relationship between serum sodium, potassium concentration, their ratio and time since death in Chandigarh zone of north-west India. *Forensic Science International* 130:1-7, 2002.
157. D. Chrisey GKH: Pulsed Laser Deposition of Thin Films. New York, NY, Wiley, 1994.
158. Motaung DE, Moodley MK, Manikandan E, et al: In situ optical emission study on the role of C-2 in the synthesis of single-walled carbon nanotubes. *Journal of Applied Physics* 107:15, 2010.
159. M.S. Brown CBA: Fundamentals of Laser–Material Interaction and Application to Multiscale Surface Modification, in Springer (ed): *Laser Precision Microfabrication*, Vol. Berlin, 2010,, pp 91–120.
160. Noll R: *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy*. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 2012.
161. Krushelnick K, Clark EL, Allott R, et al: Ultrahigh-intensity laser-produced plasmas as a compact heavy ion injection source. *Ieee Transactions on Plasma Science* 28:1184-1189, 2000.
162. Harilal SS, Miloshevsky GV, Sizyuk T, et al: Effects of excitation laser wavelength on Ly-alpha and He-alpha line emission from nitrogen plasmas. *Physics of Plasmas* 20:10, 2013.
163. Gottfried JL, De Lucia FC, Munson CA, et al: Standoff detection of chemical and biological threats using laser-induced breakdown spectroscopy. *Applied Spectroscopy* 62:353-363, 2008.
164. Kanawade R, Mehari F, Knipfer C, et al: Pilot study of laser induced breakdown spectroscopy for tissue differentiation by monitoring the plume created during laser surgery - An approach on a feedback Laser control mechanism. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 87:175-181, 2013.
165. Hybl JD, Lithgow GA, Buckley SG: Laser-induced breakdown spectroscopy detection and classification of biological aerosols. *Applied Spectroscopy* 57:1207-1215, 2003.
166. Baudelet M, Boueri M, Yu J, et al: Time-resolved ultraviolet laser-induced breakdown spectroscopy for organic material analysis. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 62:1329-1334, 2007.
167. Jelinkova H: *Laser for Medical Applications: Diagnostics, Therapy and Surgery*. Cambridge, UK, Woodhead Publishing, 2013.
168. Y.B. Zeldovich YPR: *Physics of Shock Waves and High-Temperature Hydrodynamics Phenomena*. New York, NY, Dover, 2002.
169. Dyer PE, Sidhu J: Spectroscopic and fast photographic studies of excimer laser polymer ablation. *Journal of Applied Physics* 64:4657-4663, 1988.

170. Kools JCS: Monte-carlo simulations of the transport of laser-ablated atoms in a diluted gas. *Journal of Applied Physics* 74:6401-6406, 1993.
171. Weyl GM: 'Laser-Induced Plasmas and Applications', in *Physics of laser-induced breakdown: an update Vol.* New York: Dekker, 1989.
172. Brundle CR, Evans, C.A., Wilson, S.: *Encyclopaedia of materials characterization: surfaces, interfaces and thin films.* Boston, MA: Butterworth Heinemann, 1992.
173. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39:44-84, 2007.
174. Nriagu J, Boughanen, M., Linder, A., Howe, A., Grant, C., Rattray, R., Vutchkov, M., Lalor, G.: Levels of As, Cd, Pb, Cu, Se and Zn in bovine kidneys and livers in Jamaica. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72:8, 2009.
175. Pacini T: The Importance of Cooperation in Forensic Sciences: The Entomotoxicology. *Ann Forensic Res Anal* 1:2, 2014.
176. Kreitals NM, Watling, R.J.: Multi-element analysis using inductively coupled plasma mass spectrometry and inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy for provenancing of animals at the continental scale. *Forensic Science International* 244:5, 2014.
177. Castro W: *Elemental Analysis of Biological Matrices by Laser Ablation High Resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (LA-HR-ICP-MS) and High Resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (HR-ICP-MS).* Florida International University, 2008.
178. Manzoor S, Ugena L, Tornero-López J, et al: Laser induced breakdown spectroscopy for the discrimination of *Candida* strains. *Talanta* 155:101-106, 2016.
179. Barbagallo M, Dominguez, L.J.: Magnesium and type 2 diabetes. *World J Diabetes* 6:5, 2015.
180. Camacho JJ, Poyato, J.M., Díaz, L., Santos, M.: *Spectroscopic analysis of chemical species in carbon plasmas induced by high-power IR CO₂ laser.* New York, Nova Science Publisher (Novinka), 2011.
181. Lyman RL: *Quantitative Paleozoology,* Cambridge University Press, 2008.
182. Marean CWA, Y.; Nilssen, P., Stone, E. : Estimating the Minimum Number of Skeletal Elements (MNE) in Zooarchaeology: A Review and a New Image-Analysis GIS Approach. *American Antiquity* 66:15, 2001.
183. Kent S: Variability in faunal assemblages - the influence of hunting skill, sharing, dogs, and mode of cooking on faunal remains at a sedentary kalahari community. *Journal of Anthropological Archaeology* 12:323-385, 1993.
184. Dominguez-Rodrigo M, Pickering TR, Bunn HT: Configurational approach to identifying the earliest hominin butchers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:20929-20934, 2010.
185. Magill CR, Ashley GM, Dominguez-Rodrigo M, et al: Dietary options and behavior suggested by plant biomarker evidence in an early human habitat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113:2874-2879, 2016.
186. Ashley GM, Barboni D, Dominguez-Rodrigo M, et al: A spring and wooded habitat at FLK Zinj and their relevance to origins of human behavior. *Quaternary Research* 74:304-314, 2010.

187. Blasco R, Rosell J, Dominguez-Rodrigo M, et al: Learning by Heart: Cultural Patterns in the Faunal Processing Sequence during the Middle Pleistocene. *Plos One* 8:20, 2013.
188. Dominguez-Rodrigo M, Garcia-Perez A: Testing the Accuracy of Different A-Axis Types for Measuring the Orientation of Bones in the Archaeological and Paleontological Record. *Plos One* 8:10, 2013.
189. Ashley GM, Barboni D, Dominguez-Rodrigo M, et al: Paleoenvironmental and paleoecological reconstruction of a freshwater oasis in savannah grassland at FLK North, Olduvai Gorge, Tanzania. *Quaternary Research* 74:333-343, 2010.
190. Gliganic LA, Jacobs Z, Roberts RG, et al: New ages for Middle and Later Stone Age deposits at Mumba rockshelter, Tanzania: Optically stimulated luminescence dating of quartz and feldspar grains. *Journal of Human Evolution* 62:533-547, 2012.

Evaluation of Laser Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) for detection of trace element variation through stalagmites: potential for paleoclimate series reconstructionA. Marín-Roldán ¹, J. A. Cruz ^{2,3}, J. Martín-Chivelet ^{2,3}, M. J. Turrero ⁴,
A. I. Ortega ⁵, J. O. Cáceres ¹¹ Dpt. Química Analítica, Fac. Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain,² Dpt. Estratigrafía, Fac. Ciencias Geológicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain³ Instituto de Geociencias (CSIC, UCM), c/ José Antonio Nováis 12, 28040 Madrid, Spain.⁴ Ciemat, Dpt. Medioambiente, Avda. Complutense, 22, 28040 Madrid, Spain.⁵ CENIEH, Paseo Sierra de Atapuerca s/n, 09002 Burgos, Spain

Received 23 July 2014, accepted 29 August 2014

ABSTRACT

Laser Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) is applied to evaluate the potential of this technique for characterizing trace element ratios (particularly Mg/Ca and Sr/Ca) in the speleothems (cave deposits of calcium carbonate such as stalagmites) that are commonly used to reconstruct time series of past climate change. These geological materials are characterized by a relatively simple internal stratigraphy that reflects their growth history and geochemical changes through that history can reflect variability in environmental parameters such as temperature and rainfall. In this paper, the characterization of methodological and experimental parameters such as sample preparation, microsample size and representativity, sensitivity, linearity, and replicability reveals the high potential of the technique and show clear advantages versus other commonly-used techniques.

1. INTRODUCTION

Inherent advantages to the LIBS technique (which include high speed analysis, little or no sample preparation, and high sensitivity) are making it a very versatile tool in many research areas [1]. Earth Sciences are not an exception, and emergent disciplines such as paleoclimatology require methods capable to yield high-resolution geochemical data through heterogeneous materials to obtain paleoclimate information. Speleothems (cave deposits such as stalagmites and stalactites) are an excellent example [2]. They are widely used in paleoclimate reconstruction because they grow during hundreds or thousands of years by the addition of successive layers of calcium carbonate [3], and simultaneously they are capable of recording past environmental conditions in their chemical composition. The calcium carbonate contains varying amounts of trace elements such as Mg, Sr, Ba, and others, which can be interpreted as climate proxies because their relative abundance can be controlled by environmental factors like surface temperature or rainfall [4-10]. If the growing age is known, speleothems allow the

construction of high-resolution series of climate variability [2-9,11-19].

Several analytical techniques allow the detection of trace elements in speleothems. However, in most cases it is necessary to find a balance between the volume of sample and the accuracy and precision required, and take into account the speed and cost of the analytical procedure. Laser Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) has great potential as an analytical technique since it provides sufficient analytical sensitivity to detect the most abundant trace elements in CaCO₃ micro-samples. It is also much faster since can analyze various trace elements simultaneously [20]. Therefore, it has become a very useful tool to analyze geological samples [21-24]. However, none of these papers has evaluated the potential of the technique in a systematic way, e.g. validating the results by means of tests focused in homogeneity and reproducibility of the analysis, which is one of the main objectives of this paper.

LIBS technique involves the generation of plasma in air at atmospheric pressure by focusing a high-

Corresponding author: Jorge O. Cáceres: jcaceres@quim.ucm.es

Keywords: Laser Induced Breakdown Spectroscopy, Speleothem, Paleoclimatic series.

energy laser beam on the surface of a sample of interest. An optical fibre is used to capture the emission light from the plasma and a spectrometer is used to identify the elemental composition of the target; it can detect point-to-point differences of the elements that form the atomic composition of the sample.

In this paper, an analytical approach to the study of speleothems by LIBS is presented. Several control tests were conducted to check the reliability and accuracy of the technique as well as the representativeness of the data. For this purpose, a stalagmite retrieved from Kaite cave (Ojo Guareña Karst Complex, Spain) was selected, and the Mg/Ca and Sr/Ca intensity ratios were chosen for analyses because of their potential to reconstruct past environmental changes. Variations in these ratios through the growth history of a stalagmite can be used as paleoenvironmental or paleoclimatic indicators because the rate of incorporation of trace elements to the speleothem calcite can be indirectly controlled by environmental factors such as surface temperature or rainfall. Establishing cause/effect relationships between climate and trace element concentration is however not, a straightforward task, and requires complex, long-term monitoring programs capable of characterizing the hydrochemistry of the cave system. If we accept that the distribution coefficients of Mg and Sr are not significantly affected by the small temperature changes of cave air [25], partitioning of Sr²⁺ and Mg²⁺ in calcite under karst analogue experimental conditions or by the minor variations occurring in stalagmite growth rates [11], the research must be focused on the cave drip-waters from which the stalagmite grows. Because the composition of drip-waters depends on water-soil and water-rock interactions occurring before the water reaches the cave, any change in the soil or in climate parameters such as rainfall and temperature can modify the hydrochemistry of drip-water, and thus the trace-elements concentration of the stalagmite. The complex processes involving climate, soil evolution, and water-rock interaction with the host carbonate rock should be clearly understood in order to generate reliable transfer functions between stalagmite geochemistry and paleoclimate in each cave.

2. SAMPLE PREPARATION

The selected stalagmite is being studied in the framework of a broad paleoclimate research program. It was reconstructed from several broken pieces collected in the Buda hall in the innermost part of Kaite cave. The stalagmite is conical in shape and very elongated (112 cm long, 5–6 cm in diameter). It consists exclusively of calcite, and

shows an internal stratigraphy defined by a pervasive micron-scale growth lamination. Unpublished U-series age-dating performed within the research project indicates that the stalagmite grew during the middle Holocene, and confirms the annual character of the lamination.

The pieces of the stalagmite were prepared for analyses according to the following steps: 1) each piece was cut vertically along the growth axis of the stalagmite; 2) 19 successive slabs of 5x8x0.5 cm were prepared to perform petrographic sections with a thickness of 500 microns; 3) the surface of each petrographic section was polished. All sections were studied under a petrographic microscope in order to characterize the internal microstratigraphy and to select the most favourable areas for the analysis. Figure 1 shows a petrographic section of the speleothem.



Figure 1: Stalagmite retrieved from Kaite cave (Ojo Guareña Karst Complex, Spain) showing stratigraphy and dimensions.

3. EXPERIMENTAL SET-UP

LIBS technique and the methodology used in the present work together with the most significant experimental conditions have been previously described [26, 27]. Briefly, LIBS measurements were obtained using a Q-switched Nd:YAG laser (Quantel, Brio model) operating at 1064 nm, with a pulse duration of 4 ns full width at half maximum (FWHM), 4 mm beam diameter and 0.6 mrad divergence. The laser fluence was fixed to 20 J/cm² and the repetition rate was 1 Hz. Samples were placed over an X–Y–Z manual micro-metric positionator with a 0.5 μm stage of travel at every coordinate to ensure that each laser pulse impinged precisely on selected area of the speleothem surface. The laser beam was focused with a 100 mm focal-distance lens. Emission from the plasma was collected with a 4 mm aperture, and 7 mm focus fused silica collimator placed at 3 cm from the sample, and then focused into an optical fiber (1000 μm core diameter, 0.22 numerical aperture), coupled to a spectrometer. The spectrometer system was a user-configured miniature single-fiber system EPP2000, StellarNet (Tampa, FL, U.S.A.) with a CCD detector with a spectral resolution of ±0.5 nm. A grating of 300 l/mm was selected; a spectral resolution of 0.5 nm

was achieved with a 7 μm entrance slit. The wavelength range used was from 200 to 1000 nm. Each point analysed was exposed to 3 laser shots before performing the measurements to eliminate any impurity on the surface. The recorded spectra are the average of 20 laser pulses at each single position. The lateral resolution between spectra was 500 μm . The spectral data was processed using an interface created in Matlab software (Mathworks, 2010a).

4. RESULTS AND DISCUSSION

Mg/Ca and Sr/Ca which are among the most frequently used indicators in paleohydrological/paleoclimate studies were selected [11,28–31]. Figure 2 shows a typical LIBS spectrum of the speleothem sample measured at atmospheric pressure. The more important emission lines were assigned using NIST database [32].

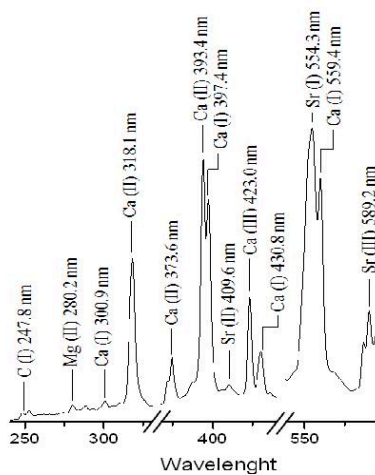


Figure 2: Typical LIBS spectrum of speleothem sample.

The plasma temperature can be checked by monitoring the ratio of two atomic spectral lines in the LIBS experiment (Boltzmann plot) [20,24]. If there is no significant variation in the temperature of the plasma during the experimental measurements, a more accurate comparison between the emission intensity of the spectral lines and the corresponding analytical response is obtained. In this work, the plasma temperature was monitored by the ratio of emission intensities of two lines of calcium: Ca (I) at 430.8 nm and Ca (I) at 445.4 nm ($I_{\text{Ca}430.8}/I_{\text{Ca}445.4}$). Figure 3 shows that the plasma temperature is kept nearly constant throughout the LIBS measurements,

minimizing the matrix effect and providing more accurate results. Therefore, emission intensity variations of the elements in the speleothem sample can only be attributed to elemental concentration changes, enabling paleoclimatic studies.

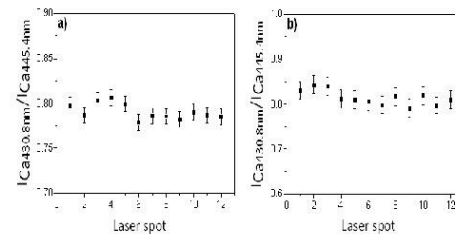


Figure 3: Graph of the ratio of intensities between the two lines of calcium: a) in the same layer, b) in two parallel lines along the growing axes.

4.1 Homogeneity test

A series of measurements were made on the polished section of the stalagmite in order to check the homogeneity of the sample in terms of uniformity of results along a single (annual) growth layer. The test included twelve analyses that revealed a remarkably lateral continuity in both Mg/Ca and Sr/Ca intensity ratios. Figures 4a and c show the results obtained to check the lateral continuity of the growth layer. Figure 4b shows a picture of the thin layer where the uniformity tests were performed, showing the craters left by the LIBS shots.

Even with the micrometric positioning system, the stratigraphy of the thin layer does not allow tracing in the same layer for the first four values in the continuity test as shown in Figure 4a, which are clearly out of line and whose intensity values are also outside the "normal" trend observed in the other measured points. However, a high correlation between Mg/Ca and Sr/Ca ratios with great stability within the layer is observed, showing annual layer uniformity and repeatability.

4.2 Repeatability test

The analytical repeatability was assessed by measuring Mg/Ca and Sr/Ca intensity ratios of 140 single points along two parallel lines separated by 3 mm, collinear to the growth axis of the stalagmite in the same thin section. The results (Figures 5a and c) show a good match between the two transects analyzed. Figure 5b shows the laser shots realized on the surface of speleothem. This test allowed comparing the relationship of Mg/Ca and Sr/Ca to evaluate the stability and

irregularities/mergers within the annual layers, which could have a major influence on the analysis.

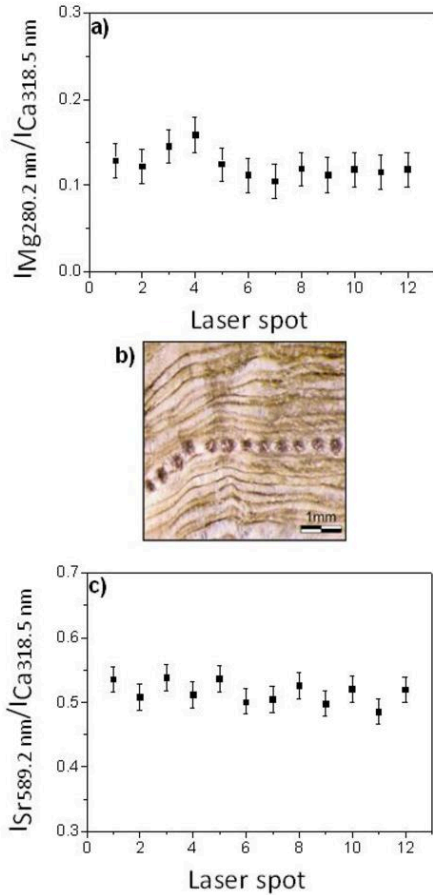


Figure 4: a) lateral homogeneity of the Mg / Ca ratio, b) picture of the layer growth, and c) lateral homogeneity of the Sr / Ca ratio.

As seen in these figures, the tendency of the intensity ratios Mg/Ca and Sr/Ca in the parallel lines along the axis of growth is very similar and the maximum and minimum trends are maintained in both lines. Small differences can be explained by the concentration of Ca which also varies along the growth axis. On the other hand, the stratigraphy of the stalagmite (displacement along growth axes) must be taken into account when explaining the differences in the relationships of emission lines, since there are irregularities and mergers between annual growth layers.

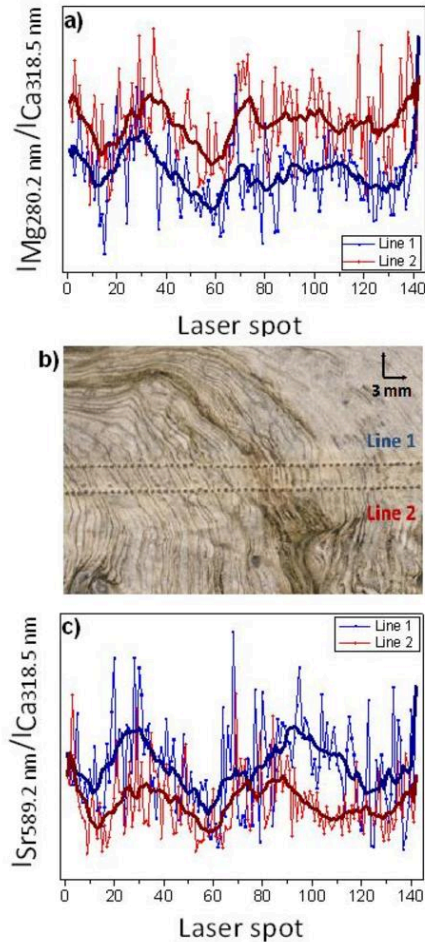


Figure 5: a) Results of replicability test for Mg/Ca ratio, b) picture of laser shots, c) results for the Sr/Ca ratio. Line 1 and 2 has been shifted for better observation. (The displacement along growth axes has not been taken into account)

Results show that speleothem sections can be adequately analyzed by LIBS, despite of the sample inhomogeneity. On the other hand, homogeneity and reproducibility tests demonstrate two aspects: 1) LIBS has enough sensibility from analytical point of view, which can be observed by uniform lateral continuity and 2) enough resolution from geological point of view, as shown by microstratigraphical succession analysis. In addition the test demonstrates that the speleothem samples had not suffered dissolution and/or recrystallization process that could alter the

A. Marín-Roldán et al., Evaluation of Laser Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) for detection of trace element variation through stalagmites: potential for paleoclimate series reconstruction

composition otherwise the homogeneity and replicability were not be observed. Another advantage of LIBS is its capacity to analyze speleothem proxies at several points performing a simultaneous multielemental scanning even providing a map of elemental distribution at a cost much less as compared to other techniques. Thus, the tests demonstrate that LIBS is a suitable technique to obtain compositional evolution series through dated speleothem with paleoclimatic interest.

CONCLUSIONS

LIBS has been employed for detection of variations in trace elements along stalagmites. Tests performed by LIBS show its potential for the reconstruction of paleoclimate series and have been reported for the first time. The tests lead to improve and develop a methodology to analyze a speleothem sample and decipher paleoclimatic information stored on it.

In spite of difference in the homogeneity between successive layers of the speleothem, the LIBS technique performed efficiently, providing accurate results as demonstrated by the repeatability and replicability tests.

The reconstruction of paleoclimate series from speleothems commonly involves large amounts of geochemical analyses performed from tiny samples, so LIBS has demonstrated being an analytical techniques capable of achieving a good balance between: 1) the volume of material analyzed (and hence the spatial scale of analysis), 2) the precision and accuracy of the results, and 3) the speed and cost of the analytical process. Mainly, because although the LIBS technique only vaporizes a minuscule fraction of the sample in each laser shot, it provides good analytical sensitivity to the trace elements present in the speleothem.

LIBS allow replicability of high-speed analysis, even for long series, revealing the high potential of the technique and clear advantages over other commonly-used techniques, with reasonable spatial resolution and excellent reproducibility.

ACKNOWLEDGMENTS

This work is a contribution to projects CGL2010-21499-BTE and CGL2013-43257-R, and to the research's groups "Paleoclimatology and Global Change" and "Laser Chemistry" of the UCM (Spain). We thank for the facilities and permissions given by the Junta de Castilla y León (Spain) for accessing and working in the Kaite Cave in Ojo Guareña Natural Monument. The collaboration of the "Edelweiss Speleological Group" from the

"Excelentísima Diputación Provincial de Burgos" is also greatly acknowledged.

REFERENCES AND NOTES

- [1] Fortes, F. J., Moros, J., Lucena, P., Cabalín, L. M., Lasema, J. J., Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 640–669.
- [2] Martín-Chivelet, J., Muñoz-García, M. B., Ortega, A. I., Cruz-Martínez, J., Garralón, A., Turrero, M. J., Speleothem Microstratigraphy: Some Clues for Paleoclimate Series Reconstruction at Centennial to Decadal Scales, *Ciènc. Terra*, **2013**, *18*.
- [3] Baker, A., Smith, C., Jex, C., Fairchild, I., Genty, D., Fuller, L., Annually Laminated Speleothems: A Review. *Int. J. Speleol.*, **2008**, *37*.
- [4] Mayayo, M. J., Bauluz, B., López-Galindo, A., González-López, J. M., Mineralogy and Geochemistry of the Carbonates in the Calatayud Basin (Zaragoza, Spain). *Chem. Geol.*, **1996**, *130*, 123–136.
- [5] Fairchild, I. J., Borsato, A., Tooth, A. F., Frisia, S., Hawkesworth, C. J., Huang, Y., McDermott, F., Spiro, B., Controls on Trace Element (Sr–Mg) Compositions of Carbonate Cave Waters: Implications for Speleothem Climatic Records, *Chem. Geol.*, **2000**, *166*, 255–269.
- [6] Fairchild, I. J., Smith, C. L., Baker, A., Fuller, L., Spöt, C., Mathey, D., McDermott, F., E.I.M.F. Modification and Preservation of Environmental Signals in Speleothems, *Earth-Sci. Rev.*, **2006**, *75*, 105–153.
- [7] Kuczumow, A., Genty, D., Chevallier, P., Nowak, J., Ro, C.-U., Annual Resolution Analysis of a SW-France Stalagmite by X-Ray Synchrotron Microprobe Analysis, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **2003**, *58*, 851–865.
- [8] Borsato, A., Frisia, S., Fairchild, I. J., Somogyi, A., Susini, J., Trace Element Distribution in Annual Stalagmite Laminae Mapped by Micrometer-Resolution X-Ray Fluorescence: Implications for Incorporation of Environmentally Significant Species, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **2007**, *71*, 1494–1512.
- [9] Hellstrom, J. C., McCulloch, M. T., Multi-Proxy Constraints on the Climatic Significance of Trace Element Records from a New Zealand Speleothem, *Earth Planet. Sci. Lett.*, **2000**, *179*, 287–297.
- [10] Bourdin, C., Douville, E., Genty, D. Alkaline-Earth Metal and Rare-Earth Element Incorporation Control by Ionic Radius and Growth Rate on a Stalagmite from the Chauvet Cave, Southeastern France, *Chem. Geol.*, **2011**, *290*, 1–11.
- [11] Fairchild, I. J., Treble, P. C., Trace Elements in Speleothems as Recorders of Environmental Change, *Quat. Sci. Rev.*, **2009**, *28*, 449–468.
- [12] Fairchild, I. J. *Speleothem Science: From Process to Past Environments*; Blackwell Quaternary Geoscience Series; Wiley: Hoboken, N.J., 2012.
- [13] Treble, P., Shelley, J. M. G., Chappell, J., Comparison of High Resolution Sub-Annual Records of Trace Elements in a Modern (1911–1992) Speleothem with Instrumental Climate Data from Southwest Australia, *Earth Planet. Sci. Lett.*, **2003**, *216*, 141–153.
- [14] Goede, A., Continuous Early Last Glacial Palaeoenvironmental Record from a Tasmanian Speleothem Based on Stable Isotope and Minor Element Variations, *Quat. Sci. Rev.*, **1994**, *13*, 283–291.
- [15] Bar-Matthews, M., Ayalon, A., Kaufman, A., Wasserburg, G. J., The Eastern Mediterranean Paleoclimate as a Reflection of

A. Marín-Roldán et al., Evaluation of Laser Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) for detection of trace element variation through stalagmites: potential for paleoclimate series reconstruction

- Regional Events: Soreq Cave, Israel, *Earth Planet. Sci. Lett.*, **1999**, 166, 85–95.
- [16] Martín-Chivelet, J., Muñoz-García, M. B., Domínguez-Villar, D., Turrero, M. J., Ortega, A. I., Comparative analysis of stalagmites from two caves of northern Spain. Implications for Holocene paleoclimate studies, *Geol. Belg.*, **2007**, 9 (2006).
- [17] Dorale, J. A., Edwards, R. L., Jr, E. C. A., Shen, C.-C., Richards, D. A., Cheng, H., Uranium-Series Dating of Speleothems: Current Techniques, Limits, & Applications. In *Studies of Cave Sediments*; Sasowsky, I. D.; Mylroie, J., Eds.; Springer US, **2004**, 177–197.
- [18] Ortega, R., Maire, R., Devès, G., Quinif, Y., High-Resolution Mapping of Uranium and Other Trace Elements in Recrystallized Aragonite–calcite Speleothems from Caves in the Pyrenees (France): Implication for U-Series Dating, *Earth Planet. Sci. Lett.*, **2005**, 237, 911–923.
- [19] Roberts, M. S., Smart, P. L., Baker, A., Annual Trace Element Variations in a Holocene Speleothem, *Earth Planet. Sci. Lett.*, **1998**, 154, 237–246.
- [20] Cremers, D. A., Radziemski, L. J., Front Matter. In *Handbook of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy*; John Wiley & Sons, Ltd, **2006**; pp. i–xviii.
- [21] Vadillo, J. M., Vadillo, I., Carrasco, F., Laserna, J. J., Spatial Distribution Profiles of Magnesium and Strontium in Speleothems Using Laser-Induced Breakdown Spectrometry, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1998**, 361, 119–123.
- [22] Cuñat, J., Palanco, S., Carrasco, F., Simón, M. D., Laserna, J. J., Portable Instrument and Analytical Method Using Laser-Induced Breakdown Spectrometry for in Situ Characterization of Speleothems in Karstic Caves, *J. Anal. At. Spectrom.*, **2005**, 20, 295–300.
- [23] Fortes, F. J., Vadillo, I., Stoll, H., Jiménez-Sánchez, M., Moreno, A., Laserna, J. J., Spatial Distribution of Paleoclimatic Proxies in Stalagmite Slabs Using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy, *J. Anal. At. Spectrom.*, **2012**, 27, 868.
- [24] Tognoni, E., Hidalgo, M., Canals, A., Cristoforetti, G., Legnaioli, S., Salvetti, A., Palleschi, V., Combination of the Ionic-to-Atomic Line Intensity Ratios from Two Test Elements for the Diagnostic of Plasma Temperature and Electron Number Density in Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.*, **2007**, 62, 435–443.
- [25] Huang, Y., Fairchild, I. J., Partitioning of Sr²⁺ and Mg²⁺ into Calcite under Karst-Analogue Experimental Conditions, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **2001**, 65, 47–62.
- [26] Manzoór, S., Moncayo, S., Navarro-Villoslada, F., Ayala, J. A., Izquierdo-Hornillos, R., de Villena, F. J. M., Cáceres, J. O., Rapid Identification and Discrimination of Bacterial Strains by Laser Induced Breakdown Spectroscopy and Neural Networks, *Talanta*, **2014**.
- [27] Marín-Roldán, A., Manzoór, S., Moncayo, S., Navarro-Villoslada, F., Izquierdo-Hornillos, R., Cáceres, J. O., Determination of the Postmortem Interval by Laser Induced Breakdown Spectroscopy Using Swine Skeletal Muscles, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.*
- [28] Takesue, R. K., van Geen, A., Mg/Ca, Sr/Ca, and Stable Isotopes in Modern and Holocene *Protothaca staminea* Shells from a Northern California Coastal Upwelling Region, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **2004**, 68, 3845–3861.
- [29] Cardinal, D., Hamelin, B., Bard, E., Pätzold, J., Sr/Ca, U/Ca and $\delta^{18}\text{O}$ Records in Recent Massive Corals from Bermuda: Relationships with Sea Surface Temperature, *Chem. Geol.*, **2001**, 176, 213–233.
- [30] Sosdian, S., Gentry, D. K., Lear, C. H., Grossman, E. L., Hicks, D., Rosenthal, Y., Strontium to Calcium Ratios in the Marine Gastropod *Conus ermineus*: Growth Rate Effects and Temperature Calibration, *Geochem. Geophys. Geosystems*, **2006**, 7, n/a–n/a.
- [31] Freitas, P., Clarke, L. J., Kennedy, H., Richardson, C., Abrantes, F., Mg/Ca, Sr/Ca, and Stable-Isotope ($\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^{13}\text{C}$) Ratio Profiles from the Fan Mussel *Pinna nobilis*: Seasonal Records and Temperature Relationships, *Geochem. Geophys. Geosystems*, **2005**, 6, n/a–n/a.
- [32] NIST Atomic Spectroscopy Information. Cited Febr. 5 2014 <http://www.nist.gov/atomicspectroscopy.cfm>.



Contents lists available at ScienceDirect

Spectrochimica Acta Part B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/sab

Technical note

Determination of the postmortem interval by Laser Induced Breakdown Spectroscopy using swine skeletal muscles

A. Marín-Roldan, S. Manzoor, S. Moncayo, F. Navarro-Villoslada, R.C. Izquierdo-Hornillos, J.O. Caceres*

Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 November 2012

Accepted 13 July 2013

Available online 20 July 2013

Keywords:

Postmortem interval

Swine

Laser Induced Breakdown Spectroscopy

ABSTRACT

Skin and muscle samples are useful to discriminate individuals as well as their postmortem interval (PMI) in crime scenes and natural or caused disasters. In this study, a simple and fast method based on Laser Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) has been developed to estimate PMI using swine skeletal muscle samples. Environmental conditions (moisture, temperature, fauna, etc.) having strong influence on the PMI determination were considered. Time-dependent changes in the emission intensity ratio for Mg, Na, H α and K were observed, as a result of the variations in their concentration due to chemical reactions in tissues and were correlated with PMI. This relationship, which has not been reported previously in the forensic literature, offers a simple and potentially valuable means of estimating the PMI.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The postmortem interval (PMI) refers to the time since death and its estimation is extremely important in criminal, civil and forensic investigations [1]. Postmortem decomposition is reported to begin immediately after death involving the breakdown of soft tissues due to the autolysis and putrefaction processes [2], and often with superimposed insect activity [3]. A death event is followed by a number of complicated chemical reactions which continue to occur within the cells, and cause specific time-dependent changes in metabolism and sub-cellular structures, enabling to determine PMI [1]. Many methods have been employed to accurately determine the PMI, also known as time of death (TOD), but the accuracy of these methods still leaves a high time uncertainty and needs improvements [4]. From an entomological point of view, since insect growth and development are heavily influenced by geographical, topological and environmental conditions, the difficulty in accounting for the conditions at the scene prior to discovery introduces some uncertainty in application. This variability in the environmental conditions made a well-characterized foundation of workable information difficult to attain [5]. Actually, methods of PMI estimation include body temperature measurements and postmortem chemical changes in the body [4]. In addition, some methods have also focused on the degradation of nucleic acids including DNA and RNA [1,6–8] and proteins within different tissues [9,10]. However, these methods require specialized staff and laboratories, and in some cases complicated and costly analysis procedures.

A significant relationship has been established between the ratio of postmortem sodium and potassium concentration variation with PMI

in wistar rat serum [11] and human blood [12] samples. However, authors showed that internal and external environmental factors as well as the cause of death significantly affect PMI prediction due to the fast changes of this ratio in the serum and plasma samples (0–12 h) [13]. On the other hand, individual biological variability also limits the usefulness of PMI prediction based on these ratio measurements. Ideally, the concentration of the constituents at any given postmortem interval should display minimal individual biological variation and should be independent of environmental conditions.

Laser Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) has been a subject of research for the past few decades because of its unique features and wide variety of applications in various fields [14,15]. In recent years, LIBS has become a powerful analytical tool because of its ability to carry out a rapid qualitative and quantitative analysis of different samples [16,17]. LIBS analyzes a sample by direct measurement of the atomic emission of the elements from laser-induced plasma generated by the ablation of the sample, providing an immediate spectral fingerprint which is representative of its elemental composition [18]. Moreover, the technique requires little or no sample preparation as opposed to biochemical methods.

The spatial distribution of volumetric energy density generated by laser irradiation drives all pulsed laser ablation processes [19]. In case of laser–tissue interaction, this distribution is controlled by the incident radiant exposure and the optical absorption and scattering properties of the tissue. A detailed description of laser–tissue interaction has been the subject of many reviews discussing general aspects of this process [20–22]. Specific laser ablation processes resulting from nonlinear absorption have also been considered [23,24].

This paper focuses on the development of a simple, fast and direct analytical method for the determination of PMI based on LIBS using muscle tissue samples. Swine muscle tissues were selected due to similar

* Corresponding author.

E-mail address: jcaceres@quim.ucm.es (J.O. Caceres).

physiological decomposition with that of human muscle tissues. Different environmental conditions (moisture, temperature, fauna, etc.) having strong influence on the PMI determination have been considered.

2. Materials and methods

2.1. Sample preparation

The study was conducted with the skeletal muscle samples of two pigs obtained from a licensed industrial slaughterhouse with all necessary certificates in compliance with the formal requirements of the European Union. The pigs were not killed only for the purpose of carrying out this experiment rather they were randomly selected from the stock killed for daily consumption purpose. Both pigs were brought from similar feeding and growing conditions. Duplicate samples of skeletal muscle (500–600 g) from each pig were stored in three different experimental conditions, i.e., a closed plastic container, in open air, and in open air covered with a metal mesh, keeping in the same place at ambient temperature and protected from rain. From each sample three sub-samples were measured at 0, 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28 and 35 days, where zero refers to the day the pigs were killed. To ensure sample homogeneity, tissues were lyophilized. 250 mg of tissue was ground using an agate mortar and pestle for 5 min and subsequently, compressed into a compact pellet using a hydraulic press at 10 t/cm². The thickness and diameter of the pellets were around 2 mm and 12 mm, respectively. The pellets were directly analyzed without further preparation.

2.2. LIBS set-up

The LIBS set-up and methodology used in the present work have already been described elsewhere [18]. Thus, we only describe the experimental conditions relevant to the study presented here. Fig. 1 shows a schematic view of the experimental setup. LIBS measurements were obtained using a Q-switched Nd:YAG laser (Quantel, Brio model) operating at 1064 nm, with a pulse duration of 4 ns full width at half maximum (FWHM), 4 mm beam diameter and 0.6 mrad divergence. Samples were placed over an X–Y–Z manual micro-metric positionator with a 0.5 μm stage of travel at every coordinate to ensure that each laser pulse impinged on the pellet. The laser beam was focused on the surface of the pellet with a 100 mm focal-distance lens, producing a spot of 100 μm in diameter measured with a microscopic-micrometer. The laser fluence was fixed to 20 J/cm² and the repetition rate was 1 Hz. Emission from the plasma was collected with a 4-mm aperture and a 7 mm focus fused silica collimator placed at 3 cm from the sample, and then focused into an optical fiber (1000 μm core diameter, 0.22 numerical aperture), coupled to a spectrometer. The spectrometer system was a user-configured miniature single-fiber system EPP2000 StellarNet (Tampa, FL, U.S.A.) with a charged coupled device detector

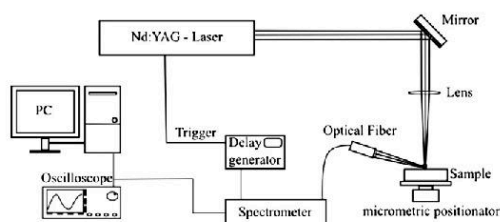


Fig. 1. The experimental setup, including a Nd:YAG laser, a delay generator, a micrometric positionator, a 1 m optical fiber, and an optical charge coupled device (CCD) spectrometer.

(CCD). A grating of 300 l/mm was selected which allowed to achieve a spectral resolution of 0.5 nm using a 7 μm entrance slit. The wavelength range used was from 200 to 1000 nm. Therefore, 2048 data points were recorded for each sample. The detector integration time was set to 1 ms. To prevent the detection of bremsstrahlung, the detector was triggered with a 5 μs delay time between the laser pulse and the acquired plasma radiation using a digital delay generator (Stanford model DG535).

2.3. LIBS measurements

All the pellets were analyzed at room conditions. Five LIBS spectra were obtained averaging 20 individual spectra for each pellet, that were measured by impinging the laser beam in a fresh position on the surface along a vertical straight line avoiding the areas altered by the previous shots moving the pellet about 1 mm with each laser pulse. The total acquisition time was less than 2 min taking into account the spectrometer integration time and the laser pulse repetition.

2.4. Data analysis

Under local thermodynamic equilibrium (LTE) the intensity of an atomic emission spectral line can be described as [16]:

$$I = \frac{hc g_u A_{ul} N}{4\pi \lambda Z} \exp\left(-\frac{E_u}{kT}\right) \quad (1)$$

where h is the Planck's constant, c the velocity of light, g_u the degeneracy of a given energy state, A_{ul} the transition probability (Einstein A coefficient), N the total specie population, λ the emission wavelength, Z the partition function, usually taken as the statistical weight of the ground state, E_u the energy of the upper state, k the Boltzmann's constant and T the plasma temperature.

For a specific spectral line, all the parameters are known except T and N . Therefore, the emission intensity (I) is only related with T and N . If no significant variation of T is assumed along the experimental measurements, a proportional relationship between I and N can be established [17]. However, it is important to note that as LIBS experiment progresses, although all the experimental parameters (integration time, laser power, etc.) remain constant, plasma temperature could vary due to factors such as the matrix-dependence ionization potential of the elements. Therefore, plasma temperature depends on sample composition and specie population [25–27]. From the instrumental point of view, plasma temperature can be fixed to a constant value by controlling the energy of laser pulses by adjusting the working voltage. One way to check plasma temperature is by real time monitoring of the ratio of two atomic

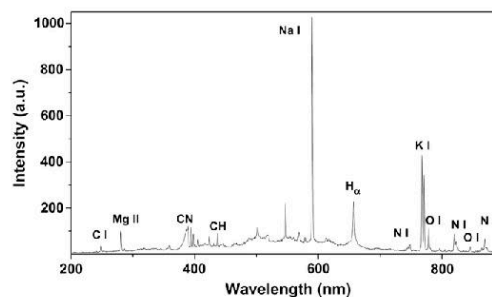


Fig. 2. Typical LIBS spectrum of a lyophilized and pellet-compacted swine skeletal muscle sample stored in air.

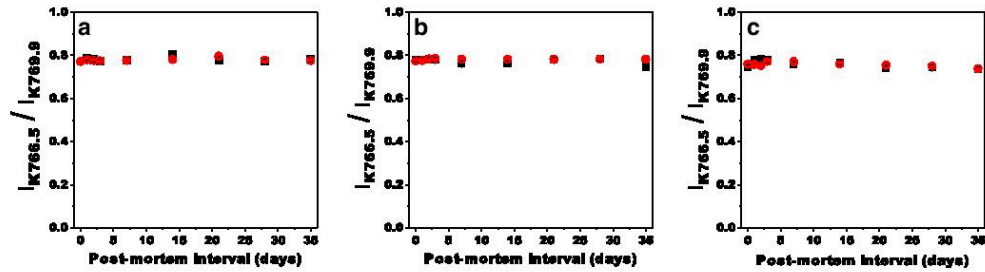


Fig. 3. PMI-dependent emission intensity ratio of the two K I spectral lines ($I_{K766.5}/I_{K769.9}$) for swine tissue samples stored in (a) open air container, (b) open air container covered with a metal mesh and (c) closed plastic container. (■) Swine 1. (●) Swine 2.

spectral lines during the LIBS experiment (Boltzmann's plot) [16,25]. No significant variation of the plasma temperature during the experimental measurements enables a more accurate relationship between the emission intensity of the spectral lines and analytical response (PMI). In this work, the plasma temperature was monitored by the emission intensity ratio of two potassium spectral lines at 766.5 and 769.9 nm ($I_{K766.5}/I_{K769.9}$).

3. Results and discussion

LIBS experiments were performed for skeletal muscle samples of two pigs, stored in three different experimental conditions. Fig. 2 shows a typical LIBS spectrum of a swine skeletal muscle sample stored in open air. Similar spectral profile was observed for all the tissue samples stored in the three different experimental conditions tested. Based on the NIST atomic spectral database [28], emission lines of the main elements identified in the tissue samples are C I (247.9), Mg II (280.3), Na I (588.9), Na (589.6), H α (656.3), K I (766.5) and K I (769.9).

Na I and K I were the major elements observed in all the samples. On the other hand, because samples were measured at room conditions, emission signals from air were also observed in the LIBS spectra. However, as it has been demonstrated, these signals do not significantly interfere with the relative spectral contribution of the trace elements present in the samples [29]. In addition, a continuum background emission signal was also observed as a typical component of LIBS spectrum.

Plasma temperature variation was checked using the two spectral lines of K I. Fig. 3 shows the time-dependent (PMI) emission intensity

ratio of the two spectral lines ($I_{K766.5}/I_{K769.9}$) for the three experimental conditions studied. Testing the hypothesis that the slope of the regression line is zero by calculating [30]:

$$t = \frac{|b-0|}{s_b} \quad (2)$$

where t is the calculated t-value, b is the slope and s_b its standard deviation, no significant variations of the plasma temperature were observed in all cases. Therefore, emission intensity variations of the elements in the tissue samples can only be attributed to elemental concentration changes due to chemical reactions that take place in the putrefaction process along the postmortem time, enabling PMI estimation. In addition a constant plasma temperature can minimize matrix effects, providing more accurate results.

PMI determination was based on the time-dependent peak intensity variation of the main elements observed in the LIBS spectrum. In this case, four elements showed a significant emission intensity signal in the tissue samples, i.e. Mg (280.3 nm), H (656.3 nm), Na (588.9 nm, 589.6 nm), and K (766.5 nm, 769.9 nm). No significant variation was observed for C (247.9 nm) emission line with PMI ($t < t_{0.05, N-2}$ data not shown). Thus, in order to correlate the emission intensity with element population in the samples, the signals of these main elements were normalized with respect to the line intensity of this element, denoted hereafter as $I_{C247.9}$.

Fig. 4–7 show the temporal changes of the emission intensity for the elements H α , Na, Mg and K with PMI, respectively. Four different types of metabolic changes after death were observed based on the signal variations of these elements: upward, downward, an upward–downward combination (or vice versa) and little or no variation. These results

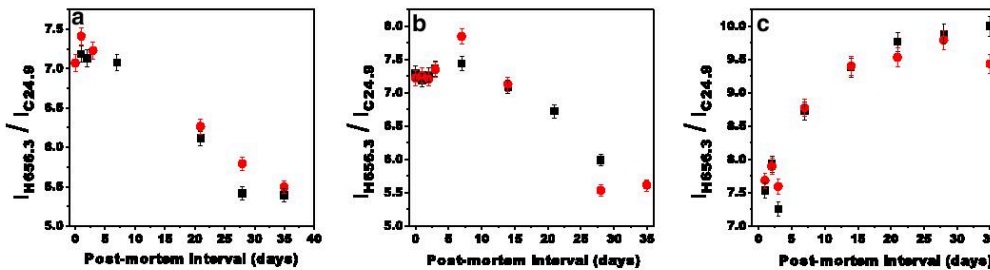


Fig. 4. PMI-dependent hydrogen (H α) emission intensity (656.3 nm) for swine tissue samples stored in (a) an open container, (b) an open container covered with a metal mesh and (c) a closed plastic container. (■) Swine 1. (●) Swine 2.

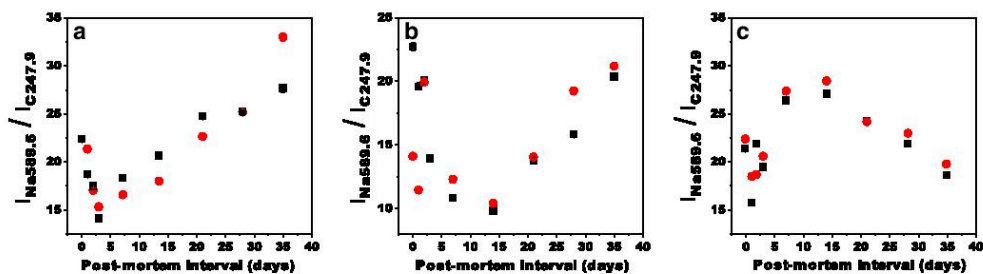


Fig. 5. PMI-dependent Na I emission intensity (589.6 nm) for swine tissue samples stored in (a) an open container, (b) an open container covered with a metal mesh and (c) a closed plastic container. (■) Swine 1. (●) Swine 2.

indicated that the sample decomposition process depended on storage conditions, even when samples were kept at the same temperature.

Fig. 4 shows the variation of the hydrogen emission intensity during the decomposition process of both swine samples in the three experimental conditions. The signal variation of this element showed a significant correlation with PMI from the fifth day. However, its trend was different depending on the experimental conditions the tissue samples were stored. Thus, emission intensity signal decreased linearly with the postmortem time when the samples were stored in an open container (Fig. 4a, b), whereas a non-linear and opposite trend was observed for samples stored in the closed container (Fig. 4c). This upward non-linear trend could be due to limited access

of air to the samples, dampening insect metabolic activity and slowing down sample decomposition. Many studies have shown H α as an important element to classify different organic compounds [31,32]. Thus, due to the organic composition of skeletal tissues, H α can be used as an indicator of chemical changes occurring within the tissues. Therefore, the linear behavior of the spectral line of H α makes it the more suitable element to determine PMI. An error of 7% (significance level = 0.05) was calculated in the estimation of PMI from H α spectral line when tissue samples were stored in the open air container.

Na I showed a significant emission intensity variation when the tissue samples were stored in the three experimental conditions studied,

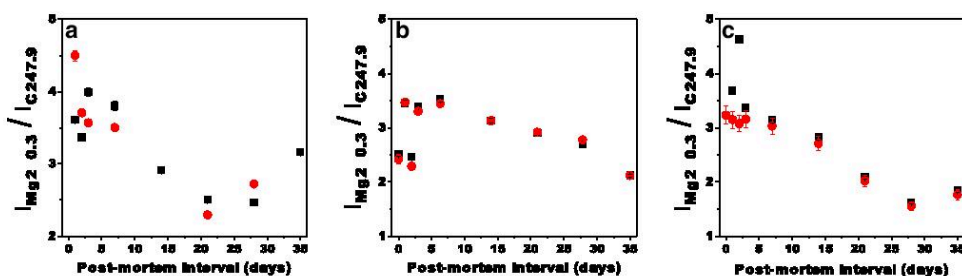


Fig. 6. PMI-dependent Mg II emission intensity (280.3 nm) for swine tissue samples stored in (a) an open container, (b) an open container covered with a metal mesh and (c) a closed plastic container. (■) Swine 1. (●) Swine 2.

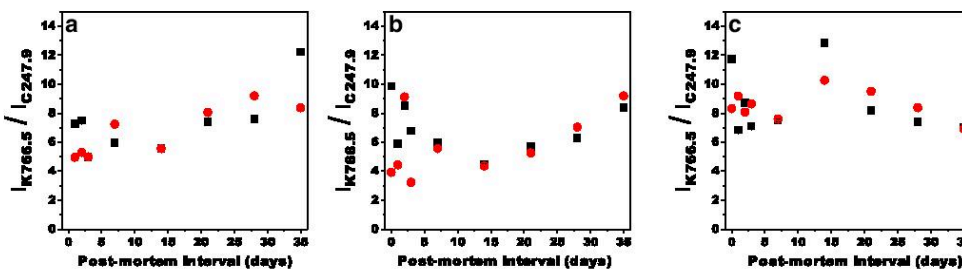


Fig. 7. PMI-dependent K I emission intensity (766.5 nm) for swine tissue samples stored in (a) an open container, (b) an open container covered with a metal mesh and (c) a closed plastic container. (■) Swine 1. (●) Swine 2.

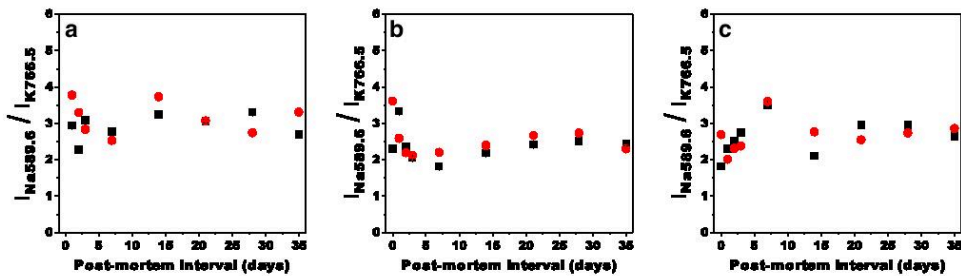


Fig. 8. PMI-dependent Na I/K I emission intensity ratio ($I_{589.6}/I_{766.5}$) for swine tissue samples stored in (a) an open container, (b) an open container covered with a metal mesh and (c) a closed plastic container. (■) Swine 1. (●) Swine 2.

$I_{Na(5 \text{ days})}/I_{Na(35 \text{ days})} \approx 2$ (Fig. 5). A downward-upward combination was observed for tissue samples stored in an open container, whereas an opposite trend was observed for tissue samples stored in a closed plastic container. The difference in the emission intensity variation of this element with the storage conditions could be due to the absence or presence of external factors that may affect the chemical decomposition process such as lipid degradation. Regarding Mg II no significant variation in the emission intensity with PMI was observed, $I_{Mg(5 \text{ days})}/I_{Mg(35 \text{ days})} \approx 1.2$ (Fig. 6); whereas K I showed a similar emission intensity variation as Na I, $I_{K(5 \text{ days})}/I_{K(35 \text{ days})} \approx 2$ (Fig. 7).

The evaluation of postmortem plasma electrolyte concentrations in wistar rat serum [11] and human blood [12], suggested a double logarithmic relationship between the plasma sodium/potassium concentration ratio and PMI. However, in this work no significant variations were observed in the emission intensities of these two elements in swine tissue samples (Fig. 8).

While these preliminary results demonstrate the potential use of the LIBS technique as a new instrumental method for estimating PMI, further studies must be conducted to determine the accuracy and precision of the method. Detailed studies are needed involving longer time ranges to evaluate the prediction capacity of the proposed method by validating the observed results with known PMI values. An encouraging result was that both swine samples showed the same behavior for each storage condition, suggesting that the emission intensity variation for each element only depended on the process of decomposition and not on the swine sample. However, a more detailed study is required to achieve a practical application of this method in forensic science.

4. Conclusions

Postmortem interval (PMI) estimation by the LIBS technique, evaluating the time-dependent variations of the emission intensities of the major elements in swine tissue samples has been reported for the first time. LIBS spectroscopic analysis provided the possibility to monitor the postmortem metabolic changes at elemental level. Na I and H α emission intensity variation showed a significant correlation with PMI. Sample storage conditions showed a significant effect on the emission signal performance of each element. Thus, H α showed a downward linear correlation after first five days since the time of death when samples were stored in an open air container; whereas, Na I and K I exhibited a non-linear behavior in both storage conditions. On the other hand, Mg II did not show significant variation with PMI. Therefore, H α is the more suitable spectral line for determination of PMI. The method enabled to estimate the PMI with an uncertainty of 7% (significance level = 0.05) when tissue samples were stored in an open air container, i.e., a typical situation in crime scene and forensic investigations.

The presented work is a preliminary study to evaluate the ability of LIBS in PMI estimation based on the time-dependent variations at the elemental level. A more detailed research is currently in progress including more comprehensive studies. Nevertheless, the proposed LIBS-based method provides a fast and economical way for PMI estimation with a minimal or no sample preparation, and, therefore, a feasible supplementary technique to the conventional methods in forensic science.

Acknowledgments

This work was supported by the Complutense University of Madrid (grant CCG10-UCM/PPQ-4713).

References

- [1] P. Huang, Y. Ke, Q. Lu, B. Xin, S. Fan, G. Yang, Z. Wang, Analysis of postmortem metabolic changes in rat kidney cortex using Fourier transform infrared spectroscopy, *Spectroscopy* 22 (2008) 21–31.
- [2] B.B. Dent, S.L. Forbes, B.H. Stuart, Review of human decomposition processes in soil, *Environ. Geol.* 45 (2004) 576–585.
- [3] C. Zhou, R.W. Byard, Factors and processes causing accelerated decomposition in human cadavers – an overview, *J. Forensic Leg. Med.* 18 (2011) 6–9.
- [4] M. Kaliszán, R. Häuser, G. Kermbach-Wighton, Estimation of the time of death based on the assessment of post mortem processes with emphasis on body cooling, *Leg. Med.* 11 (2009) 111–117.
- [5] J.H. Byrd, J.H. Byrd, M.R. Peace, *Entomotoxicology: drugs, toxins, and insects*, Forensic Chemistry Handbook, 1st ed., John Wiley & Sons, New York – USA, 2012.
- [6] S.J.M.D. Cna, Flow cytometric evaluation of DNA degradation: a predictor postmortem interval? *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 15 (1994) 300–302.
- [7] M. Bauer, S. Polzin, D. Patzelt, Quantification of RNA degradation by semi-quantitative duplex and competitive RT-PCR: a possible indicator of the age of bloodstains? *Forensic Sci. Int.* 138 (2003) 94–103.
- [8] M. Bauer, I. Gramlich, S. Polzin, D. Patzelt, Quantification of mRNA degradation as possible indicator of postmortem interval—a pilot study, *Leg. Med.* 5 (2003) 220–227.
- [9] A.J. Sabucedo, K.G. Furton, Estimation of postmortem interval using the protein marker cardiac Troponin I, *Forensic Sci. Int.* 134 (2003) 11–16.
- [10] S. Kang, N. Kassam, M.L. Gauthier, D.H. O'Day, Post-mortem changes in calmodulin binding proteins in muscle and lung, *Forensic Sci. Int.* 131 (2003) 140–147.
- [11] D. Querido, Double logarithmic, linear relationship between plasma sodium/potassium concentration ratio and postmortem interval during the 6–96-h postmortem period in rats, *Forensic Sci. Int.* 44 (1990) 125–134.
- [12] D. Singh, R. Prashad, C. Parkash, Y.S. Bansal, S.K. Sharma, A.N. Pandey, Linearization of the relationship between serum sodium, potassium concentration, their ratio and time since death in Chandigarh zone of north-west India, *Forensic Sci. Int.* 130 (2002) 1–7.
- [13] J.G. Farmer, F. Benomran, A.A. Watson, W.A. Harland, Magnesium, potassium, sodium and calcium in post-mortem vitreous humour from humans, *Forensic Sci. Int.* 27 (1985) 1–13.
- [14] D.W. Hahn, 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.* 64 (2010) 335A–366A.
- [15] D.W. Hahn, N. Omenetto, Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS), part II: review of instrumental and methodological approaches to material analysis and applications to different fields, *Appl. Spectrosc.* 66 (2012) 347–419.
- [16] D.A. Cremers, L.J. Radziemski, *Handbook of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Chichester – UK, 2006.

- [17] A.W. Miziolek, V. Palleschi, I. Schechter, *Laser Induced Breakdown Spectroscopy*, 1st ed., Cambridge University Press, New York – USA, 2008.
- [18] D. Marcos-Martínez, J.A. Ayala, R.C. Izquierdo-Hornillos, F.J.M. de Villena, J.O. Cáceres, Identification and discrimination of bacterial strains by laser induced breakdown spectroscopy and neural networks, *Talanta* 84 (2011) 730–737.
- [19] A. Vogel, V. Venugopalan, Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues, *Chem. Rev.* 103 (2003) 577–644.
- [20] G. Müller, K. Dörschel, H. Kar, Biophysics of the photoablation process, *Laser Med. Sci.* 6 (1991) 241–254.
- [21] A.A. Oraevsky, R.O. Esenaliev, V.S. Letokhov, Pulsed laser ablation of biological tissue: review of the mechanisms, in: J.C. Miller, R.F.H. Jr (Eds.), *Laser Ablation Mechanisms and Applications*, Springer, New York, 1991, pp. 112–122.
- [22] Optical-Thermal Response of Laser-Irradiated Tissue, in: A.J. Welch, M.J.C. van Gemert (Eds.), 2nd ed., Springer, Austin, USA, 2011.
- [23] A. Vogel, Nonlinear absorption: intraocular microsurgery and laser lithotripsy, *Phys. Med. Biol.* 42 (1997) 895–912.
- [24] F.G. Pérez-Gutiérrez, S. Camacho-López, G. Aguilar, Experimental study of mechanical response of artificial tissue models irradiated with Nd:YAG nanosecond laser pulses, *Proc. SPIE* 8092, *Medical Laser Applications and Laser-Tissue Interactions V* (2011) 809207.
- [25] E. Tognoni, M. Hidalgo, A. Canals, G. Cristoforetti, S. Legnaioli, A. Salvetti, V. Palleschi, Combination of the ionic-to-atomic line intensity ratios from two test elements for the diagnostic of plasma temperature and electron number density in Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy, *Spectrochim. Acta Part B* 62 (2007) 435–443.
- [26] M.A. Ismail, H. Inam, A. Elhassan, W.T. Younis, M.A. Harith, LIBS limit of detection and plasma parameters of some elements in two different metallic matrices, *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 489–494.
- [27] J. Zhang, C. Ma, H. Zhu, J. Xi, Z. Ji, Accurate quantitative analysis of metal oxides by laser-induced breakdown spectroscopy with a fixed plasma temperature calibration method, *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 1903–1908.
- [28] NIST, *Atomic Spectroscopy Information*, [cited 2012 November 26] <http://www.nist.gov/atomicspectroscopy.cfm>.
- [29] R.J. Nordstrom, Study of laser-induced plasma emission spectra of N₂, O₂, and ambient air in the region 350 nm to 950 nm, *Appl. Spectrosc.* 49 (1995) 1490–1499.
- [30] Massart, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Volume Part A*, 1st ed., Elsevier Science Amsterdam, The Netherlands, 1997.
- [31] J. Anzano, R.-J. Lasheras, B. Bonilla, J. Casas, Classification of polymers by determining of C1:C2:CNH:N:O ratios by laser-induced plasma spectroscopy (LIPS), *Polym. Test.* 27 (2008) 705–710.
- [32] P. Lucena, A. Doña, L.M. Tobaría, J.J. Laserna, New challenges and insights in the detection and spectral identification of organic explosives by laser induced breakdown spectroscopy, *Spectrochim. Acta Part B* 66 (2011) 12–20.

Plume Dynamics of Laser-Produced Swine Muscle Tissue Plasma

Joaquin J. Camacho¹, Luis Diaz², Alicia Marin-Roldan³, Samuel Moncayo³, and Jorge O. Caceres³

Abstract

We report on the plume dynamics of the plasma induced by laser ablation of a swine skeletal muscle tissue sample in different vacuum conditions. Pulses from a transversely excited atmospheric CO₂ laser were focused onto a target sample and the induced plasma was allowed to expand in different air pressures. The expansion features were studied using fast photography of the overall visible emission by using a gated intensified charged coupled device. Free expansion and plume splitting were observed at different pressure levels. The expansion of the plasma plume front was analyzed using various expansion models and the velocity of the plume front was estimated. The effect of the number of accumulated laser shots on the crater volume at different ambient air pressures and an elemental analysis of the sample were performed using scanning electron microscopy coupled with energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) analysis. The surface morphology of the irradiated surface showed that increasing the pressure of the ambient gas decreased the ablated mass, or in other words it reduced significantly the laser-target coupling.

Keywords

Energy dispersive X-ray spectroscopy, EDX, laser-produced plasma, LPP, plasma imaging, scanning electron microscopy, SEM, shock wave

Date received: 14 May 2015; accepted: 15 October 2015

Introduction

Laser-produced plasmas (LPPs) are currently a topic of considerable interest in fundamental and applied areas of scientific research. Laser-produced plasmas are transient in nature with characteristic parameters evolving fast in space and time. There are different diagnostic techniques to characterize LPPs such as optical emission spectroscopy, shadowgraphy and fast photography, laser-induced fluorescence, Langmuir probing, photo-thermal beam deflection, mass spectrometry, etc. These studies are essential for understanding various processes in fundamental plasma physics. There are many applications for LPPs in a wide variety of fields of basic research and material technology such as fabrication of thin films by pulsed laser deposition,¹ production of nanoparticles and clusters,² surface modifications,³ spectrochemical analysis of various materials through laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS),^{4–8} ion source,⁹ lithography,¹⁰ microscopy,¹¹ in the fabrication of micro-electronic devices,¹² etc. Beyond traditional applications of LIBS, where inorganic materials are mainly studied, recent progresses in LIBS lead to analysis of biological warfare agent materials,^{13,14} animal tissue studies,^{15,16}

biological aerosols,¹⁷ and identification of bacteria.¹⁸ On the other hand, the CO₂ laser has been extensively used over the past 30 years in various fields of medicine¹⁹ and is still one of the most useful and efficient medical lasers available in the market. This laser is mainly employed as a surgical or cosmetic tool and can cut or vaporize tissue with fairly little bleeding and minimal damage to surrounding tissue. It is used to remove thin layers from the surface of the skin without going into the deeper layers.

The interaction of a plume with an ambient gas leads to an expansion involving several complex processes such as thermalization, attenuation, deceleration, plasma shielding

¹Department of Applied Physical Chemistry, Faculty of Sciences, Autonomous University of Madrid, Madrid, Spain

²Institute of the Structure of Matter, CFMAC, CSIC, Madrid, Spain

³Department of Analytic Chemistry, Faculty of Chemical Sciences, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

Corresponding author:

Joaquin J. Camacho, Department of Applied Physical Chemistry, Faculty of Sciences, Autonomous University of Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain.
 Email: jj.camacho@uam.es

