

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**DETERMINACION DE PLOMO, MANGANESO Y
COBALTO EN SANGRE POR ESPECTROFOTO-
METRIA DE ABSORCION ATOMICA DE HORNO
DE GRAFITO.**

T E S I S

Luis Camilo Ríos Castañeda

CARRERA: QUIMICO

1 9 8 3



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O

I	INTRODUCCION	1
II	GENERALIDADES	3
II.1	La espectrofotometría de absorción atómica	6
II.1.1	Principios de la absorción atómica	6
II.1.2	Instrumentación	8
II.1.3	Interferencias	15
II.1.4	Ventajas de la espectrofotometría de absorción atómica de horno de grafito	16
II.1.5	Desventajas	17
III	PARTE EXPERIMENTAL	
III.1	Antecedentes de los métodos	18
III.2	Condiciones estándar	19
III.3	Material y reactivos	23
III.4	Método de análisis de las muestras	23
III.5	Características de la muestra	24
IV	RESULTADOS	28
V	TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS	31
VI	CONCLUSIONES	40
	BIBLIOGRAFIA	42

INTRODUCCION

El interés actual por el efecto de trazas de varios elementos sobre el metabolismo de plantas, animales y seres humanos, unido a la extendida preocupación por la posible acumulación de sustancias tóxicas en el ambiente, ha creado la necesidad de determinar concentraciones cada vez mas bajas de metales en una gran variedad de materiales biológicos.

Para los propósitos mencionados, la espectrofotometría de absorción atómica ha demostrado ser una técnica de análisis de extraordinaria utilidad.

Gracias al reciente desarrollo de los métodos de atomización con horno de grafito, las perspectivas de uso de la absorción atómica se han ampliado tanto por la gran sensibilidad del método como por sus excelentes características de precisión y exactitud.

El objetivo de este trabajo es el de establecer un método de análisis para la determinación de los elementos plomo, manganeso y cobalto en sangre, usando un instrumento de absorción atómica de horno de grafito que nos permita estudiar la posible relación entre dichos metales en el organismo.

En el capítulo de generalidades se revisarán algunos conceptos fundamentales acerca de los metales en cuestión, y se hará una breve exposición de los principios de la espectrofotometría de absorción atómica.

En la parte experimental, se detallarán las características relevantes de la muestra así como los métodos empleados para su análisis.

El capítulo de tratamiento estadístico de los resultados es de especial interés porque en él se discuten los resultados del análisis de los tres metales en 30 muestras de sangre de personas ocupacionalmente expuestas a plomo. Las importantes conclusiones que se infieren a partir de estas mediciones demuestran la utilidad práctica del método en la investigación del metabolismo de los elementos traza en el organismo.

II

GENERALIDADES

Los elementos plomo, manganeso y cobalto están distribuidos en los tejidos vivos en cantidades muy pequeñas. Por esta razón se encuentran clasificados, junto con algunos otros, como elementos traza (1) . El orden de magnitud de su concentración en sangre, por ejemplo, es de algunos nanogramos por mililitro y su distribución en otros tejidos es similar (2) .

A pesar de sus bajas concentraciones, los elementos señalados juegan un importante papel en el metabolismo de los seres vivos.

El manganeso y el cobalto se consideran elementos traza esenciales, es decir, su deficiencia provoca un detrimento en el funcionamiento normal del organismo. El primero se encuentra involucrado en la fosforilación oxidativa de los ácidos grasos y el metabolismo de la síntesis de mucopolisacáridos principalmente, teniendo como sitio de acción más importante la piruvato carboxilasa, enzima que cataliza la transformación de piruvato a oxalacetato.

El manganeso puede provocar efectos tóxicos cuando se encuentra en cantidades excesivas en el organismo. En mineros con exposición ocupacional a manganeso, se presenta un envenenamiento crónico caracterizado por un severo desorden psiquiátrico (Locura mangánica) seguido por un desorden neurológico

gico permanente similar a la enfermedad de Parkinson (3) .

El cobalto resulta esencial para los procesos de metilación biológica (4), ya que su presencia es necesaria para la síntesis de la vitamina B₁₂ por la flora intestinal. La deficiencia de cobalto provoca anemia perniciosa.

El plomo, por su parte, provoca efectos de envenenamiento acumulativo en el hombre y los animales, por lo que se le agrupa como elemento tóxico junto con el cadmio, el arsénico y el mercurio.

Los efectos tóxicos del plomo en individuos con envenenamiento crónico son muy bien conocidos, particularmente aquellos que se caracterizan por dañar al sistema nervioso central.

En niños, este envenenamiento produce daño cerebral físico, con secuelas permanentes, incluyendo problemas de conducta, retraso intelectual e hiperactividad (6,7) .

La anemia es un padecimiento común en el envenenamiento crónico de plomo. La síntesis del grupo Hemo es afectada primariamente por la inhibición de la deshidratasa del ácido delta-aminolevulínico y la ferroquelatasa, la enzima que controla la incorporación del hierro a la molécula de Hemo.

Recientemente se han venido estudiando las posibles interacciones entre los elementos tóxicos y los elementos esenciales. Tales interacciones son importantes porque ilustran el modo de acción mediante el cual pueden los elementos tóxicos -

modificar los procesos metabólicos que dependen de los elementos esenciales.

La complejidad de las posibles interacciones puede ser visualizada en la figura No. 1 .

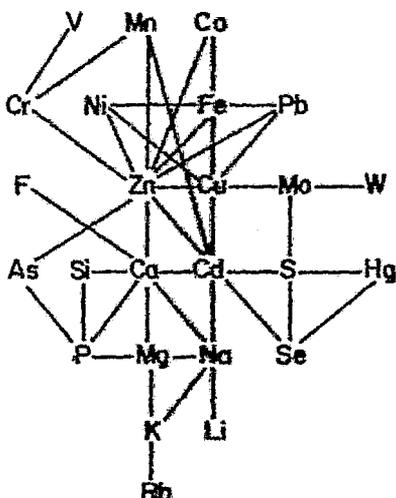


Figura No. 1

Algunas de las interacciones involucran la competencia por ligantes, otras son no competitivas. En el caso del plomo, su posible interacción con el manganeso y el cobalto sólo se establece de manera indirecta a través del hierro y el zinc, según la figura 1. Ninguna interacción directa, competitiva o no, ha sido demostrada.

La extensión de las interacciones entre plomo, cobalto y manganeso no se ha cuantificado, por lo que resulta de interés desarrollar una técnica de análisis químico que permita la determinación de los tres elementos a los niveles en que se encuentran en los tejidos animales .

II.1 LA ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA

La espectrofotometría de absorción atómica como la conocemos actualmente tuvo su origen en 1955, cuando Alkema y Milatz por un lado y Walsh por otro publicaron artículos describiendo el método. Sin embargo es hasta 1962 cuando los instrumentos de absorción atómica empezaron a comercializarse en todo el mundo. La importancia de la técnica queda de manifiesto si consideramos que de 1955 a 1977 se han publicado mas de 5500 publicaciones periodicas (9) sobre espectrofotometría de absorción atómica.

II.1.1 Principios de la absorción atómica.

Existen tres formas distintas de interacción entre la luz y los átomos (10) :

A. Si los átomos son excitados térmicamente, entonces la energía absorbida se desprende como un espectro de emisión.

B. Si la excitación es producida por energía luminosa, los átomos sólo absorben cantidades definidas de energía, es decir, luz de frecuencia definida, y entonces puede observarse un espectro de absorción atómica.

C. La energía absorbida en el proceso B puede ser emitida para formar un espectro de fluorescencia.

El espectro de absorción atómica de un átomo consiste de una secuencia de líneas arregladas en un orden perfectamente definido. Cada línea espectral representa la transición entre dos estados atómicos de diferente energía. El estado de más baja energía es llamado estado fundamental.

La excitación térmica o eléctrica de un átomo provoca que se realicen transiciones del estado fundamental a otros estados, de acuerdo a la ley de Boltzmann (10) :

$$\frac{N_j}{N_0} = \frac{P_j}{P_0} \cdot e^{-E_j/kT}$$

En la cual P_j y P_0 son los pesos de los estados excitado y fundamental respectivamente, E_j la energía de excitación, k la constante de Boltzmann y T la temperatura absoluta.

N_j dividido entre N_0 representa la relación del número de átomos en el estado excitado (j) contra el número de átomos en el estado fundamental (0).

Al realizar los cálculos del cociente N_j/N_0 a diversas temperaturas para muchos elementos se encontró que N_j es muy pequeño comparado con N_0 , esto significa que a temperaturas menores de 3000°K casi todos los átomos se encuentran en el estado fundamental. Para el proceso de la absorción atómica, se puede suponer que el número de átomos en el estado funda -

mental es idéntico al número total de átomos. De lo anterior se desprende que el proceso de absorción atómica es más eficiente que el de emisión en el intervalo de temperaturas menores que 3000°K .

i) Anchura de la línea.

Un átomo absorbe luz en un intervalo finito de frecuencias dentro del cual cae la frecuencia de absorción f_{ij} . Walsh demostró que la anchura natural de este intervalo es del orden de 10^{-5} nm, sin embargo, varios procesos provocan su ensanchamiento. El efecto Doppler es uno de ellos y depende directamente de la temperatura. El efecto Lorenz es otro y está relacionado con las colisiones que se producen entre los átomos.

Como los intervalos de absorción de luz son muy estrechos, es necesario que la fuente produzca también un haz intenso y muy estrecho de la misma longitud que la de la absorción, si se desea que ésta sea selectiva. Por tal razón Walsh recomendó que la fuente de luz usada en absorción atómica debiera emitir el espectro del elemento a determinar.

II.1.2 Instrumentación.

En la espectrofotometría de absorción atómica la muestra por analizar se transforma en un vapor atómico en el que la mayor parte de los átomos están en su estado fundamental, tal como el principio de la absorción atómica lo requiere.

Un espectrofotómetro de absorción atómica se compone, en general, de los elementos siguientes (11) :

- A. Una fuente de luz monocromática de líneas estrechas - del elemento a determinar.
- B. Un medio para conseguir el vapor atómico de la muestra.
- C. Un selector de longitud de onda.
- D. Un detector seguido por un amplificador y un sistema - medidor o registrador.

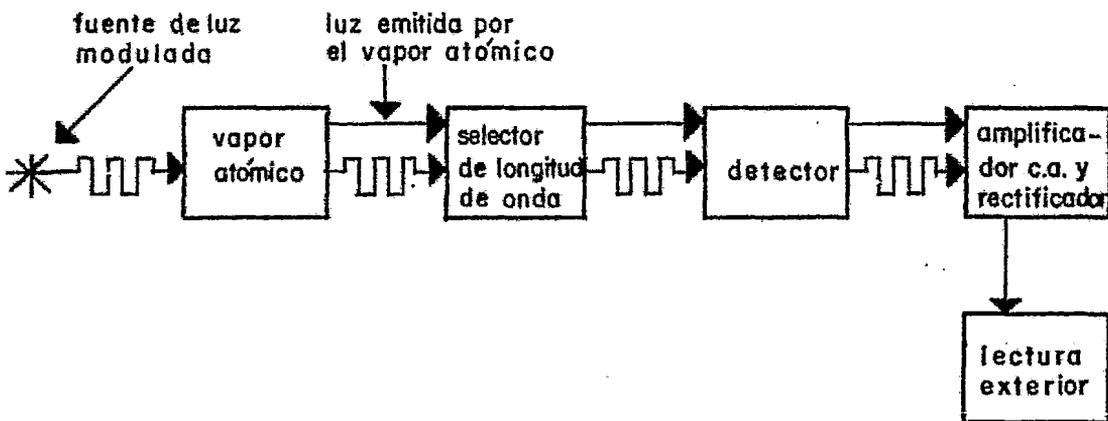


Figura No.2

La posible interferencia de cualquier radiación emitida por la nube atómica con la misma longitud de onda que la de la fuente, se elimina modulando la salida de ésta, e introduciendo la señal del detector en un amplificador sincronizado a la misma frecuencia, tal como se ilustra en la figura No. 2.

i) Fuentes de luz.

A. Lámparas de cátodo hueco.

Estas lámparas consisten de un cilindro de vidrio lleno con un gas inerte (neón o argón) bajo una presión pequeña, dentro del cual se encuentra un ánodo y un cátodo. Este último tiene la forma de un cilindro hueco y está hecho o bien relleno del metal bajo estudio. El ánodo es un alambre de níquel o de tungsteno.

Cuando se aplica un voltaje de 100 a 400 V entre los electrodos se produce una descarga y los átomos metálicos son desplazados de la superficie del cátodo y excitados, produciendo el espectro de emisión del material del cátodo.

B. Lámparas de descarga sin electrodos.

Consisten de una esfera de cuarzo dentro de la cual el elemento a determinar se coloca en una atmósfera de gas inerte.

La excitación de los átomos en estas lámparas es producida por un campo de alta frecuencia.

La ventaja de éstas lámparas sobre las de cátodo hueco consiste en la mayor intensidad de radiaciones que producen.

ii) Atomización.

A. En flamas.

Para producir el vapor atómico de una muestra en una flama, usualmente se aspira dentro de ella en forma de una disolución por medio de un nebulizador neumático.

La técnica para la atomización con flama se describe ampliamente en varios libros y artículos (9,10,11). Para éste trabajo resulta de mayor importancia revisar la atomización sin flamas.

B. En horno de grafito.

La atomización sin flama se logra introduciendo la muestra en un horno de grafito resistente a la temperatura alta y protegido de la oxidación por una atmósfera de gas inerte. Debido a que el carbón sublima hasta los 3800°K , las temperaturas en el horno pueden ser mayores que las de la flama.

La figura No. 3 muestra la sección transversal de un horno comercial.

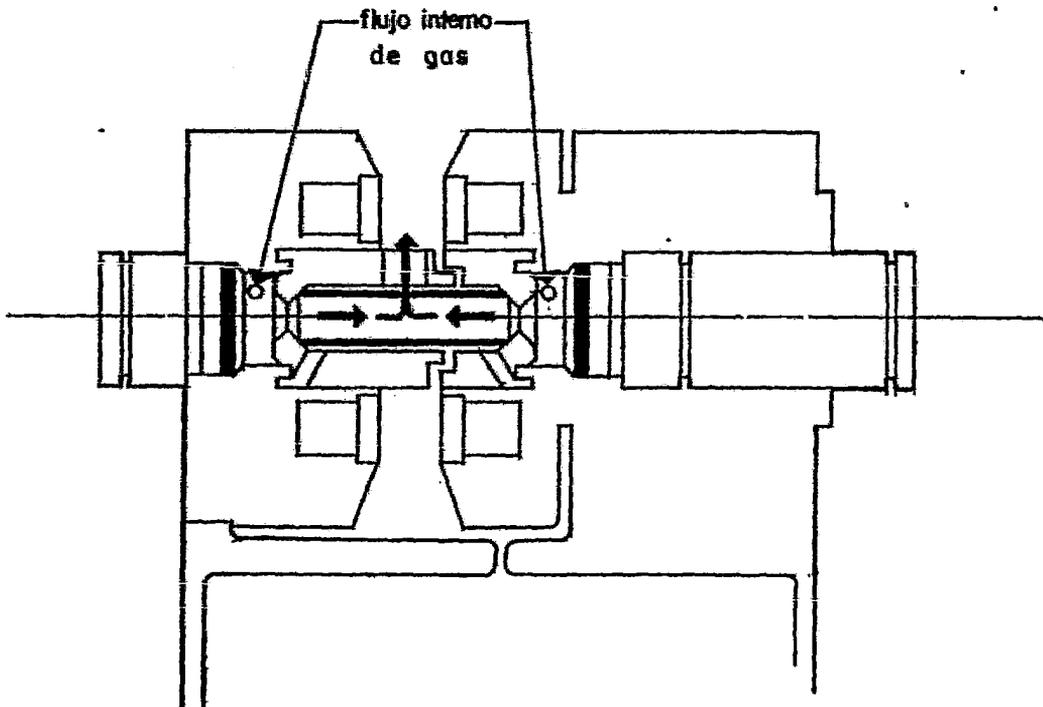


Figura No. 3

El gas inerte usualmente utilizado en los hornos de grafito comerciales es el nitrógeno debido a su bajo costo.

El flujo de gas inerte que se establece dentro del horno de grafito puede, en algunos aparatos, ser interrumpido automáticamente durante la etapa de atomización. La sensibilidad para algunos elementos se incrementa mediante este procedimiento, por lo que en ciertos casos es recomendable.

iii) Programación de temperaturas del horno.

Otra ventaja adicional de las técnicas de atomización con horno de grafito es la posibilidad de contar con un programa de control de temperaturas. Las fases de éste programa son tres en general y se esquematizan en la figura No. 4.

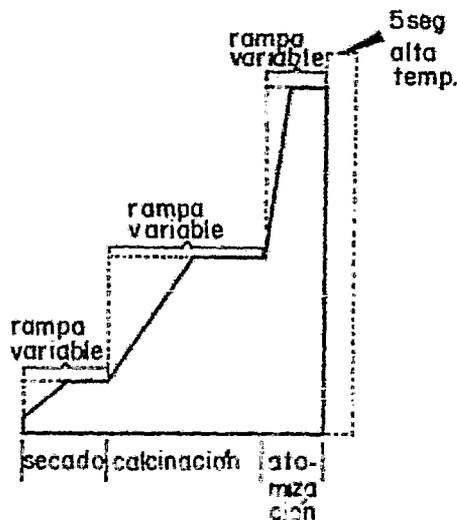


Figura No.4

En la primera etapa del programa, se pretende eliminar el agua de la muestra por ebullición. En la segunda, se elimina la matriz de la muestra, por ejemplo, materia orgánica si se trata de un material biológico. La tercera fase es la de producción del vapor atómico.

La eliminación completa del material volátil resulta difícil en algunas ocasiones, a menos que el tiempo y la temperatura de calcinación aumenten hasta el punto en que el metal a determinar pueda perderse parcialmente por vaporización al mismo tiempo. En estos casos es necesario usar una fuente continua de luz, como la lámpara de arco de deuterio, para corregir la absorción debida al material matricial residual volatilizado durante la etapa de atomización. Esta corrección de la señal no atómica consiste en hacer pasar un rayo de luz continua de la lámpara de arco de deuterio junto con la luz de la lámpara del elemento a través del vapor atómico de la muestra. Al llegar ambos al detector, la señal de la lámpara de corrección es restada electrónicamente de la señal de la lámpara del elemento, la cual contiene la suma de la absorción atómica y no atómica, quedando eliminada así la señal de fondo.

iv) Arreglos ópticos y sistema de detección.

Existen en general dos sistemas ópticos que utilizan los instrumentos de absorción atómica: El sistema de un sólo haz y el sistema de doble haz.

En el primero, la luz proveniente de la lámpara del elemento se hace pasar, ya modulada, directamente a través de la nube atómica producida por el horno, llegando hasta el detector después de pasar por un monocromador (ver figura No. 2).

En el sistema de doble haz, la luz proveniente de la fuente se divide en dos, la primera mitad pasa a través del horno y la otra se desvía. Ambas llegan al detector, el cual registra la relación de una a la otra.

La función del monocromador es la de aislar una sola línea del espectro del elemento. La monocromación se puede lograr de varias formas, ya sea usando filtros, prismas, o bien rejillas de reflexión.

Para la detección de la luz que ha pasado por el sistema óptico, los aparatos modernos de absorción atómica utilizan tubos fotomultiplicadores, los cuales contienen su propio sistema amplificador de la señal.

v) Dispositivos de lectura.

La absorción de luz por el vapor atómico, usualmente sigue la ley de Beer, por lo que la lectura observa un comportamiento lineal. Las mediciones de absorción pueden ser hechas mediante un microamperímetro, un graficador potenciométrico o una lectora digital.

II.1.3 Interferencias .

Debido a que las determinaciones en espectrofotometría de absorción atómica sólo pueden ser llevadas a cabo por comparación contra una sustancia de referencia, cualquier característica de la muestra que difiera de las de dicha sustancia produce una interferencia. Dependiendo de su origen, las interferencias pueden ser: químicas, físicas, por señal de fondo, o espectrales.

i) Interferencias químicas.

Son aquéllas producidas por la formación de algún compuesto químico que evita la atomización cuantitativa del elemento.

Muchas de las interferencias típicas en la espectrofotometría de absorción atómica de flama, no se producen en los métodos sin flama gracias al medio inerte del grafito y a la atmósfera reductora usados.

A causa de que la atomización en el horno de grafito se lleva a cabo en la superficie del mismo, la muestra debe permanecer en buen contacto tanto como sea posible para favorecer la atomización. Esto significa que la conversión de la muestra a formas de difícil fusión o evaporación ayuda a aumentar el proceso de atomización. En contraste con los métodos de flama, la formación de sulfatos, fosfatos y óxidos es ventajosa.

ii) Interferencias físicas.

Son aquéllas relacionadas con las diferencias en propiedades físicas como viscosidad, tensión superficial o gravedad específica entre la muestra y la sustancia de referencia.

Este tipo de interferencias no puede ocurrir en los instrumentos de horno de grafito porque se originan en el proceso de nebulización propio de los métodos de flama.

iii) Interferencias por señal de fondo.

Existen dos causas fundamentales para este tipo de interferencias : Dispersión de luz debida a sólidos o partículas en la nube atómica y absorción real de luz por moléculas o radicales provenientes de la matriz. En la atomización con horno de grafito las interferencias más importantes son las debidas a la segunda causa. Sin embargo, los correctores de fondo de lámpara de arco de deuterio acoplados al sistema óptico eliminan la absorción no atómica eliminando el problema.

iv) Interferencias espectrales.

La interferencia espectral en espectrofotometría de absorción atómica es prácticamente imposible como resultado del sistema de luz alternante producido por el modulador y el amplificador que está sintonizado a la frecuencia de modulación.

II.1.4 Ventajas de la espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito.

A) Las determinaciones en espectrofotometría de absorción atómica sin flama tienen una sensibilidad extraordinaria, de mil veces más que los métodos con flama en promedio. Esto representa una gran ventaja pues permite realizar análisis de elementos presentes en muy pequeñas cantidades.

B) Las determinaciones están prácticamente libres de interferencias .

C) En algunos casos, es posible ^{es} determinar la muestra sin tratamiento previo, evitando la posible contaminación. También se reduce el riesgo por pérdida en la manipulación .

D) El equipo es más barato que cualquier otro para el análisis de trazas. A la postre también su operación es más económica.

E) Se requieren pequeños volúmenes de muestra (de 10 a 100 microlitros) para las determinaciones.

F) La precisión es aceptable para análisis de rutina y excelente para análisis más cuidadosos .

II.1.5 Desventajas.

El análisis de tipo cualitativo no puede ser hecho fácilmente en espectrofotometría de absorción atómica debido a las características de operación.

Otra limitación del método es en cuanto a la realización de análisis multielemental, es decir, el análisis cuantitativo simultáneo de muchos elementos en la misma muestra como los que se logran usando técnicas de activación por neutrones o de fluorescencia de rayos X .

III

PARTE EXPERIMENTAL

III.1 ANTECEDENTES DE LOS METODOS.

Se han desarrollado una gran cantidad de métodos para la determinación de plomo en sangre usando la absorción atómica de horno de grafito. Las condiciones de operación de los instrumentos en todos ellos son similares, no así el tratamiento de la muestra previo al análisis.

Algunos autores recomiendan una precipitación de las proteínas (12), otros un tratamiento in situ con ácido nítrico (13), etc. , sin embargo, el método de dilución con Tritón X-100 propuesto por Fernández (14,15) es el más aceptado ampliamente (16,17,18) por su extraordinaria sencillez y gran precisión.

Similarmente, se han establecido varios métodos para la determinación de manganeso (19,20,21). Entre ellos, también se informa de métodos que involucran un tratamiento con Tritón X-100 previo al análisis (22,23) .

La posibilidad de encontrar un método de tratamiento de la muestra único para los tres metales resultó atractiva por razones de economía de material, reactivos y tiempo de análisis.

Adicionalmente, era deseable que la magnitud de los errores experimentales fuera similar en los tres casos, y todo esto se lograba con el tratamiento único de la muestra. Por estas razones, se decidió utilizar el método de dilución con Tritón X-100 de la muestra para las determinaciones.

III.2 CONDICIONES ESTANDAR.

Antes de realizar las determinaciones de cualquier elemento por espectrofotometría de absorción atómica es necesario establecer los parámetros óptimos de operación del instrumento. Para lograrlo, se deben tomar en cuenta tanto las características del elemento de interés como el tipo de matriz que lo contiene (24) .

Los parámetros instrumentales más importantes del espectrofotómetro son: a) tipo de lámpara y corriente aplicada, b) longitud de onda y abertura ("slit") seleccionados, c) corrección de fondo.

Los parámetros instrumentales para la operación del horno de grafito son aquéllos relacionados con el programa de temperaturas: a) temperatura y tiempo de secado, b) temperatura y tiempo de calcinación, c) temperatura y tiempo de atomización.

También es necesario seleccionar el tipo de gas inerte así como su flujo.

En este trabajo, los parámetros de operación óptimos para la determinación de plomo, manganeso y cobalto fueron encontrados mediante ensayos directos con estándares y muestras en el aparato, tomando como base los informados por otros autores (17,23) .

A continuación se enlistan tales parámetros, que se mantuvieron como condiciones estándar durante las determinaciones (tablas 1, 2 y 3) .

TABLA 1. Condiciones estándar para plomo.

APARATO: Espectrofotómetro Perkin-Elmer 360 con horno de -
grafito HGA-2200.

Parámetros del espectrofotómetro

LAMPARA: EDL (+) de plomo
LONGITUD DE ONDA: 283.3 nm
ABERTURA: 0.7 nm
CORRECCION DE FONDO: Lámpara de arco de deuterio.

Parámetros del horno de grafito

SECADO: temperatura = 98^oC
tiempo = 30 seg
CALCINACION: temperatura = 525^oC
tiempo = 50 seg
ATOMIZACION: temperatura = 2300^oC
tiempo = 9 seg
GAS INERTE: nitrógeno
FLUJO: normal (no interrumpido)

(+)Nota : EDL significa Lámpara de descarga sin electrodos.

TABLA 2. Condiciones estándar para manganeso.

APARATO: Espectrofotómetro Perkin-Elmer 360 con horno de grafito HGA-2200.

Parámetros del espectrofotómetro

LAMPARA: HCL (++) de manganeso

CORRIENTE: 20 mA

LONGITUD DE ONDA: 280 nm

ABERTURA: 0.7 nm

CORRECCION DE FONDO: Lámpara de arco de deuterio.

Parámetros del horno de grafito

SECADO: temperatura = 98°C

tiempo = 50 seg

CALCINACION: temperatura = 1100°C

tiempo = 30 seg

ATOMIZACION: temperatura = 2400°C

tiempo = 8 seg

GAS INERTE: nitrógeno

FLUJO: normal (no interrumpido).

(++)Nota: HCL significa Lámpara de cátodo hueco.

TABLA 3. Condiciones estándar para cobalto.

APARATO: Espectrofotómetro Perkin-Elmer 360 con horno de -
grafito HGA-2200.

Parámetros del espectrofotómetro

LAMPARA: HCL de cobalto

CORRIENTE: 30 mA

LONGITUD DE ONDA: 240.8 nm

ABERTURA: 0.2 nm

CORRECCION DE FONDO: Lámpara de arco de deuterio

Parámetros del horno de grafito

SECADO: temperatura = 98°C
tiempo = 50 seg

CALCINACION: temperatura = 1100°C
tiempo = 8 seg

ATOMIZACION: temperatura = 2650°C
tiempo = 8 seg

GAS INERTE: nitrógeno

FLUJO: interrumpido.

III.3 MATERIAL Y REACTIVOS.

El único reactivo utilizado en este trabajo fue el Tritón X-100 de Carbiochem, agente de tensión superficial usado en el tratamiento de la muestra.

Para la obtención de las curvas de calibración de los elementos se usaron soluciones de 1000 ppm (partes por millón) de Titrisol de Merck.

En todas las disoluciones realizadas se utilizó agua desionizada por un purificador de agua Milli R/Q de Millipore.

El material de vidrio fué lavado sucesivamente con detergente libre de metales, ácido nítrico diluido Suprapur de Merck y finalmente con agua desionizada antes de su empleo. El mismo lavado recibieron las puntas de plástico de las pipetas Eppendorf de 20 y 50 microlitros que se utilizaron en las determinaciones.

Todo el laboratorio se mantuvo en condiciones de limpieza, trabajándose con extremo cuidado a fin de evitar cualquier posible contaminación.

III.4 METODO DE ANALISIS DE LAS MUESTRAS

El tratamiento para la muestra en las determinaciones de plomo, manganeso y cobalto es similar. Se diluyó la muestra de sangre total, perfectamente homogeneizada por fuerte agitación mecánica usando un agitador Vórtex, con una solución de Tritón X-100 al 0.1% en peso en agua desionizada. La dilu-

ción fue de 1:5 en volúmen para los tres metales.

De la solución diluida se tomaron 20 microlitros con una pipeta Eppendorf y se introdujeron al horno de grafito del aparato directamente. Las mediciones del instrumento se graficaron usando un registrador Perkin-Elmer 56 conectado a la salida del espectrofotómetro.

Para obtener los valores de las concentraciones de las muestras, se corrieron soluciones estándar de concentración conocida, determinándose de esta forma una curva de calibración de altura de pico, en milímetros, contra la concentración de los estándares, de la cual se calcularon las concentraciones de las muestras por interpolación.

En todo el intervalo de concentraciones de las muestras la curva de calibración fué lineal.

III.4 CARACTERISTICAS DE LA MUESTRA.

Las muestras de sangre analizadas en este trabajo fueron colectadas por personal del programa de salud ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y transportadas al laboratorio en tubos de vidrio perfectamente cerrados con tapones de hule a los que previamente se les añadían unas gotas de solución de heparina Abbott libre de metales como anticoagulante.

La extracción de sangre de los sujetos se llevó a cabo por punción venosa directa.

Una vez en el laboratorio, las muestras fueron guardadas en un congelador a -20°C hasta el momento de su análisis. Las características de los 30 sujetos que constituyeron la muestra se detallan a continuación (Tabla 4) .

TABLE 4. Características de los sujetos de la muestra.

No. de muestra	Edad	Sexo	tiempo trabajando
1	25	M	2 años
2	27	M	2 meses
3	28	M	2 1/2 años
4	29	M	8 años
5	29	M	6 meses
6	35	M	7 años
7	33	M	1 1/2 años
8	19	M	7 meses
9	27	M	10 años
10	26	M	4 años
11	30	M	6 años
12	29	M	7 años
13	52	M	14 años
14	33	M	12 años
15	24	M	15 años

No. de muestra	Edad	Sexo	tiempo trabajando
16	39	M	1 año
17	32	M	3 años
18	38	M	10 años
19	19	M	5 años
20	42	M	1 año
21	34	M	7 años
22	60	M	15 años
23	31	M	11 años
24	25	M	4 años
25	52	M	15 años
26	50	M	7 años
27	24	M	1 año
28	30	M	7 años
29	17	M	5 meses
30	16	M	3 años

Los individuos que donaron las muestras de sangre son -
trabajadores de una fábrica de acumuladores de la zona indus-
trial de Naucalpan, Edo. de México, expuestos ocupacionalmen-
te a plomo.

Las muestras numeradas del uno al diez son de empleados
administrativos que pueden considerarse como testigos norma -
les en cuanto a sus niveles de plomo.

IV
RESULTADOS

Las concentraciones de plomo, manganeso y cobalto de las 30 muestras procesadas en este trabajo se presentan a continuación (tabla 5).

TABLA 5. Concentraciones de plomo, manganeso y cobalto.

No. de muestra	Plomo (en microg/100ml)	Manganeso (en ppb)	Cobalto (en ppb)
1	11.78	15.99	67.74
2	19.97	18.87	61.29
3	13.82	11.81	59.68
4	19.97	13.97	61.90
5	19.46	13.68	66.13
6	17.92	11.04	56.99
7	16.39	18.30	59.68
8	19.97	15.27	48.39
9	15.36	7.77	48.39
10	14.00	13.92	45.16
11	69.00	15.75	20.97
12	73.50	9.31	45.16
13	73.50	13.97	19.35
14	70.00	19.89	36.56
15	70.00	18.73	38.71

No. de muestra	Plomo (en microg/100ml)	Manganeso (en ppb)	Cobalto (en ppb)
16	63.63	19.31	52.23
17	65.22	18.83	51.61
18	60.00	15.56	37.09
19	60.83	22.96	45.16
20	60.31	19.16	41.94
21	100.50	12.38	35.48
22	106.06	12.82	51.61
23	112.00	22.48	29.03
24	103.00	14.98	43.55
25	106.00	24.70	33.87
26	104.50	50.18	32.26
27	108.48	17.58	33.87
28	106.06	24.02	24.19
29	116.96	15.04	24.19
30	102.72	14.19	33.87

Como se puede observar, los valores de plomo en los individuos del número 11 en adelante son muy superiores a los de los testigos normales. Aquéllos con un número entre 21 y 30 tienen niveles de plomo en sangre que pueden considerarse tóxicos (17,18,25) desde el punto de vista clínico.

Podemos agrupar las muestras en tres categorías de acuerdo con sus niveles de plomo en sangre de la siguiente forma :

Grupo A. Valores normales de plomo en sangre de los números 1 al 10.

Grupo B. Valores elevados de plomo en sangre de los números 11 al 20.

Grupo C. Valores tóxicos de plomo en sangre de los números 21 al 30.

TRATAMIENTO ESTADISTICO Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS.

Los resultados de cualquier experimento requieren ser procesados de tal manera que ofrezcan al investigador la oportunidad de interpretarlos de manera sencilla .

La estadística, desde esta perspectiva, ofrece un conjunto de herramientas por medio de las cuales los datos son organizados, resumidos y transformados hasta permitir que el investigador pueda interpretarlos y obtener de ellos la máxima información posible.

Para este trabajo, se utilizaron algunas técnicas estadísticas sencillas con los objetivos de : a) Organizar y resumir la información contenida en los datos y b) Encontrar relaciones entre las variables que intervinieron en el estudio.

El resumen de la información que los datos presentan, puede lograrse en general, mediante el cálculo de dos tipos de medidas estadísticas. Las de tendencia central como la media, la mediana y la moda que permiten establecer una localización del conjunto de datos en un punto que los representa. Las medidas de dispersión como la varianza, la desviación estándar, el rango, etc. que proporcionan una idea de la variación entre las observaciones debida al error experimental.

En este trabajo se usaron la media y la desviación estándar como medidas de resumen de los datos.

Las definiciones y métodos de cálculo para la media y la desviación estándar se encuentran en cualquier libro de estadística (26,27).

i) Estimación de la media por intervalo de confianza.

El cálculo de la media y la desviación estándar de los resultados nos permite obtener intervalos de confianza para las medias de los grupos.

El intervalo de confianza es un método estadístico de estimación en el que se presenta la media de los resultados en forma de un intervalo de valores dentro de los cuales se encuentra la media con una alta probabilidad, generalmente de 0.95, es decir, estaremos un 95% seguros de que la media real está en ese intervalo.

Haciendo uso de las propiedades de la distribución normal (2), podemos calcular los intervalos de confianza mediante la fórmula :

$$\text{intervalo de confianza : } \left(\bar{x} \pm t_{n-1}^{0.975} \frac{s}{n} \right)$$

En donde \bar{x} es la media de la muestra, s la desviación estándar y $t_{n-1}^{0.975}$ es el valor extraído de tablas de la t de Student con $n-1$ grados de libertad y una significancia del %, n es el tamaño de la muestra.

En la tabla No. 6 se presentan los valores de las medias, desviaciones estándar e intervalos de confianza calculados para los resultados de las determinaciones.

TABLA 6. Medias, desviaciones estándar e intervalos de confianza para los resultados.

	Plomo	Manganeso	Cobalto
<u>Grupo A</u>			
$\bar{x} \pm s$	16.86 \pm 3.03	14.06 \pm 3.34	57.54 \pm 7.75
intervalo de confianza	(14.70, 19.03)	(11.67, 16.45)	(51.99, 63.08)
<u>Grupo B</u>			
$\bar{x} \pm s$	66.60 \pm 5.28	17.35 \pm 3.81	38.88 \pm 11.25
intervalo de confianza	(62.82, 70.38)	(14.62, 20.08)	(30.83, 46.93)
<u>Grupo C</u>			
$\bar{x} \pm s$	106.63 \pm 4.84	20.84 \pm 11.29	34.19 \pm 8.32
intervalo de confianza	(103.17, 111.47)	(12.76, 28.91)	(28.24, 40.15)
<u>TOTAL</u>			
$\bar{x} \pm s$	63.36 \pm 37.60	18.38 \pm 7.46	43.54 \pm 13.59
intervalo de confianza	(49.33, 77.40)	(15.60, 21.17)	(38.46, 48.61)

Con el fin de investigar si existen diferencias en cuanto a los niveles de manganeso y cobalto entre los grupos A, B y C, se decidió realizar un análisis de varianza para cada metal.

El análisis de varianza es una técnica estadística que permite probar la existencia de diferencias entre las medias de varias poblaciones a partir de los datos de las muestras. En términos estadísticos, se pretende probar hipótesis de multitud de la forma (27) :

$$H_0 : m_1 = m_2 = \dots = m_k$$

contra la hipótesis alternativa de que al menos una media poblacional m_i es diferente, existiendo k medias poblacionales sujetas a comparación.

En el caso de que k sea igual a dos, el análisis de varianza se convierte en una prueba de t de Student para la comparación entre dos medias.

Los procesos de cálculo se describen en cualquier libro de estadística (27,28) y es costumbre resumirlos en una tabla de análisis de varianza.

La técnica de análisis de varianza no nos permite establecer comparaciones por pares entre las medias de los grupos sino sólo globalmente, por ésta razón, es necesario continuar el análisis estadístico usando pruebas de comparaciones múlti

ples (29) en las cuales se prueban las hipótesis estadísticas :

$$H_0 : m_i = m_j$$

donde m_i y m_j son dos medias cualquiera de las k comparadas en el análisis de varianza. La hipótesis alternativa es de que son diferentes.

Existen varios métodos de comparaciones múltiples de uso común, sin embargo, para los propósitos de este trabajo, la prueba desarrollada por Dunnett (30) es la más indicada. Esta prueba es recomendable cuando se desean comparar varias medias contra la de un grupo testigo normal, como en el caso de este trabajo. En el método de Dunnett se prueban hipótesis de la forma:

$$H_0 : m_0 = m_i$$

donde m_0 es la media de la población testigo normal y m_i es la media de la población i -ésima. La hipótesis alternativa es de que son diferentes.

Los cálculos para la prueba de Dunnett se describen con detalle en Méndez (30) y consisten en obtener un valor crítico D con cierta significancia, a partir del cual se pueden considerar estadísticamente distintas las dos medias.

A continuación se resumen los cálculos del análisis de varianza y las comparaciones múltiples para las medias de los grupos de las determinaciones de manganeso y cobalto.

TABLA 7 . Análisis de varianza para manganeso.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de Fo
Entre grupos	2	229.57	114.79	2.25 (N)
Error	27	1378.45	51.05	
Total	29	1608.02		

El valor de Fo calculado a partir de las columnas de grados de libertad, suma de cuadrados y cuadrados medios, se comparó contra un valor F de tablas con (2, 27) grados de liberadad, encontrándose no significativo (N) al 5% . Esto significa que no existen diferencias entre las medias de manganeso de los tres grupos. Sin embargo, se procedió con el análisis de comparaciones múltiples.

Se calculó primero el valor crítico D :

$$D^{0.05} = d_{p,v} \frac{2(CMe)}{r}$$

$$= 2.00 \frac{2(51.05)}{10} = 6.39$$

donde el valor $d_{p,v}$ fue extraído de tablas, CMe es el cuadrado medio del error en la tabla 7 y r es el número de casos por grupo.

Después, se obtuvieron las diferencias entre las medias de

de los grupos :

$$\bar{x}_B - \bar{x}_A = 3.28$$

$$\bar{x}_C - \bar{x}_A = 6.78$$

Sólo la diferencia entre las medias de los grupos A y C resulta significativa al 5% al ser mayor que el valor crítico $D^{0.05}$. Esto significa que las medias de los grupos A y C son estadísticamente diferentes.

TABLA 8. Análisis de varianza para cobalto.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F_0
Entre grupos	2	3048.79	1524.90	17.87(++)
Error	27	2303.78	85.33	
Total	29	5353.57		

El valor calculado de F_0 resultó significativo al 1% al compararlo contra un valor F de tablas con (2, 27) grados de libertad. Se procedió enseguida con el análisis de comparaciones múltiples.

El valor crítico D fue :

$$D^{0.01} = d_{p,v} \frac{2(85.33)}{10}$$
$$= 11.36$$

Se calcularon las diferencias entre las medias :

$$\bar{x}_B - \bar{x}_A = 18.597$$

$$\bar{x}_C - \bar{x}_A = 23.34$$

Ambas diferencias son significativas al 1% puesto que son mayores que el valor crítico $D^{0.01}$.

iii) Discusión de los resultados del tratamiento estadístico

Los valores de las concentraciones de plomo, manganeso y cobalto de los testigos normales encontrados en este trabajo concuerdan ampliamente con aquéllos informados en la literatura (17,18) tanto en medias como en desviaciones estándar, lo cual hace pensar que el método de análisis desarrollado aquí tiene buenas características de precisión y exactitud.

En cuanto a los posibles efectos de interacción podemos decir que las medias de los grupos A y C fueron estadísticamente distintas en cuanto a su concentración de manganeso, sugiriendo la idea de que la posible interacción entre plomo y este metal se dé únicamente a concentraciones tóxicas.

Sin embargo, se observa una marcada relación directa entre los niveles de plomo y los de manganeso, es decir, a mayores concentraciones de plomo en sangre hay más altos valores de manganeso, si se observan las medias de los grupos. La explicación de estos hechos está todavía por dilucidarse.

La evidencia de una posible interacción entre plomo y

cobalto es más fuerte debido a que además de que el análisis de varianza resultó significativo, también las medias de los tres grupos fueron estadísticamente distintas en el análisis de comparaciones múltiples.

Otro interesante hallazgo es la relación inversa que se establece entre plomo y cobalto, es decir, entre mayor concentración de plomo en sangre hay, más pequeña es la cantidad de cobalto. Tampoco es posible hasta el momento aventurar alguna explicación al respecto.

VI

CONCLUSIONES

1. El método de absorción atómica con horno de grafito para el análisis de elementos traza en muestras biológicas - reúne las características de:
 - A. Excelente sensibilidad.
 - B. Buena precisión y exactitud.
 - C. Determinaciones libres de interferencias.
 - D. Ausencia de contaminación debido al poco o nulo manejo de la muestra.
 - E. Relativamente bajo costo de operación.
 - F. Sencillez en su manejo.
 - G. Reproducibilidad de sus resultados.

2. Las técnicas de análisis para plomo, manganeso y cobalto - por absorción atómica de horno de grafito desarrolladas - en este trabajo comparten las características ya citadas - y añaden las de ofrecer un método común de tratamiento de - la muestra, con el cual se optimizan los recursos de tiem - po, material y reactivos. Gracias a él se obtienen mejo - res resultados para estudios comparativos.

3. Los valores de concentración encontrados en este trabajo para sujetos normales concuerdan con los informados en la literatura.

4. La precisión y exactitud de las determinaciones de plomo, manganeso y cobalto es lo suficientemente buena como para permitir el subsecuente análisis de los resultados sin que el error experimental oscurezca las conclusiones.
5. La posible interacción entre los niveles de plomo y manganeso en sangre es significativa solamente a niveles tóxicos del primero, sin embargo, existe una relación directa entre las concentraciones de ambos metales.
6. La evidencia de una posible interacción entre plomo y cobalto fue estadísticamente demostrada tanto a niveles elevados como a niveles tóxicos del primer elemento. la relación que se establece entre ambos metales es inversa.
7. Debido al diseño del experimento, no es posible concluir que la relación entre las concentraciones de plomo y los otros dos metales sea de causa a efecto. Tampoco es posible establecer cual es el tipo de interacción que se produce.
8. Los resultados del experimento plantean la necesidad de proseguir con la investigación utilizando experimentos con animales, a fin de dilucidar las causas de la posible interacción entre los metales.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Underwood, E. J., Trace Elements in Human Nutrition, 4a. - Ed., Academic Press (1977).
- 2.- Prasad, A. S., Oberleas, D. (Editores), Trace Elements in Human Health and Disease, Vol. II, Academic Press (1976) .
- 3.- Mena, I., et al. , Chronic Manganese Poisoning : Clinical Picture and Manganese Turnover, Neurology, 17 128-36 (1967) .
- 4.- Lehninger, A. L., Bioquímica, 2a. Ed., Ediciones Omega , - Barcelona (1979) .
- 5.- Bland, J., Trace Elements in Human Health and Disease , - Eagle Print (1978) .
- 6.- Valciukas, J. A., et al., Central Nervous System Dysfunction Due to Lead Exposure, Science, 201 465-67 (1978).
- 7.- Kehoe, R.A., Pharmacology and Toxicology of Heavy Metals - : Lead, Pharmac. Ther., 1 161-88 (1976).
- 8.- Sandstead, H. H., Interactions of Toxic Elements with - essencial Elements : Introduction, Ann. N.Y. Acad. Sci., 355 282-4 (1980).
- 9.- Slavin, M., Atomic Absorption Spectroscopy, 2a. Ed. , - John Wiley (1978) .
- 10.- Welz, B., Atomic Absorption Spectroscopy, Verlag Chemie , (1976) .

- 11.- Willis, B., Ultimos Adelantos en las Técnicas de Absorción Atómica para el Análisis de Substancias Biológicas, En deavour, 32 106-11 (1973) .
- 12.- Einarsson, O. , Lindstedt, G., A Non-extraction Atomic Absorption Method for the Determination of Lead in Blood, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 23 367-71 (1969).
- 13.- Posma, F. D., et al., Microdetermination of Cadmium and Lead in Whole Blood by Flameless Atomic Absorption Spectrometry Using Carbon-Tube and Carbon-Cup Sample Cell and Comparison with Flame Studies, Anal. Chem. 47 834-38 (1975).
- 14.- Fernández, F.J., Automated Microdetermination of Lead in Blood, Atomic Absorption Newsletters, 17 115-6 (1978) .
- 15.- Fernández, F.J., Micromethod for Lead Determination in Whole Blood by Atomic Absorption, with Use of the Graphite Furnance, Clin. Chem., 21 558-61 (1975).
- 16.- Boone, J. , et al., Comparison of Interlaboratory Results for Blood Lead with Results from a Definitive Method, Clin. Chem. , 25 389-93 (1979).
- 17.- P'an, A.Y.S., Lead Levels in Saliva and in Blood, J. Toxicol. Environ. Health, 7 273-80 (1981).
- 18.- Lauwerys, R., et al., Intercomparison Program of Lead , Mercury and Cadmium Analysis in Blood, Urine and Aqueous Solutions, Clin. Chem., 21 551-7 (1975).

- 19.- Bonilla, E., Flameless Atomic Absorption Spectrofotometric Determination of Manganese in Rat Brain and Other Tissues Clin. Chem., 24 471-4 (1978).
- 20.- Salvadeo, A., et al., Trace Metals Changes in Dialysis Fluid and Blood of patients on Hemodialysis. International Journal of Artificial Organs, 2 17-21 (1979).
- 21.- Muzzarelli, R.A., Rocchetti, R., Atomic Absorption Determination of Manganese, Cobalt and Copper in Whole Blood and Serum, with a Graphite Atomizer, Talanta, 22 683- 5 (1975)
- 22.- Pleban, P.A., and Pearson, K.H., Determination of Manganese in Whole Blood and Serum, Clin. Chem., 25 1915-8 (1979) .
- 23.- Ward, N.I., et al., Comparison of Three Analytical Methods for the Determination of Trace Elements in Whole Blood, Anal. Chim. Acta, 110 9-19 (1979).
- 24.- Analytical Methods for Atomic Absorption Spectroscopy Using the HGA Graphite Furnance, Perkin-Elmer, Norwalk (1973)
- 25.- Hernberg, S., et al., delta-aminolevulinic Acid as a Measure of Lead Exposure, Arch. Environ. Health, 21 140-5 (1970)
- 26.- Litensau and Rica, Statistical Theory and Methodology of Trace Analysis, John Wiley and Sons, (1980) .
- 27.- Ostle, B., Estadística Aplicada, Ed. Limusa, México (1977).

28.- Méndez, I. , Modelos Estadísticos Lineales, Foccavi-CONA
CYT (1976).

29.- Steel, R.G.D., Torrie, J.H., Principles and Procedures -
of Statistics, McGraw-Hill (1960).

30.- Méndez, I., Comparación de Medias de Población, Comuni -
caciones Técnicas, Serie Azul, IIMAS-UNAM (1976).