

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA



DETERMINACION DE COBRE Y ZINC EN PLASMA
Y ERITROCITOS HUMANOS POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORCION ATOMICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
Q U I M I C O
P R E S E N T A

ROGELIO

SOTO

AYALA

México, D. F.

1979



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

LAB. TESIS 1979
N.º M.T. ~~31~~
FECHA 334
FOLIO _____



JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE

PRESIDENTE: PROF. FRANCISCO FERNANDEZ NORIEGA
VOCAL: PROFA. M.^{ca} ANTONIA DOSAL GOMEZ
SECRETARIO: PROFA. LILIANA SALDIVAR OSORIO
1er. SUPLENTE: PROF. CARLOS ROMO MEDRANO
2o. SUPLENTE: PROFA. JOSEFINA DE GYVES MARCINIAK

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGIA
Y NEUROCIROGIA DE LA SSA. CON LA
APROBACION DE LA DIVISION DE ES-
TUDIOS SUPERIORES DE LA FACULTAD
DE QUIMICA, UNAM.

SUSTENTANTE: ROGELIO SOTO AYALA.

ASESOR DEL TEMA: PROFA. LILIANA SALDIVAR OSORIO.

A MIS PADRES:

QUE CON SU GRAN AMOR FOMENTARON LA
REALIZACION DE UNA DE LAS METAS
MAS IMPORTANTES DE MI VIDA.

A MIS HERMANOS:

CUYA AYUDA DESINTERESADA
AGRADEZCO SINCERAMENTE.

AGRADEZCO EN FORMA ESPECIAL AL DR. GASTON
CASTELLANOS, DEL INSTITUTO NACIONAL DE
NEUROLOGIA Y NEUROCIROGIA LA COLABORA-
CION BRINDADA PARA LA REALIZACION DE
ESTE TRABAJO.

AL QUIM. JAIME SAAVEDRA,

A LA BIOLOGA HILDA VALERO: CON AFECTO Y
AGRADECIMIENTO POR SU VALIOSA AYUDA.

A MI ASESOR:

CUYO ESTIMULO FAVORECIO LA REALIZACION
DE ESTE TRABAJO.

A MIS MAESTROS.

A MIS AMIGOS.

INDICE

- I. INTRODUCCION
- II. OBJETIVO
- ✓ III. GENERALIDADES 10 -
- IV. PARTE EXPERIMENTAL
- V. RESULTADOS
- VI. RESUMEN Y CONCLUSIONES
- VII. BIBLIOGRAFIA

I. INTRODUCCION

El cobre y el zinc son dos elementos que se encuentran en el organismo humano y que al clasificarlos quedan dentro de un grupo de elementos traza, conocidos como oligoelementos. Los oligoelementos son metales que se encuentran en organismos vivos en concentraciones de $\mu\text{g/g}$ ó $\mu\text{g/l}$ y toman parte en procesos biológicos, tales como: la actividad enzimática, estabilización de la estructura de las proteínas, síntesis de DNA, reacciones de óxido-reducción, etc.

En su mayoría estos oligoelementos intervienen en el sistema nervioso cumpliendo una función determinada y por consiguiente si se suministran en exceso ó deficiencia provocan alteraciones. Al respecto existe la teoría de que el cobre, a través de la ceruloplasmina y debido a su actividad oxidante, da lugar a trastornos mentales, como en el caso de la enfermedad de Wilson.

También se tienen datos de esquizofrénicos, maníaco-depresivos, epilépticos y algunos intoxicados con alcohol, que presentan altos niveles de cobre.

Del cobre hay muchos datos en la literatura (1,2), se estima que el contenido total de cobre en el cuerpo humano es de aproximadamente 80 mg. y la fracción que circula en la sangre es la que ha recibido

do, hasta ahora, la mayor atención. La ceruloplasmina es una proteína azul que tiene las siguientes propiedades: el contenido de cobre es de 0.32% aprox., tiene peso molecular de 151000; contiene 8 átomos de cobre por molécula y un punto isoeléctrico de 4.4, el pico de absorción se manifiesta a 605 nm.

La concentración normal de este compuesto en el suero en adultos es de 23-44 mg/100 mls., determinado mediante análisis inmunológico.

La ceruloplasmina puede ser reducida por hidrosulfito, vitamina C, hidroxilamina, cianuro y ác. tioglicólico.

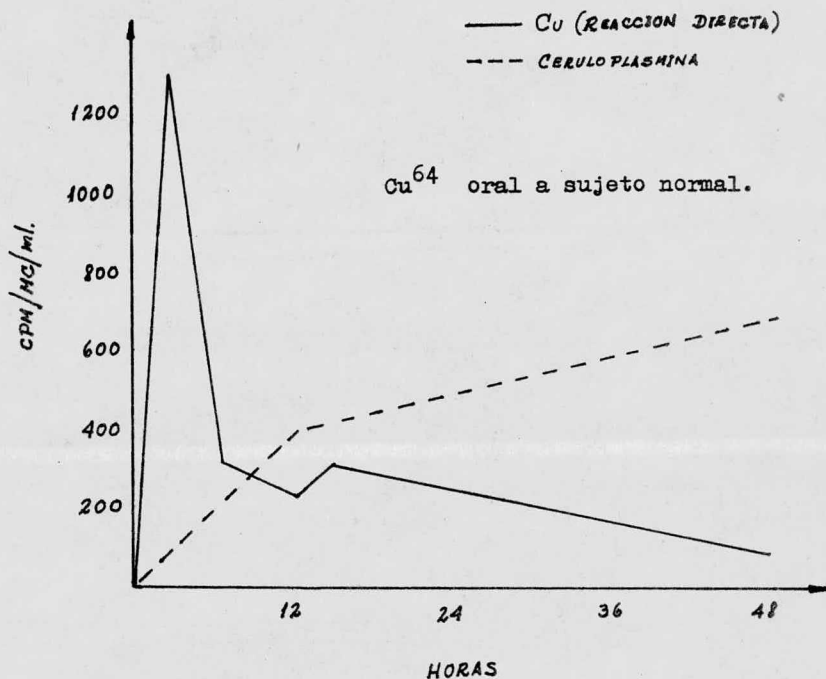
Como sustrato se ha demostrado ser una oxidasa en la presencia de p-fenilendiamina. Funciona como una enzima que oxida Fe^{2+} a Fe^{3+} , ayudando al transporte de éste a través de la pared intestinal.

Se considera que hasta el 15% de cobre en el plasma normal reacciona con dietil-ditiocarbamato y por esto se le ha llamado fracción de reacción directa.

Existe otra fracción muy superior a la anterior, la cuál está enlazada a la ceruloplasmina, ésta fracción reacciona con dietil-ditiocarbamato solo bajo tratamiento con ácido. Se considera que constituye en promedio el 93% de cobre existente en el organismo.

Se ha afirmado que el cobre enlazado directamente a la albúmina del suero, está relacionado con el transporte del cobre del tracto gastrointestinal a los tejidos y de un tejido a otro.

Esta acción puede ser demostrada siguiendo la administración oral de cobre radioactivo y su comportamiento puede representarse gráficamente de la siguiente manera: (3)



Como se observa, el cobre radioactivo aparece primero en la fracción de reacción directa, alcanza un máximo valor entre 1-3 hrs. y después empieza a descender, es en este momento cuando ocurre un aumento en radioactividad de la proteína del suero: la ceruloplasmina.

Se ha postulado (4) que hay una tercera fracción de cobre en el suero humano que se encuentra enlazada a aminoácidos. La fracción de cobre enlazada a aminoácidos está en equilibrio con el cobre enlazado a la albúmina y ambas fracciones posiblemente están en equilibrio con el cobre iónico.

Aparte de la ceruloplasmina se ha descrito (5) el aislamiento de una proteína de cobre en seres vivos. Dicha proteína, llamada eritrocuprefina, contiene entre 0.32 y 0.36% de cobre, tiene un peso molecular de 17900.

Se ha visto que es estable hasta 56°C. La estabilidad frente al pH se manifiesta principalmente en medios neutros.

Las preparaciones crudas de eritrocuprefina tienen máximos de absorción a 278 y 405 nm.

El punto isoeléctrico (6), se encuentra aprox. a pH de 5.2, se ha establecido que la ceruloplasmina difiere de la eritrocuprefina humana en el número de átomos de cobre por mol, en sus propiedades inmunológicas y en el espectro de absorción.

Puede añadirse también que las dos proteínas difieren en tamaño y composición, ambas son glicoproteínas.

El cobre juega un papel importante en la formación de pigmentos (7) en invertebrados y en el caso de insectos, en el endurecimiento del cascarón de los huevos.

Es un hecho conocido que aunque el cobre es un elemento esencial en los tejidos, su presencia en exceso es tóxica; así tenemos que la ingestión de una gran cantidad de sulfato de cobre causa vó

Se ha postulado (4) que hay una tercera fracción de cobre en el suero humano que se encuentra enlazada a aminoácidos. La fracción de cobre enlazada a aminoácidos está en equilibrio con el cobre enlazado a la albúmina y ambas fracciones posiblemente están en equilibrio con el cobre iónico.

Aparte de la ceruloplasmina se ha descrito (5) el aislamiento de una proteína de cobre en seres vivos. Dicha proteína, llamada eritrocupreína, contiene entre 0.32 y 0.36% de cobre, tiene un peso molecular de 17900.

Se ha visto que es estable hasta 56°C. La estabilidad frente al pH se manifiesta principalmente en medios neutros.

Las preparaciones crudas de eritrocupreína tienen máximos de absorción a 278 y 405 nm.

El punto isoelectrónico (6), se encuentra aprox. a pH de 5.2, se ha establecido que la ceruloplasmina difiere de la eritrocupreína humana en el número de átomos de cobre por mol, en sus propiedades inmunológicas y en el espectro de absorción.

Puede añadirse también que las dos proteínas difieren en tamaño y composición, ambas son glicoproteínas.

El cobre juega un papel importante en la formación de pigmentos (7) en invertebrados y en el caso de insectos, en el endurecimiento del cascarón de los huevos.

Es un hecho conocido que aunque el cobre es un elemento esencial en los tejidos, su presencia en exceso es tóxica; así tenemos que la ingestión de una gran cantidad de sulfato de cobre causa vó

mito, dolor gástrico, anemia, convulsiones, shock, coma y muerte.

Se ha encontrado que la acción tóxica del metal puede ser atribuida a una combinación con los grupos tiol (-SH) de ciertas enzimas en concentraciones de 10^{-4} a 10^{-3} M, además inhibe la actividad glicolítica de los extractos musculares.

La enfermedad de Wilson se caracteriza por bajos niveles de ceruloplasmina causados posiblemente por la síntesis de una molécula defectiva.

En relación al zinc, podemos decir que es un elemento esencial para el funcionamiento de algunas enzimas, juega un papel no conocido en el metabolismo de la insulina y las porfirinas. Sin embargo, se ha demostrado que forma complejos con éstas últimas.

Por la coproporfirina es excretado en envenenamiento por plomo y en la orina de pacientes con fiebre reumática aguda.

Las principales metaloenzimas de zinc, son: la carboxipeptidasa A, alcohol dehidrogenasa, dehidrogenasa láctica y la glutámica.

En el suero normal el zinc existe en dos fracciones, una firmemente enlazada (34%) y otra débilmente unida (66%), la primera es una metaloproteína, la segunda es un complejo metal-proteína.

Estudios radioisotópicos de Zn-65 han mostrado que éste es enlazado a la albúmina, transferrina y macroglobulina α -2 en el suero normal

Su papel nutricional (8), salvo ser necesario para la acción de al menos 20 enzimas, no ha sido totalmente demostrado. De un amplio estudio, se ha llegado a la conclusión que la concentración de zinc es constante, con variaciones no atribuibles al sexo ó ciclo circadiano. Hasta la fecha no se han observado anomalías con una concentración mayor que la normal.

Se ha mencionado (9) que las deficiencias de zinc en el organismo son causadas por dietas bajas en zinc, aquí juegan un papel muy importante las grasas, pues al ser refinadas, se elimina gran parte del zinc. Esta deficiencia se puede compensar ingiriendo alimentos ricos en zinc, como son: lentejas, huevo, guisantes, avena, etc. ó bien mediante terapia de sulfato de zinc.

Un dato importante obtenido a través de varios estudios es que las proteínas, sobre todo las de la carne, ayudan a fijar el zinc del organismo.

El zinc tiene tan vital importancia en las funciones del cuerpo, que la terapia debería ser tanto ó más común que la terapia con hierro.

Naturalmente no solo el cobre y el zinc intervienen en las funciones orgánicas, se mencionó que éstos dos pertenecen al grupo de los oligoelementos, que hasta la fecha son 15, a saber: hierro, yodo, cobre, zinc, manganeso, cobalto, níquel, molibdeno, boro, selenio, cromo, estaño, fluor, silicio y vanadio.

Existen 11 elementos en mayor cantidad que también son in-

dispensables para la vida, éstos son: carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre, calcio, fósforo, potasio, sodio, cloro y magnesio.

Algunas afecciones nerviosas provocadas por metales que se encuentran en exceso en el organismo son: el Parkinsonismo, debido a la intoxicación con manganeso, la encefalopatía tóxica, generada por plomo y estaño y algunas más.

Es por ésta razón que se desean establecer los patrones normales y conocer los niveles de estos elementos en personas con problemas del sistema nervioso; de esta manera se podrían correlacionar los niveles de los elementos con las diferentes enfermedades.

Cuando estos conocimientos se filtren a través de la pared usual del escepticismo, indiferencia e ignorancia del médico práctico, surgirá la necesidad general de la evaluación del status de estos elementos en los pacientes y se usará la terapia adecuada.

II. OBJETIVO

El objetivo de ésta tesis es establecer las diferencias y correlaciones existentes entre los niveles de cobre y zinc de personas normales y personas hospitalizadas en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN).

Se sabe que los contenidos de éstos metales en el organismo varían dependiendo de varios factores como son: la alimentación y el estado psicobiológico de la persona.

Los fluidos biológicos analizados son principalmente plasma y eritrocitos.

El objeto de determinar estos elementos en los fluidos anteriores se debe al hecho de que el torrente sanguíneo transporta gran cantidad de electrólitos que son conducidos por él a todas las partes del cuerpo y, sobre todo, porque el suero transporta muchas enzimas que contienen éstos elementos trazas, indispensables en la actividad enzimática.

Es por esto que se ha hecho necesaria la investigación y desarrollo de equipo adecuado con las técnicas analíticas más precisas para la determinación de dichos elementos en el cuerpo.

Una de las técnicas cuya aportación es muy valiosa para el cuanteo de estos metales es la Espectroscopía de Absorción Atómica

La determinación de cobre y zinc será llevada a cabo mediante tres métodos para poder establecer una comparación entre ellos

y, con base en ésto, poder elegir el más adecuado al realizar determinaciones posteriores.

Estos métodos son:

- a).- Dilución. (hemólisis en el caso de eritrocitos)
- b).- Precipitación de proteína.
- c).- Destrucción de materia orgánica.

Los pacientes sobre los que se realizará el estudio en su mayoría son personas maniaco-depresivas que presentan alteraciones nerviosas y trastornos metabólicos.

III. GENERALIDADES SOBRE ABSORCION ATOMICA

El uso de la Absorción Atómica (10,12) para propósitos analíticos fué propuesto por primera vez por Walsh. La primera observación de la Absorción Atómica fué probablemente la de Wollaston, quién fué el primero que observó las ahora famosas líneas de absorción en el espectro del sol: " las líneas de Fraunhofer " ; las cuáles fueron explicadas por primera vez por Brewster, en 1832, éste investigador pasó luz blanca a través de anhídrido nitroso y observó la disminución de la intensidad de la misma y sugirió que las líneas de Fraunhofer podían ser debidas al paso de luz blanca a través de un vapor absorbente.

En 1860, Kirchhoff investigó sistemáticamente la inversión de las líneas espectrales debidas al litio, sodio, potasio, calcio, estroncio y bario en la flama no luminosa del horno inventado por su colaborador Bunsen.

La inversión de líneas espectrales ha sido aplicada frecuentemente para determinar la temperatura de flamas ó cuerpos similares de vapor luminoso, como en los vapores que rodean a las estrellas.

Las bases del método se explican cuando la luz de una fuente pasa a través de un vapor caliente y aparecen líneas de emisión ó absorción dependiendo de que la temperatura de la fuente exceda ó no a la del vapor. Cuando las dos son iguales, la línea

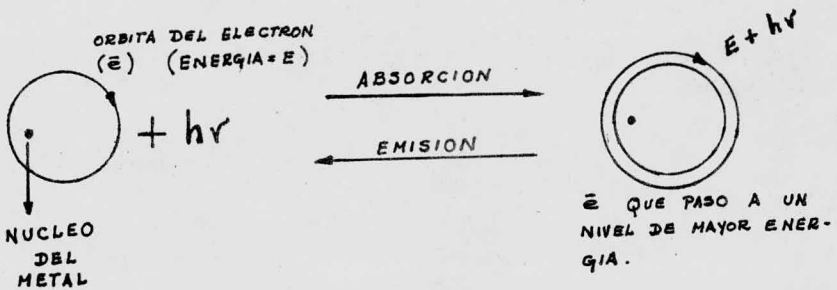
no es observable (se considera que el equilibrio térmico ha sido alcanzado en la flama).

Walsh vislumbró que el fenómeno responsable para las líneas de Fraunhofer podría ser utilizado para análisis de elementos trazas.

Así pues, nos enfocaremos a comprender el funcionamiento y características de la Espectroscopía de Absorción Atómica.

Principio. La aplicación analítica (10,11) de ésta técnica está basada en el hecho de que los átomos metálicos absorben fuertemente a longitudes de onda características y discretas, que coinciden con el espectro de emisión del metal en particular.

Una representación simple del proceso se muestra a continuación:



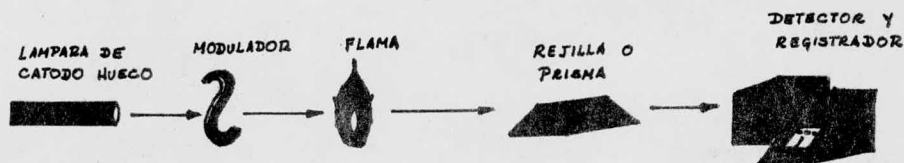
Como se observa en el esquema anterior el proceso para la emisión de un espectro, como en fotometría de flama y espectrografía de emisión, es el inverso del proceso de absorción.

Debido a que en la flama la gran mayoría de los átomos se encuentran en estado basal, se requiere para obtener una línea fuerte de emisión que la temperatura de la flama sea lo suficientemente alta para que los átomos sean excitados a un nivel de energía superior. Con base en esto podemos decir que el proceso de absorción es más eficiente que el de emisión.

Instrumentación ó Equipo. Un aparato de absorción atómica consta básicamente de las siguientes partes:

- a).- Fuente de excitación (lámpara de cátodo hueco).
- b).- Modulador
- c).- Atomizador (cámara de nebulizado, quemador, flama).
- d).- Sistema óptico y detector.

A continuación se muestra un diagrama esquemático de estas partes:



a).- Lámpara de cátodo hueco. Consta de dos electrodos, uno de los cuáles tiene forma cóncava (cátodo) y está constituido por el elemento especificado (ó una aleación de ese elemento). El ma-

terial del ánodo no es crítico.

La lámpara es llenada con un gas noble a baja presión. La aplicación de 100 a 200 V producirá, después de un período corto de calentamiento, una descarga brillante. La radiación consiste de líneas discretas del metal más las del gas de relleno.

El gas es seleccionado por el fabricante para dar la menor interferencia espectral con el metal de interés.

Estas lámparas dan líneas de emisión finas para los elementos específicos. En general, las líneas de interés están rodeadas de numerosas líneas no absorbentes y por consiguiente, pueden ser aisladas por medio de un monocromador de anchura de banda angosta.

Varios factores (12) causan ensanchamiento de la línea. Las principales son: el ensanchamiento Doppler y el ensanchamiento de presión.

El primero es el más importante y es causado por el movimiento térmico de los átomos. El cambio en frecuencia depende de la velocidad del átomo en interés.

Sabiendo que la energía cinética es proporcional a la temperatura:

$$Mv^2 \propto T, \quad \sqrt{v} \propto (T/M)^{1/2} \quad \text{y} \quad \Delta v \propto (T/M)^{1/2}$$

Donde: Δv = anchura Doppler.

Se observa que los átomos pesados en una flama a baja temperatura darán lugar a líneas de absorción muy estrechas.

Hay algunas lámparas de cátodo hueco que contienen varios metales en una estructura catódica individual, esto alivia el pro-

blema de la manipulación frecuente de lámparas. Algunos ejemplos son: (Ca,Mg); (Al,Fe,Cu); (Mn,Cu,Zn,Pb); etc.

En síntesis podemos decir que la lámpara de cátodo hueco aporta la energía necesaria para que se manifieste el fenómeno de absorción.

b).- Modulador. En general se utiliza en aparatos de doble haz, y su función es eliminar la interferencia causada por variaciones en la lámpara y cambios en la sensibilidad del detector.

Tiene forma de "S" y está situado justo después de la lámpara. Tiene superficies reflectoras de tal manera que, al girar, la mitad de la luz emitida por la lámpara pasa por la flama y la otra mitad sigue otro camino óptico y la relación entre las dos intensidades luminosas nos dará una determinación muy confiable de la absorción debida a la muestra.

c).- Atomizador y cámara de nebulizado. Este pequeño accesorio debe introducir la muestra líquida en la flama a una velocidad estable y reproducible, debe ser inerte a las disoluciones que se introducen, además de ser limpiado fácilmente.

Generalmente se utilizan nebulizadores neumáticos y en su operación el gas fluye a través de ellos pasando por una sección venturi y generando una presión reducida. Esto causa que la disolución sea introducida a una velocidad entre 1.0 y 4.0 ml/min.

La disolución llega a la cámara de nebulizado donde golpea

un obstáculo en una posición adecuada; así las gotas más grandes son fragmentadas en partículas más pequeñas.

En la cámara de nebulizado se mezclan estas pequeñísimas gotas con el combustible y el oxidante. Aquí el cambio en las dimensiones de la cámara y en la dirección del flujo crean turbulencia que asegura la mezcla total de los tres componentes.

Arriba de esta zona de mezcla, la forma de la cámara es tal que el flujo turbulento de la muestra es convertido en un flujo laminar, asegurándose con esto una flama estable.

En la cámara de nebulizado también se lleva a cabo el drenaje de las gotas mayores, y solo las gotas más pequeñas son introducidas en la flama.

El quemador. El principal requerimiento del quemador es que cuando es alimentado con combustible y aire a presión constante debe producir una flama estable. Después de que la muestra y los gases se han mezclado en la cámara de nebulizado, llegan a la cabeza del quemador donde se queman, favoreciéndose la combustión por el aire de los alrededores.

El quemador está colocado en un sitio del aparato en donde queda protegido de corrientes de aire, para protección del operador existe una ventana frontal.

Generalmente se coloca una campana de extracción en la parte superior del aparato para eliminar los productos de combustión.

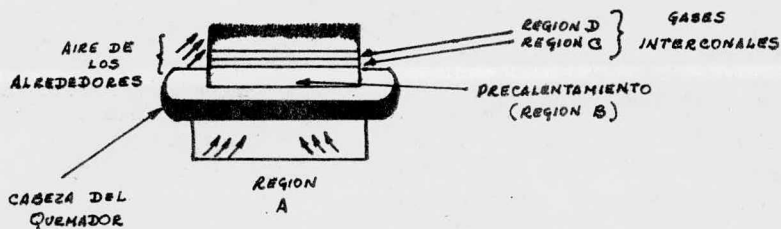
Asociada con el quemador existe la flama, de la cuál se detallan las características a continuación.

La flama. Es usada para transformar la muestra, que será analizada, del estado líquido ó sólido al estado gaseoso y para disociar los compuestos moleculares del elemento investigado en átomos en estado basal. (13).

Los dos principales requerimientos de una flama satisfactoria son:

- 1).- Que tenga la temperatura apropiada para llevar a cabo las funciones anteriores, y:
- 2).- Que la flama no interfiera por sí misma en el espectro de absorción ó de emisión.

La estructura de la flama es la siguiente:



Los gases emergen de la región A, pasan a la región B, de aprox. 1.0 mm de espesor, en la cuál son calentados por conducción y radiación de la zona de reacción C y por difusión de radicales dentro de ella; éstos inician la oxidación.

Los gases que emergen de la región C consisten principalmente de CO , H_2 , CO_2 , y H_2O (y N_2 si el aire es uno de los gases original).

les).

El equilibrio térmico se alcanza completamente en la zona D.

A continuación se mencionan algunos datos de temperaturas máximas de flamas usadas en absorción atómica.

Combustible:	(°C) en aire	(°C) en oxígeno
Gas de alumbrado	1700	2700
Propano	1925	2800
Butano	1900	2900
Hidrógeno	2100	2780
Acetileno	2200	3050
Cianógeno	2330	4550

La flama: acetileno-óxido nitroso es bastante usada para atomizar elementos tales como: aluminio, silicio, vanadio y titanio, los cuáles producen óxidos refractarios en la flama. Produce una temperatura máxima de 3000°C.

El número de átomos en el estado basal (12), con respecto a átomos en estado excitado, es una función de la temperatura de la flama.

Es importante conocer el número relativo de átomos en estado basal en la flama, pues en base a esto se manifiesta el espectro de absorción.

En un grupo de átomos y electrones en equilibrio térmico, a la temperatura T , que tienen dos estados de energía E_1 y E_2 , respectivamente, el número de átomos en los dos estados estará dado por:

$$n_1 = CP_1 e^{-E_1/\kappa T}$$

$$n_2 = CP_2 e^{-E_2/\kappa T}$$

Aquí C es una constante, independiente de E, mientras P_1 y P_2 son números llamados pesos estadísticos de los estados respectivos, P en general es igual a: $2J + 1$, donde J es el número cuántico total. La relación entre n_2 y n_1 considerando al primero como el estado excitado y a n_1 como el estado basal es la siguiente:

$$\frac{n_2}{n_1} = \frac{P_2}{P_1} e^{-(E_2-E_1)/\kappa T}$$

Algunos valores de n_2/n_1 para algunos elementos se mencionan a continuación.

Línea de resonancia:	P_2/P_1	n_2/n_1		
		2000°K	3000°K	4000°K
Cs(852.1 nm)	2	4.4×10^{-4}	7.2×10^{-3}	2.9×10^{-2}
Na(589.6 nm)	2	9.8×10^{-6}	5.8×10^{-4}	4.4×10^{-3}
Ca(422.7 nm)	3	1.2×10^{-7}	3.7×10^{-5}	6.0×10^{-4}
Zn(213.9 nm)	3	7.2×10^{-15}	5.6×10^{-10}	1.5×10^{-7}

Podemos por consiguiente concluir que existirá una mayor población de átomos en estado basal a más baja temperatura y, a medida que la temperatura de la flama es mayor, los átomos en estado excitado van adquiriendo mayor importancia, ésto implica que la absorción es un proceso que se alcanza en condiciones menos severas que la emisión.

d).- Sistema óptico y detector. La función del sistema óptico (13) es coleccionar la luz de la parte más estable de la flama, transformarla en monocromática y enfocarla al detector fotosensitivo. Un espejo cóncavo es frecuentemente colocado detrás de la flama, con su centro de curvatura en la flama. La intensidad de la luz emitida mediante este camino es casi el doble.

En algunos aparatos se utilizan filtros de interferencia para aislar la radiación característica de un elemento dado.

Estos instrumentos son limitados en su aplicación, a aquellas muestras y aquellos elementos que por excitación en la flama dan lugar a un espectro simple.

Para un buen resultado, hay que contar con prismas ó redes, que permiten aislar líneas muy angostas de absorción y, por tanto, la radiación de fondo adyacente a esta línea.

La radiación de fondo de la flama se considera como una interferencia de tipo espectral, pues la flama en sí contribuye en la absorción ó emisión dependiendo de las condiciones que tenga, es decir de la relación combustible-oxidante. Existen así emisiones de flama debidas a grupos : -OH, C₂, radical CH, etc.

La flama de hidrógeno dá la mejor combinación de la señal del metal a la señal de fondo.

Este problema se elimina con lámparas de corriente alterna, pues el detector queda sincronizado con ellas, de tal manera que detecta dos momentos; uno cuando la energía de la fuente pasa por la flama y ocurre la absorción y otro cuando ésta energía no pasa por la flama y solamente se detecta la señal de la

flama. Por consiguiente el resultado del detector está libre de dicha interferencia.

La combinación de una abertura aceptable, de buena calidad óptica, un control de ganancia adecuado en el amplificador del circuito detector y una longitud de onda adecuada, permiten al operador seleccionar la relación más favorable entre la señal de fondo y la radiación analítica de la línea para aislar más efectivamente la radiación debida al elemento prueba.

Combustibles y oxidantes. Los únicos oxidantes empleados en la práctica son: aire y óxido nitroso. Este último se descompone de 500°C - 900°C para dar una mezcla de dos partes de nitrógeno por una de oxígeno, mientras el aire contiene cuatro de nitrógeno a una de oxígeno. Como combustible se usa acetileno.

El óxido nitroso es esencial en el análisis de algunos elementos, como los lantánidos, que forman óxidos refractarios en la flama aire-acetileno.

Los métodos de flama pueden ser utilizados con soluciones acuosas y no acuosas. Si el disolvente es combustible, su presencia aumentará la temperatura de la flama ligeramente, mientras el agua la enfriará por disociación endotérmica.

En el primer caso, la sensibilidad de la determinación es mucho mayor que al utilizar soluciones acuosas; debido a esto el cuanteo de elementos trazas por extracción en disolventes orgánicos es una técnica muy adecuada.

Interferencias. Una interferencia es un efecto que impide conocer el valor real de lo que se va a determinar, que en nuestro caso es la absorción.

Existen tres clases de interferencias, a saber:

- 1).- Interferencias físicas.
- 2).- Interferencias químicas.
- 3).- Interferencias espectrales.

1).- Las interferencias de tipo físico son aquellas que varían las propiedades físicas de la disolución y alteran así el valor de la determinación. Un ejemplo lo constituye la viscosidad, ya que, cuando ésta es modificada por algún motivo, la velocidad de aspiración cambia, varía la cantidad de solución que llega a la flama y por tanto se modifica la absorción.

El cambio en la tensión superficial, la cuál afecta directamente la eficiencia de la nebulización, así como la velocidad de entrada de la muestra también reflejan cambios en la determinación.

2).- Las interferencias químicas constituyen los efectos más significativos en la mayoría de los casos; este tipo de interferencias afecta la eficiencia con la cuál la flama disocia la muestra en átomos libres. La ionización es una forma de interferencia química, la cuál es evitada añadiendo un exceso de alguna sustancia fácilmente ionizable. Típicamente se añaden de 2000 a 5000 ppm de KCl, ésto también evita el efecto variable de pequeñas cantidade

des de sustancias fácilmente ionizables que pueden estar presentes en la muestra.

En general, como la absorción atómica es una técnica empírica donde una muestra es comparada con una serie de estándares, nos debemos asegurar que las muestras y los estándares contengan las mismas matrices, es decir que se asemejen lo más posible en todas sus propiedades cuando se realice la determinación.

3).- Las interferencias espectrales también existen, son causadas por la lámpara de cátodo hueco, por la flama, ó bien debido a la superposición de líneas de absorción de los elementos introducidos en la flama. Estas interferencias pueden ser evitadas eligiendo una anchura de banda adecuada para aislar solamente la línea de interés del elemento, y en el caso de superposición de líneas de absorción eligiendo otra longitud de onda.

A continuación se describen las ventajas y desventajas (10) de ésta técnica analítica.

Ventajas. La ventaja principal de la absorción atómica sobre otras técnicas analíticas, es su alto grado de sensibilidad.

Ha sido totalmente demostrado que la exactitud del procedimiento en absorción atómica solo en casos muy raros se ve afectada por la presencia de otros elementos, probablemente porque se está tratando con las propiedades físicas de un átomo.

Tampoco es usual que dos metales absorban a la misma longi-

tud de onda y por consiguiente la interferencia debida a otros elementos es muy remota.

El equipo usado es muy simple y fácil de manipular.

Los procedimientos para la determinación de los elementos resultan muy rápidos, pues en algunas ocasiones solo es necesario hacer una simple dilución de la muestra en agua para proceder a su lectura.

Desventajas. Cuando se usa una flama para producir el estado atómico, algunos elementos no son detectables en su totalidad, entre éstos se incluyen: aluminio, titanio, tungsteno, molibdeno, etc. ; la explicación más probable parece ser que al formar óxidos en la flama, se limitará la producción del estado atómico, esencial para la detección.

Respecto a la producción de las especies atómicas en la flama, si se utilizan soluciones acuosas el anión predominante afecta la señal de manera notable. Igualmente, la formación de sales enlazadas fuertemente, por ejemplo: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, tiene un efecto pronunciado en las respuestas.

Hasta donde sea posible estos efectos deben ser evitados por procedimientos de estandarización adecuados para que los resultados sean buenos. Cuando se usan disolventes orgánicos, el grado de absorción aumenta muchas veces; sin embargo, este caso da lugar a algunas complicaciones adicionales debido a que dichos disolventes absorben en la flama. Este problema se evita eligiendo un paso óptico a través de la flama arriba de la zona donde se

lleva a cabo la combustión del disolvente.

El contenido de metales ó elementos trazas puede ser determinado por otros métodos colorimétricos. La espectroscopía de absorción atómica compite con todos, además puede compararse con la fotometría de flama y la espectrografía de emisión, ya que éstas son técnicas de emisión y por tanto dependen de la producción de átomos excitados para la generación de una señal medible.

A continuación se detallan las condiciones experimentales de análisis para cobre y zinc, que se utilizaron para el desarrollo de éste trabajo.

Condiciones estándar para cobre (14): Se prepara una disolución patrón de 1000 ppm de Cu por disolución de 1.0 gr. de cobre metálico en un volumen mínimo de HNO_3 al 1% (v/v).

Las soluciones patrón de 1000 ppm se expenden ya preparadas en el comercio y lo único que hay que hacer es simplemente diluirlas a las concentraciones deseadas.

Parámetros de operación usados con el aparato de absorción atómica Perkin-Elmer mod. 360 utilizados para éste trabajo.

Instrumento: Mod. 360 (Perkin-Elmer).

Longitud de onda: 324.7 nm.

Slit: 4 (0.7 nm).

Fuente luminosa: Lámpara de cátodo hueco normal.

Tipo de flama: Aire-acetileno (tipo oxidante)

Sensibilidad: Para las condiciones descritas arriba, la sensibilidad es aprox. $0.09 \mu\text{g/ml}$ de cobre para 1.0 % de absorción.

Un estándar conteniendo $5 \mu\text{g/ml}$ de cobre típicamente dará una lectura de absorbancia de aprox. 0.25 (44% de absorción).

Intervalo lineal de trabajo: Para las condiciones estándar descritas arriba el intervalo de trabajo para cobre es

lineal hasta una concentración de 5 μ g/ml en solución acuosa.

Algunas otras líneas analíticas que se pueden usar son las siguientes:

Longitudes de ondas: (nm)	Modelo:	Slit: (nm)	Sensibilidad relativa:		
503,403,306	300	103			
305(A,B),303	300S	107,290(B)			
324.8	325-JV	325	280	0.7	1.0
327.4	327-JV	327	284	0.7	2.0
216.5	217-JV	217	088	0.2	6.0
222.6	223-JV	223	097	0.2	15.0
249.2	249-JV	249	143	0.7	72.0
224.4	224-JV	224	100	0.2	157.0
244.2	244-JV	244	134	0.7	291.0

Lámparas: Con lámparas multielementos que contengan níquel ó fierro se debe usar una anchura de banda espectral de 0.2 nm cuando se utiliza la línea del cobre a 324.7 nm.

Emisión por flama: La longitud de onda de emisión para

cobre es a 327.4 nm. Se recomienda una flama acetileno-óxido nitroso. El cobre también puede ser determinado a 324.8 pero con menor sensibilidad.

También se puede usar la flama acetileno-aire, pero con una menor sensibilidad.

Condiciones estándar para zinc (14): La solución patrón de zinc de 500 ppm se obtiene por disolución de 0.5 grs. de zinc metálico en un volumen mínimo de HCl (1+1) y posterior dilución a 1 lt. con HCl al 1% (v/v).

Parámetros de operación.

Instrumento: Mod. 360 (Perkin-Elmer).

Longitud de onda: 213.9 nm.

Slit: 4(0.7 nm).

Fuente luminosa: Lámpara de cátodo hueco normal.

Tipo de flama: Aire-acetileno.

Sensibilidad: Para las condiciones estándar descritas arriba, la sensibilidad es aprox. 0.018 μ g/ml de zinc para 1% de absorción. Un estándar conteniendo 0.5 μ g/ml de zinc típicamente dará una absorbancia de 0.12 (25% de absorción).

Intervalo lineal de trabajo: Para las condiciones descritas arriba, el intervalo de trabajo es lineal hasta una concen-

tracción de 1.0 μ g/ml en solución acuosa.

Algunas otras líneas analíticas son las siguientes:

Longitudes de ondas (nm)	Modelo:	Slit: (nm)	Sensibili- dad relati- va:
	503,403,306		
	305 (A,B),303		
213.9	214-UV	0.7	1.0
307.6	308-UV	0.7	4700

Sistema de micromuestras: Con la técnica de copas Delves, de micromuestras, se pueden detectar 0.00003 grs. de zinc.

Emisión por flama: La longitud de onda más sensible para zinc es de 213.9 nm., es recomendable usar una flama acetileno-óxido nitroso. El zinc también puede ser determinado a 307.6 nm. pero con una menor sensibilidad.

IV. PARTE EXPERIMENTAL

Todas las determinaciones se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Mod. 360 con detector digital.

Los gases utilizados fueron exclusivamente aire y acetileno.

No fué posible contar con un corrector de señal de fondo; sin embargo, se trabajó con sumo cuidado para evitar la interferencia ó la contaminación adicional.

Las condiciones de trabajo usadas fueron las siguientes:

Elemento:	λ (nm)	Slit (nm)	Corriente lámpara:	Flujo $g\ddot{a}$ ses:
Cu	324.7	0.7	15 mA	Comburente:
Zn	213.9	0.7	15 mA	55 Kg/cm ² Combustible: 32.5 Kg/cm ²

Las equivalencias de los flujos expresados en Kg/cm² a lt/min serían:

Comburente: 21.7 lt/min

Combustible: 3.7 lt/min

La longitud del mechero fué de 4.0 pulgadas y hendidura simple. La altura del cabezal del mechero fué de 2.5 cm.

Las determinaciones se hicieron en base a un sistema de lectura que trae integrado el aparato, representado por los

símbolos TC3 y TC4, que indican tiempos de aspiración mínimos de 17 y 55 segundos respectivamente.

El material utilizado para el desarrollo de este trabajo fué mínimo: una centrífuga, un baño de arena y material común de laboratorio.

Los reactivos usados fueron de la máxima pureza, soluciones titrisol, ambos R.A. de Merck.

A continuación se mencionan las técnicas utilizadas y posteriormente los resultados obtenidos.

1).- Método de dilución: Es una técnica muy usada para el análisis de muestras que no presentan interferencias; esta técnica solamente se aplicó en plasma.

El procedimiento fué el siguiente:

Se aisló el plasma de los eritrocitos mediante centrifugación.

Se tomó un volumen conocido de plasma (0.5 ml) y se colocó en un matraz aforado de 10 ml

Se aforó al volumen con agua tridestilada.

Se agitó para asegurar la completa homogenización de la muestra.

Se determinaron las concentraciones de los metales de interés.

Como el aparato usado permite la determinación de la concentración directa en la muestra no fué necesario correr las

curvas de calibración sino, simplemente, hacer una calibración del aparato en base a la preparación de tres soluciones (0.5, 1.0, 1.5 ppm), de tal manera que la lectura del aparato coincidiera con las concentraciones de las muestras.

La preparación de los estándares se hizo de la siguiente manera:

A partir de una solución del metal de concentración 1000 ppm se tomaron 10 ml y se diluyeron a 100 ml con agua tridestilada; se obtuvo así una concentración en solución de 100 ppm.

De esta solución se hicieron las siguientes diluciones para los estándares.

Para el std. de 0.5 ppm: Se colocaron 0.5 ml en un matraz volumétrico de 100 ml y se completó con agua hasta el aforo.

Para el std. de 1.0 ppm: Se colocó 1.0 ml de la solución en un matraz volumétrico de 100 ml y se completó con agua tridestilada hasta el aforo.

Para el std. de 1.5 ppm: Se colocaron 1.5 ml en un matraz volumétrico de 100 ml y se completó al aforo con agua tridestilada.

Las soluciones más concentradas son más estables al paso del tiempo, no así las soluciones diluidas que varían su concentración por efectos de evaporación; por consiguiente los estándares deben prepararse periódicamente.

2).- Destrucción de materia orgánica: Documentación acerca de ésta técnica (15,16,17,18) es escasa, inclusive no ha habido un criterio unificado acerca del procesamiento de la muestra, ya que algunos autores recomiendan una determinada mezcla de agentes oxidantes, otros recomiendan otra, etc.

Sin embargo; el fin de todos es el mismo: la eliminación de las sustancias orgánicas de la muestra a analizar mediante alguna mezcla oxidante y la posterior determinación de los metales mediante una dilución.

Esta técnica generalmente se utiliza en muestras biológicas que presentan gran cantidad de interferentes, sobre todo del tipo orgánico.

Se han utilizado procedimientos de oxidación por vía húmeda mediante ác. nítrico y ác. perclórico, sufriendo la muestra una descomposición inicial con evolución de gases café rojizos (NO_2); posteriormente hay una producción en solución de colores variables (café y amarillos, raramente verdes y rojos). Algunas veces ocurre la carbonización, pero si se alcanza la temperatura apropiada las soluciones se tornan incoloras.

Cuando la materia orgánica es destruida como un paso preliminar para la determinación de elementos trazas, la elección del método dependerá:

a).- De la naturaleza del material orgánico y de cualquier constituyente inorgánico y,

b).- Del metal que será determinado y del método que será usado para su determinación.

La mezcla de oxidantes más usada es: $H_2SO_4-HNO_3-HClO_4$, en nuestro caso la mezcla usada fué: $HNO_3-H_2O_2$, mezcla que pocos autores recomiendan, pero que se usó debido a un menor tiempo de evaporación de la mezcla y menor manipulación.

El procedimiento fué el siguiente:

Se separó la sangre total en plasma y eritrocitos.

Se colocaron 0.5 ml de éstos fluidos en vasos de precipitados de 50 ml

Se les adicionaron 0.5 ml de HNO_3 conc. y se colocaron en el baño de arena a evaporación.

En plena evaporación se les adicionó 1 ml de H_2O_2 (equivalente a 20 gotas), dejándose evaporar a sequedad.

Se sacaron del baño y se les adicionaron 1 a 2 gotas de HNO_3 más una pequeña cantidad de agua para solubilizar los metales y se dejaron enfriar.

Se colocaron en matraces volumétricos de 10 ml y se completó el volumen con agua tridestilada.

Se les determinó la concentración de los metales.

Los datos se muestran en la sección: resultados

3).- Precipitación de protefina: Este método se aplica para eliminar interferencias debidas a proteínas ya que estas sustancias tienen la propiedad de englobar algunos compuestos, debido a las propiedades ácido-básicas que presentan, además de absorber fuertemente en el ultravioleta.

Por consiguiente mediante esta técnica nos aseguramos de eliminar sustancias que tienen efecto sobre la absorción real de la muestra.

Los agentes precipitantes más usados son el ác. tricloroacético y el ác. túngstico. El que se empleó aquí fué el primero.

El fluido analizado por medio de esta técnica fué el plasma. El procedimiento de análisis fué el siguiente:

Se separó el plasma de los eritrocitos mediante la centrifugación de la sangre total.

Se colocó 1.0 ml de plasma en un tubo de ensayo.

Se adicionaron 10 ml de ác. tricloroacético (al 10%)

Se permitió que reposaran 5 min. aprox. hasta sedimentación parcial de las proteínas.

Nuevamente se centrifugó durante 15 min.

Se decantó el sobrenadante en un matraz volumétrico de 10 ml y se completó con agua hasta el aforo.

Se determinaron las concentraciones de los metales.

Los valores obtenidos se muestran en la sección de resultados.

4).- Hemólisis: Los glóbulos rojos son bastante resistentes a ligeros cambios de presión osmótica; pero, si la solución en la cuál bañan es suficientemente hipotónica, adoptan forma esférica y se hinchan. Se produce además otro fenómeno: su membrana es incapaz de retener hemoglobina y esta escapa al líquido coloreándolo.

El fenómeno se denomina hemólisis. Cuando tal hemólisis se produce no toda la sustancia del eritrocito escapa de él, queda una cantidad suficiente para que persista una "sombra de la célula." (19)

La adición de agua y la agitación dentro de un tubo de ensayo de los eritrocitos provoca la hemólisis de estos.

El procedimiento de análisis fué el siguiente:

Se separó el plasma de los eritrocitos mediante centrifugación.

Se colocaron 0.5 ml de eritrocitos en un tubo de ensayo.

Se les adicionaron 4.0 ml de agua, se taparon y agitaron.

Se dejaron sedimentar las membranas aprox. 10 min.

Se decantó el líquido sobrenadante, usando otro tubo de ensayo.

Se realizaron las determinaciones correspondientes.

Los valores obtenidos se muestran en la sección de resultados.

V. RESULTADOS

Antes de presentar los resultados obtenidos, es conveniente conocer algunas características de las personas sobre las que se realizó el estudio.

Desgraciadamente a algunos pacientes del INNN no se les llevó un registro adecuado de sus datos, es por eso que solamente se disponen de los siguientes:

Pacientes del INNN y sus características:

N.º	Sexo	Edad(años)	Enfermedad
1	M	33	Estenosis mitral, epilepsia lóbulo temporal, agresividad.
2	M	41	Esquizofrenia paranoide crónica.
3	M	23	Esquiz. paranoide hebefrénica.
4	M	18	Cliptómano homosexual.
5	M	32	Esquiz. paranoide.
6	M	20	Crisis parciales complejas.
7	M	16	Psicosis tóxica (thinner).
8	M	23	Epilepsia lóbulo temporal.
9	M	15	Esquiz. catatónica.
10	M	30	Alucinosis alcohólica.
11	M	40	Infarto tempo-parietal izq.
12	M	18	Esquizofrenia.
13	M	20	Esquiz. hebefrénica.
14	M	16	Brote psicótico (thinner).
15	M	22	Psicosis tóxico paranoide.
16	M	29	Esquiz. paranoide crónica.

N.º	Sexo	Edad(años)	Enfermedad
17	M	21	Esquizofrenia hebefrénica.
18	M	23	Esquizofrenia.
19	F	71	Psicosis senil secundaria, hipertensión arterial.
20	F	18	Esquizofrenia.
23	F	17	Esquizofrenia hebefrénica.
24	F	32	Neurosis.
25	F	19	Esquizofrenia hebefrénica.
27	F	20	Psicosis maníaco-depresiva.
28	F	17	Esquizofrenia paranoide.
29	F	40	Esquizofrenia paranoide.
32	F	38	Esquizofrenia paranoide.
35	F	53	Leve atrofia cortical, brote psicótico.

Sujetos normales y sus características:

N.º	Sexo	Edad(años)	Peso(Kg)	Grupo sanguíneo
1	M	27	74	O ⁺
2	M	27	60	-
3	M	38	58.5	B ⁺
4	M	28	69	-
5	M	35	55.7	-
6	F	40	66.7	-
7	M	19	90.5	-
8	M	20	51	A ⁺
9	M	35	75	O ⁺
10	M	37	60	A ⁺
11	M	23	63	-
12	M	18	58	-
13	M	21	60	O ⁺
14	M	21	59	O ⁺
15	M	21	62	A ⁺
16	M	52	75	O ⁺
17	M	39	62	B ⁺
18	M	27	59	O ⁺
19	M	33	75	O ⁺
20	M	52	65	O ⁺
21	M	21	75	O ⁺
22	M	23	75	A ⁺
23	M	21	59	-

N ^o	Sexo	Edad(años)	Peso(Kg)	Grupo sanguineo
24	M	34	65	-
25	M	26	60	-
26	M	27	80	A ⁺
27	M	29	69	O ⁺
28	M	29	92	O ⁺
29	M	34	70	O ⁺
30	M	35	62	O ⁺
31	M	29	106	O ⁺
32	M	32	60	O ⁺
33	M	24	75	A ⁺
34	M	22	64	-
35	M	22	94	-
37	M	28	90	A ⁺
38	M	33	95	O ⁺
39	M	33	68	O ⁺
40	M	27	56	O ⁺
41	M	30	80	O ⁺

Después de haber mencionado las características de los sujetos bajo estudio se muestran los resultados obtenidos, haciendo hincapié en lo siguiente: el número de muestra descrito corresponde exactamente al número de paciente ó sujeto normal, según sea el caso, y se encuentra en la primera columna de la sección de resultados. La segunda columna corresponde a la concentración del metal sin tomar en consideración el factor de dilución, es decir la concentración registrada directamente en el espectrofotómetro de absorción atómica.

La tercera columna nos muestra la concentración final del metal al considerar la dilución.

Todas las concentraciones están expresadas en partes por millón (ppm).

Resultados.

Determinación de cobre en plasma en sujetos normales.

Muestra N.º	Método: Dilución	Dilución 1:9
	Cu(ppm)	Cu(ppm)
1	0.075	0.675
2	0.080	0.720
3	0.080	0.720
4	0.085	0.765
5	0.075	0.675
6	0.080	0.720
7	0.080	0.720
8	0.085	0.765
9	0.080	0.720
10	0.070	0.630
11	0.080	0.720
12	0.060	0.540
13	0.070	0.630
14	0.065	0.575
15	0.100	0.900
16	0.080	0.720
17	0.085	0.765
18	0.070	0.630
19	0.080	0.720
20	0.095	0.855
21	0.080	0.720
22	0.070	0.630

Muestra N.º	Cu (ppm)	Cu (ppm)
23	0.070	0.630
24	0.070	0.630
25	0.065	0.575

Resultados.

Determinación de cobre en plasma en sujetos normales.

Método: Precipitación de proteína Dilución 1:10

Muestra N.º	Cu(ppm)	Cu(ppm)
1	0.11	1.10
2	0.11	1.10
3	0.12	1.20
4	0.09	0.90
5	0.11	1.10
7	0.14	1.40
8	0.11	1.10
9	0.10	1.00
10	0.16	1.60
11	0.13	1.30
12	0.12	1.20
13	0.10	1.00
14	0.09	0.90
15	0.12	1.20
16	0.14	1.40
17	0.12	1.20
18	0.13	1.30
19	0.14	1.40
20	0.13	1.30
21	0.12	1.20
22	0.11	1.10

Muestra N.º	Cu(ppm)	Cu(ppm)
23	0.12	1.20
24	0.14	1.40
25	0.13	1.30

Resultados.

Determinación de cobre en eritrocitos en sujetos normales.

Método: Destrucción de materia orgánica. Dilución 1:20

Muestra N.º	Cu(ppm)	Cu(ppm)
1	0.07	1.40
2	0.06	1.20
3	0.05	1.00
4	0.06	1.20
5	0.05	1.00
6	0.07	1.40
7	0.05	1.00
8	0.06	1.20
9	0.05	1.00
10	0.08	1.60
11	0.05	1.00
12	0.05	1.00
13	0.05	1.00
14	0.04	0.80
15	0.08	1.60
16	0.05	1.00
17	0.07	1.40
18	0.05	1.00
19	0.06	1.20
20	0.05	1.00
21	0.05	1.00

Muestra N.º	Cu(ppm)	Cu(ppm)
22	0.07	1.40
23	0.06	1.20
24	0.04	0.80
25	0.06	1.20
26	0.04	0.80
27	0.06	1.20
28	0.05	1.00
29	0.05	1.00
30	0.05	1.00
31	0.04	0.80
32	0.05	1.00
33	0.05	1.00
34	0.05	1.00
35	0.05	1.00
36	0.05	1.00

Resultados.

Determinación de zinc en eritrocitos en sujetos normales.

Método: Hemólisis		Dilución 1:9
Muestra N.º	Zn(ppm)	Zn(ppm)
1	0.95	8.55
2	1.03	9.27
3	0.92	8.28
4	1.10	9.90
5	1.03	9.27
6	1.14	10.26
7	0.83	7.47
8	1.09	9.81
9	1.10	9.90
10	0.88	7.92
11	0.92	8.28
12	1.09	9.81
13	1.14	10.26
14	1.01	9.09
15	0.95	8.55
16	1.10	9.90
17	0.90	8.10
18	1.10	9.90
19	1.12	10.08
20	1.17	10.53
21	1.10	9.90
22	0.90	8.10

Muestra N°	Zn(ppm)	Zn(ppm)
23	1.13	10.17
24	1.05	9.45
25	1.14	10.26

Resultados.

Determinación de zinc en plasma en sujetos normales.

Método: Precipitación de protefina Dilución 1:10

Muestra N.º	Zn(ppm)	Zn(ppm)
1	0.08	0.80
2	0.12	1.20
3	0.13	1.30
4	0.11	1.10
5	0.19	1.90
7	0.06	0.60
8	0.09	0.90
9	0.10	1.00
10	0.18	1.80
11	0.09	0.90
12	0.10	1.00
13	0.12	1.20
14	0.13	1.30
15	0.12	1.20
16	0.13	1.30
17	0.13	1.30
18	0.13	1.30
19	0.20	2.00
20	0.11	1.10
21	0.19	1.90
22	0.09	0.90
23	0.20	2.00
24	0.10	1.00
25	0.15	1.50

Resultados.

Determinación de zinc en eritrocitos en sujetos normales.

Método: Destrucción de materia orgánica Dilución 1:20

Muestra N.º	Zn(ppm)	Zn(ppm)
1	0.70	14.00
2	0.65	13.00
3	0.46	9.20
4	0.54	10.80
5	0.72	14.40
6	0.50	10.00
7	0.50	10.00
8	0.60	12.00
9	0.45	9.00
10	0.60	12.00
11	0.55	11.00
12	0.48	9.60
13	0.50	10.00
14	0.50	10.00
15	0.76	15.20
16	0.51	10.20
17	0.59	11.80
18	0.51	10.20
19	0.48	9.60
20	0.60	12.00
21	0.53	10.60
22	0.46	9.20

Muestra N ^o	Zn(ppm)	Zn(ppm)
23	0.55	11.00
24	0.45	9.00
25	0.50	10.00
26	0.48	9.60
27	0.55	11.00
28	0.48	9.60
29	0.45	9.00
30	0.56	11.20
31	0.45	9.00
32	0.46	9.20
33	0.47	9.40
34	0.55	11.00
35	0.48	9.60
36	0.52	10.40

Resultados.

Determinación de cobre en plasma en pacientes de Psiquiatría del INNN.

Método: Dilución		Dilución 1:20
Muestra N.º	Cu(ppm)	Cu(ppm)
1	0.110	2.20
2	0.075	1.50
3	0.065	1.30
4	0.048	0.96
5	0.055	1.10
6	0.082	1.64
7	0.052	1.04
8	0.055	1.10
9	0.055	1.10
10	0.040	0.80
11	0.065	1.30
12	0.055	1.10
13	0.048	0.96
14	0.065	1.30
15	0.063	1.26
16	0.087	1.74
17	0.068	1.36
18	0.080	1.60
19	0.059	1.18
20	0.058	1.16
23	0.058	1.16

Muestra N.º	Cu (ppm)	Cu (ppm)
24	0.070	1.40
25	0.058	1.16
27	0.062	1.24
28	0.062	1.24
29	0.068	1.36
32	0.055	1.10
35	0.090	1.80

Resultados.

Determinación de cobre en plasma en pacientes del INNN.

Método: Destrucción de materia orgánica Dilución: 1:12

Muestra N.º	Cu(ppm)	Cu(ppm)
1	0.14	1.68
2	0.12	1.44
3	0.13	1.56
4	0.10	1.20
5	0.09	1.08
7	0.10	1.20
8	0.12	1.44
9	0.11	1.31
10	0.09	1.08
11	0.14	1.68
12	0.09	1.08
13	0.10	1.20
14	0.14	1.68
15	0.13	1.56
16	0.12	1.44
17	0.13	1.56
18	0.14	1.68
19	0.11	1.32
20	0.12	1.44
21	0.10	1.20
22	0.11	1.32

Muestra N.º	Cu(ppm)	Cu(ppm)
23	0.10	1.20
24	0.12	1.44
25	0.14	1.68
27	0.10	1.20
28	0.12	1.44
29	0.11	1.32
30	0.10	1.20
31	0.09	1.08
32	0.09	1.08
33	0.10	1.20
34	0.13	1.56
35	0.11	1.32
36	0.11	1.32
38	0.09	1.08
39	0.13	1.56
40	0.09	1.08
41	0.10	1.20

Resultados.

Determinación de cobre en eritrocitos en pacientes del INNN.

Método: Hemólisis

Dilución 1:9

Muestra N.º	Cu(ppm)	Cu(ppm)
1	0.11	0.99
2	0.11	0.99
3	0.09	0.81
4	0.11	0.99
5	0.11	0.99
6	0.10	0.90
7	0.11	0.99
8	0.10	0.90
9	0.10	0.90
10	0.10	0.90
11	0.10	0.90
12	0.11	0.99
13	0.12	1.08
14	0.12	1.08
15	0.11	0.99
16	0.10	0.90
17	0.11	0.99
19	0.09	0.91
20	0.12	1.08
23	0.09	0.81
24	0.08	0.72

Muestra N.º	Cu(ppm)	Cu(ppm)
25	0.10	0.90
27	0.09	0.81
28	0.09	0.81
29	0.08	0.72
32	0.09	0.81
35	0.10	0.90

Resultados.

Determinación de zinc en eritrocitos en pacientes del INNN.

Método: Hemólisis

Dilución 1:9

Muestra N.º	Zn(ppm)	Zn(ppm)
1	1.48	13.32
2	1.35	12.15
3	1.48	13.32
4	1.28	11.52
5	1.37	12.33
6	1.22	10.98
7	1.31	11.79
8	1.39	12.51
9	1.22	10.98
10	1.41	12.69
11	1.60	14.40
12	1.29	11.61
13	1.29	11.61
14	1.36	12.24
15	1.15	10.35
16	1.23	11.07
17	1.02	9.18
19	1.31	11.79
20	1.17	10.53
23	1.13	10.17
24	1.57	14.13

Muestra N.º	Zn(ppm)	Zn(ppm)
25	1.21	10.89
27	0.92	8.28
28	0.95	8.55
29	1.55	13.95
32	1.33	11.97
35	1.29	11.61

Resultados.

Determinación de zinc en plasma en pacientes del INNN.

Método: Dilución

Dilución 1:20

Muestra N ^o	Zn(ppm)	Zn(ppm)
1	0.025	0.50
2	0.100	2.00
3	0.095	1.90
4	0.085	1.70
5	0.035	0.70
6	0.045	0.90
7	0.055	1.10
8	0.050	1.00
9	0.110	2.20
10	0.120	2.40
11	0.040	0.80
12	0.045	0.90
13	0.050	1.00
14	0.050	1.00
15	0.070	1.40
16	0.090	1.80
17	0.080	1.60
18	0.100	2.00
19	0.090	1.80
20	0.110	2.20
23	0.040	0.80
24	0.060	1.20

Muestra N.º	Zn(ppm)	Zn(ppm)
25	0.085	1.70
27	0.075	1.50
28	0.070	1.40
29	0.045	0.90
32	0.055	1.10
35	0.060	1.20

Tratamiento estadístico de los datos.(20). Se efectuó un tratamiento estadístico de los valores obtenidos, pues la estadística está ligada con los métodos científicos en la toma, organización, recopilación, presentación y análisis de datos, tanto para la deducción de conclusiones como para tomar decisiones razonables de acuerdo con tales análisis.

En nuestro caso en base a los resultados estadísticos obtenidos deduciremos algunas conclusiones.

Así pues para comenzar debemos simbolizar todas las variables estadísticas y sus expresiones matemáticas que utilizaremos a lo largo del análisis.

Variables estadísticas.

f_i = frecuencia del intervalo de clase.

f_a = frecuencia acumulada de los intervalos de clase.

m_c = marca de clase ó punto medio del intervalo de clase.

\bar{X} = media aritmética.

S_x^2 = varianza.

S_x = desviación estándar.

C.V. = coeficiente de variación.

C.C. = coeficiente de correlación.

X_j = edades de los sujetos bajo estudio.

Y_j = concentración del elemento (en ppm).

Σ = símbolo usado para designar la suma de cualquier variable.

\bar{x}, \bar{y} = puntos donde pasa la recta de mínimos cuadrados.

b = valor de la intersección de la recta con el eje de las ordenadas.

m = valor de la pendiente de la recta.

Expresiones matemáticas.

$$\bar{X} = \frac{\sum f_i m_c}{\sum f_i}$$

$$S_x^2 = \frac{\sum f_i m_c^2}{\sum f_i} - \left(\frac{\sum f_i m_c}{\sum f_i} \right)^2$$

$$S_x = (S_x^2)^{1/2} \quad \text{C.V.} = S_x / \bar{X}$$

$$\text{C.C.} = \frac{N \sum X_j Y_j - \sum X_j \sum Y_j}{(N \sum X_j^2 - (\sum X_j)^2) (N \sum Y_j^2 - (\sum Y_j)^2)^{1/2}}$$

$$\bar{x} = \sum X_j / N$$

$$\bar{y} = \sum Y_j / N$$

$$m = \frac{N \sum X_j Y_j - (\sum X_j)(\sum Y_j)}{N \sum X_j^2 - (\sum X_j)^2}$$

Recta de mínimos cuadrados: $y - \bar{y} = m(x - \bar{x})$

Ejemplificaremos la aplicación de la estadística en la determinación que se llevó a cabo de cobre en plasma mediante precipitación de proteínas (sujetos normales).

Posteriormente tabularemos todos los resultados de las de terminaciones realizadas por todos los métodos.

Intervalos:	f_i	f_a	m_c	$f_i m_c$	m_c^2	$f_i m_c^2$
0.9 - 1.016	4	4	0.958	3.83	0.917	3.668
1.017 - 1.133	5	9	1.075	5.37	1.155	5.775
1.134 - 1.250	6	15	1.192	7.15	1.420	8.520
1.251 - 1.367	4	19	1.309	5.23	1.713	6.852
1.368 - 1.484	4	23	1.426	5.70	2.033	8.132
1.485 - 1.601	1	24	1.543	1.54	2.380	2.380
	<u>24</u>			<u>28.82</u>		<u>35.327</u>

$$\sum f_i = 24$$

$$\sum f_i m_c = 28.82$$

$$\sum f_i m_c^2 = 35.327$$

$$\bar{X} = \frac{28.82}{24} = 1.20$$

$$S_x^2 = \frac{35.327}{24} - \left(\frac{28.82}{24} \right)^2 = 0.031$$

$$S_x = (0.031)^{1/2} = 0.176 \quad \bar{X} \pm S_x = 1.20 \pm 0.176$$

$$C.V. = 0.176/1.20 = 0.146$$

Ahora haremos una relación entre la edad de los sujetos y la concentración del metal.

Para esto nos será útil la tabla donde se listan los sujetos normales y sus características, entre ellas, la edad.

Cabe hacer hincapié en que el estudio estadístico también puede establecerse entre la concentración del elemento y los pesos de los sujetos, en nuestro caso se establecerá con la edad de los mismos.

La tabla quedaría de la siguiente manera:

Yj	Xj (edad en años)														
Cu(ppm)	18	19	20	21	23	26	27	28	33	34	35	37	38	39	52
1.60												1			
1.40		1							1	1					1
1.30					1	1	1								1
1.20	1			3									1	1	
1.10			1		1		2				1				
1.00				1							1				
0.90				1				1							
	1	1	1	5	2	1	3	1	1	1	2	1	1	1	2

Aquí $N = 24$

$$\begin{aligned} \sum X_j &= 1(18) + 1(19) + 1(20) + 5(21) + 2(23) + 1(26) + 3(27) \\ &+ 1(28) + 1(33) + 1(34) + 2(35) + 1(37) + 1(38) + 1(39) + 2(52) \\ &= 698 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \sum X_j^2 &= 1(18)^2 + 1(19)^2 + 1(20)^2 + 5(21)^2 + 2(23)^2 + 1(26)^2 \\ &+ 3(27)^2 + 1(28)^2 + 1(33)^2 + 1(34)^2 + 2(35)^2 + 1(37)^2 + 1(38)^2 \end{aligned}$$

$$+ 1(39)^2 + 2(52)^2 = 22432$$

$$\sum Y_j = 2(0.90) + 2(1.0) + 5(1.10) + 6(1.20) + 4(1.30) + 4(1.40) + 1(1.60) = 28.9$$

$$\sum Y_j^2 = 2(0.90)^2 + 2(1.0)^2 + 5(1.10)^2 + 6(1.20)^2 + 4(1.30)^2 + 4(1.40)^2 + 1(1.60)^2 = 35.47$$

$$\sum (X_j Y_j) = 18(1.20) + 19(1.40) + 20(1.10) + 21(0.90+1.0+3.6) + 23(1.10+1.30) + 26(1.30) + 27(2.20+1.30) + 28(0.90) + 33(1.40) + 34(1.40) + 35(1.0+1.10) + 37(1.60) + 38(1.20) + 39(1.20) + 52(1.30+1.40) = 853.7$$

$$C.C. = \frac{24(853.7) - 698(28.9)}{(24(22432) - (698)^2) (24(35.47) - (28.9)^2)^{1/2}}$$

$$= 0.34$$

$$\bar{x} = 698/24 = 29.08$$

$$\bar{y} = 28.9/24 = 1.204$$

$$m = \frac{24(853.7) - 698(28.9)}{24(22432) - (698)^2} = 0.0061$$

De la ecuación de la recta: $y - \bar{y} = m(x - \bar{x})$

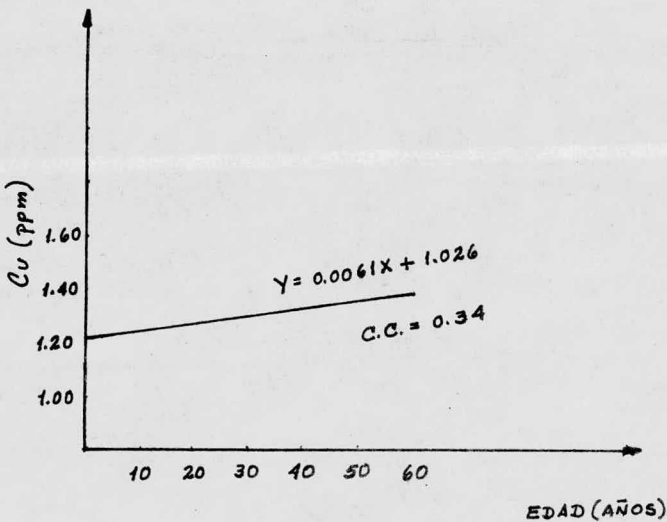
$$y - 1.204 = 0.0061(x - 29.08) ; y = 0.0061x + 1.026$$

El C.C. lineal mide la divergencia entre dos variables ;

tiene valores comprendidos entre -1 y $+1$, en el primer caso la correlación lineal entre dos variables es negativa y en el segundo caso es positiva. Cuando el C.C. = 0 no hay ninguna relación entre las variables, y éste aumenta a medida que el valor es más cercano a -1 ó a $+1$ según el caso.

El valor 0.34 obtenido anteriormente implica una correlación positiva pero bastante imperfecta entre ambas variables.

En forma gráfica la ecuación sería la siguiente:



A continuación los datos obtenidos se resumen en dos tablas, en las cuáles se incluyen los parámetros estadísticos principales para cada uno de los métodos desarrollados.

Finalmente se muestran las distribuciones de frecuencia, las cuáles consisten de una serie de rectángulos que tienen sus bases sobre un eje horizontal, con centros en las marcas de clase y longitud igual al tamaño de los intervalos de clase.

Es preferible en algunas ocasiones usar frecuencias relativas; en este caso las gráficas resultantes muestran una distribución porcentual de la variable bajo estudio.

Aquí se muestran las frecuencias relativas en el eje de las ordenadas y en el de las abscisas las concentraciones del elemento dado.

RESULTADOS

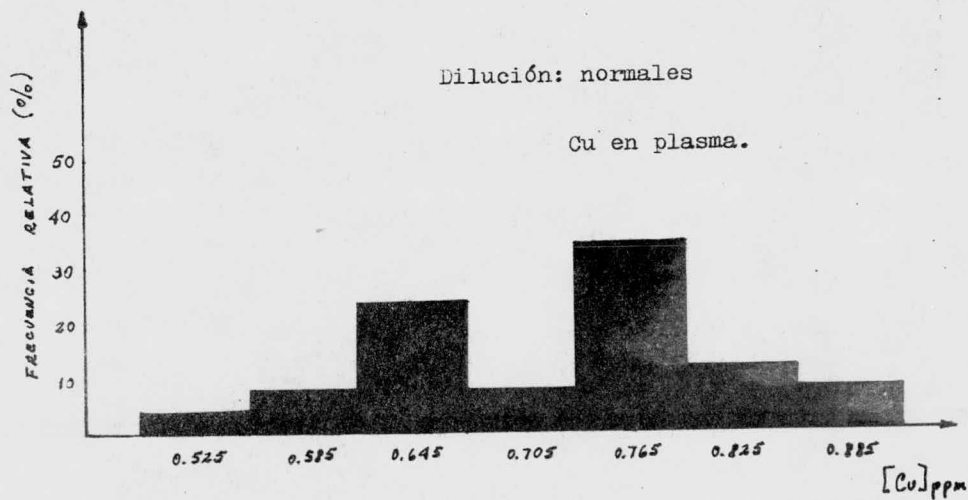
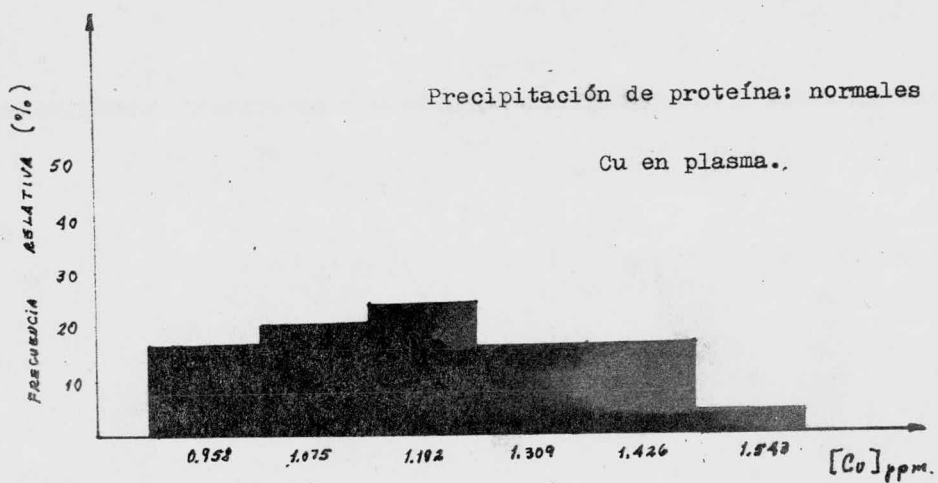
SUJETOS NORMALES

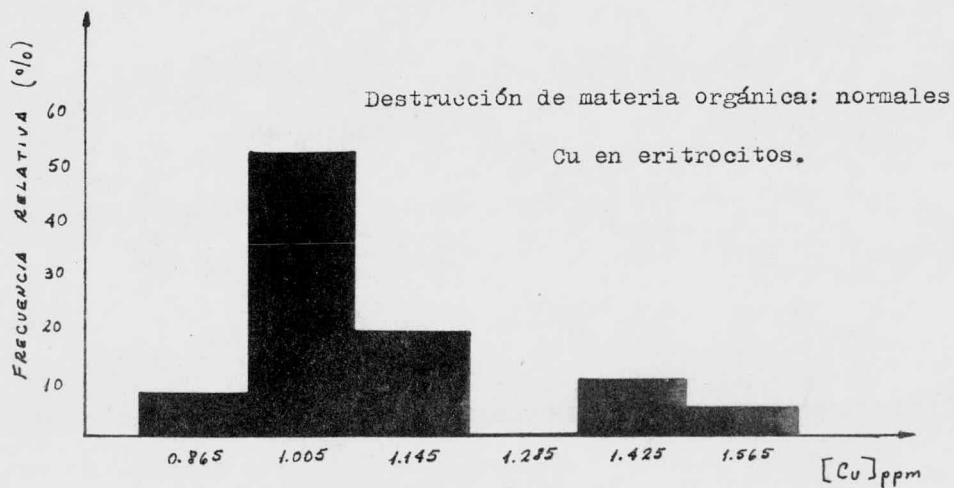
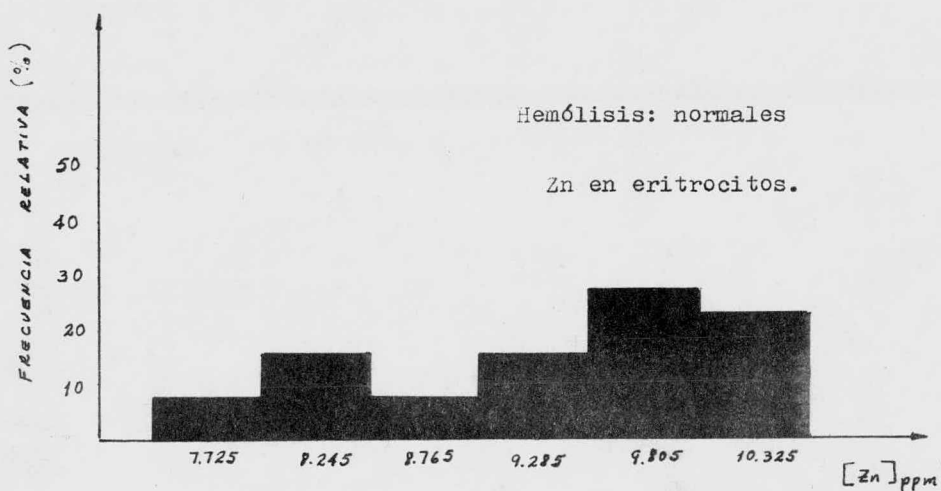
VARIABLES ESTADISTICAS	Cu PLASMA (DILUCION)	Cu PLASMA (PREC. PROTEINA)	Cu ERITROCITOS (D.M.O.)	Zn ERITROCITOS (HEMOLISIS)	Zn PLASMA (PREC. PROTEINA)	Zn ERITROCITOS (D.M.O.)
$\sum f_i = N$	25	24	35	25	24	35
\bar{X}	0.694	1.204	1.097	9.32	1.27	10.64
S_x^2	0.0066	0.031	0.042	0.77	0.148	2.454
S_x	0.083	0.176	0.208	0.89	0.393	1.589
$\bar{X} \pm S_x$	0.694 \pm 0.083	1.20 \pm 0.176	1.097 \pm 0.208	9.32 \pm 0.89	1.27 \pm 0.393	10.64 \pm 1.589
C.V.	0.119	0.146	0.189	0.095	0.309	0.149
C.C.	0.329	0.34	0.030	0.163	0.152	0.0051
\bar{x}	29.52	29.08	29.17	29.52	29.08	29.17
\bar{y}	0.694	1.204	1.097	9.320	1.27	10.64
m	0.0028	0.0061	0.00074	0.015	0.0062	0.00096
ECUACION RECTA.	$y = 0.0028x + 0.61$	$y = 0.0061x + 1.026$	$y = 0.00074x + 1.075$	$y = 0.015x + 8.87$	$y = 0.0062x + 1.089$	$y = 0.00096x + 10.61$

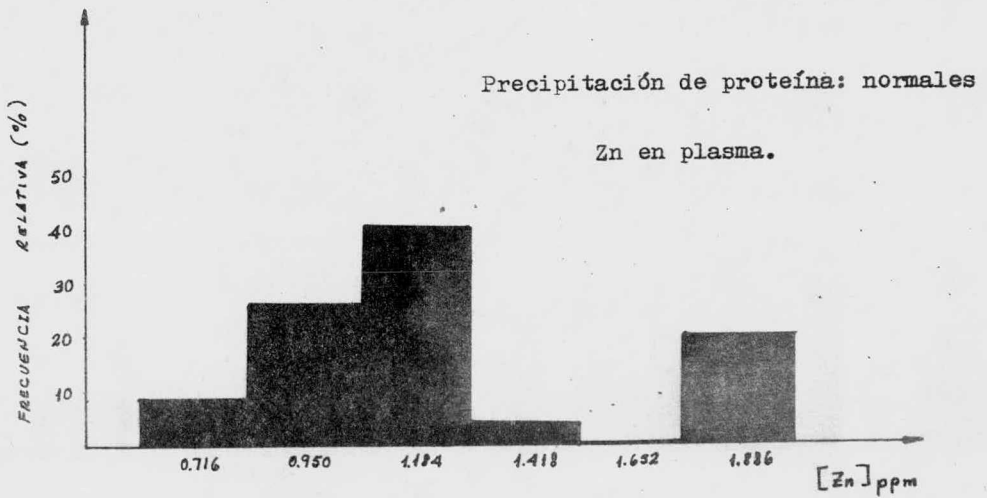
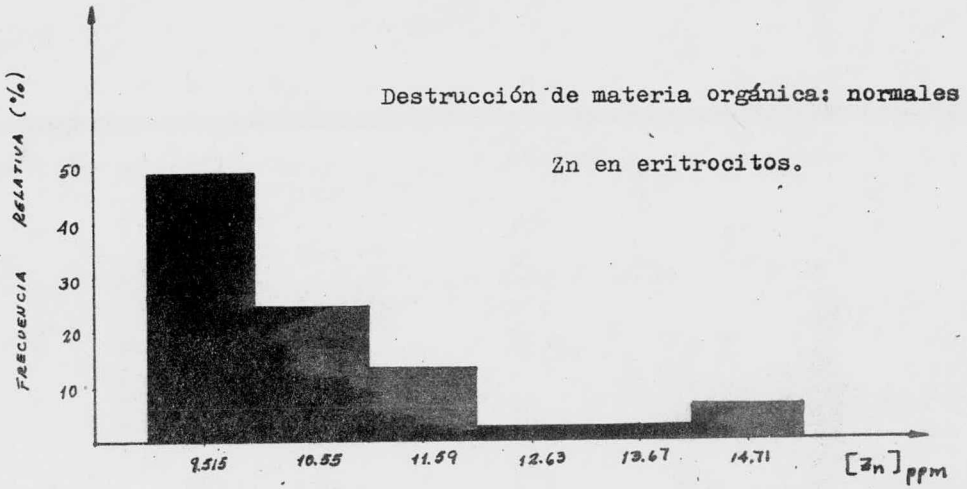
RESULTADOS

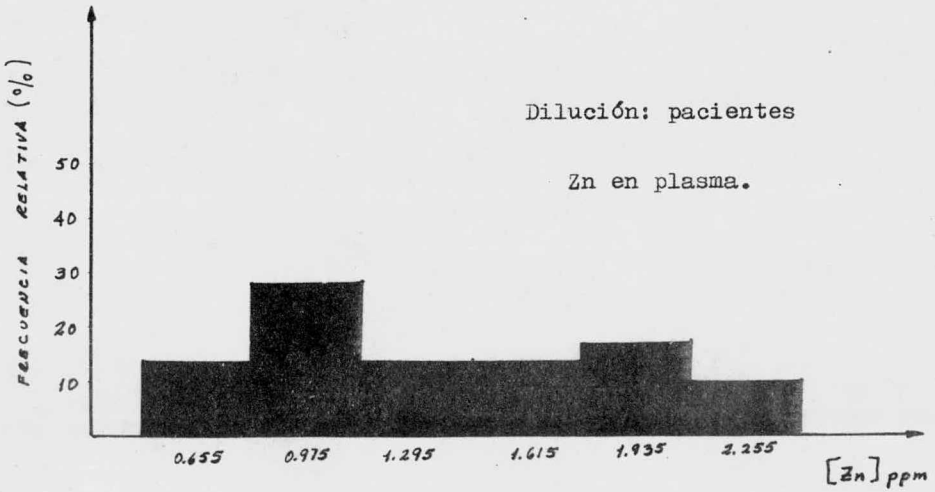
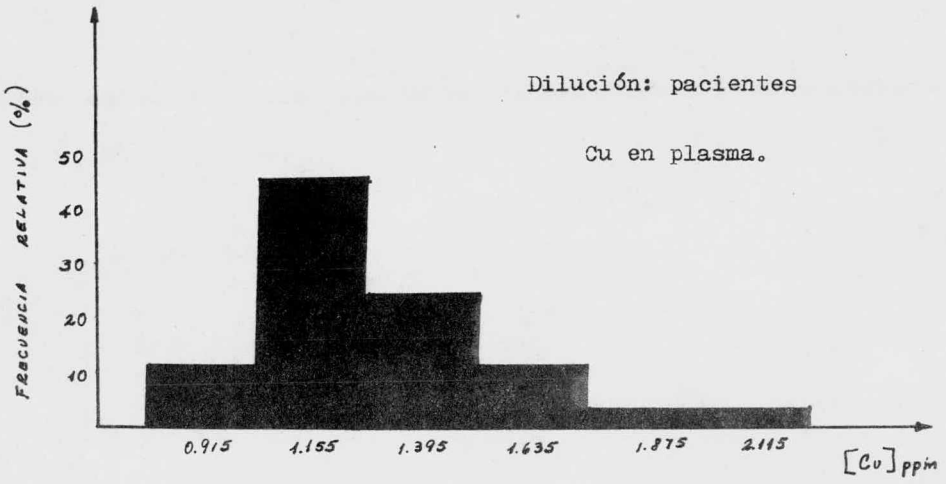
PACIENTES INNN

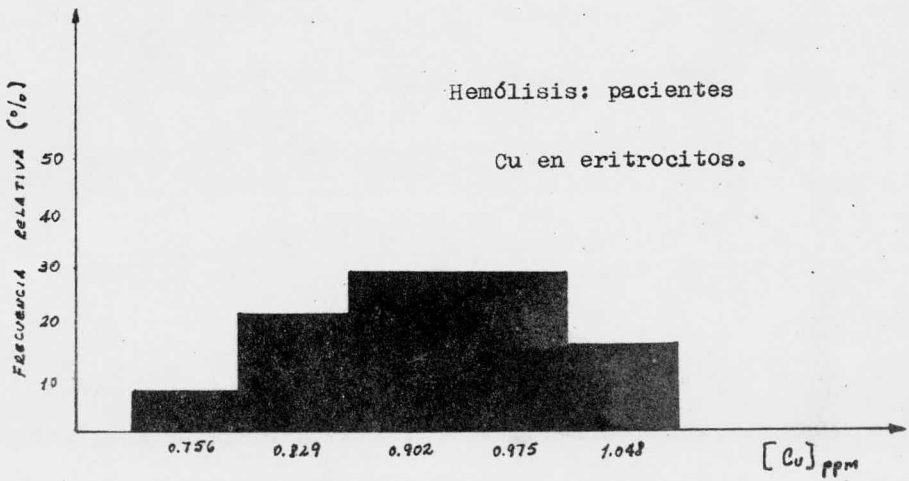
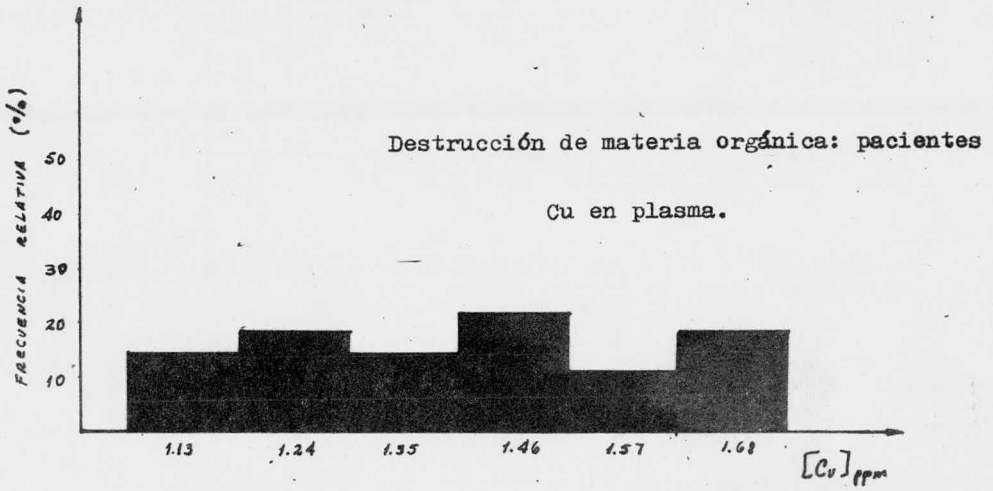
VARIABLES ESTADÍSTICAS	Cu PLASMA (DILUCION)	Cu PLASMA (D.M.O.)	Cu ERITROCITOS (HEMOLISIS)	Zn ERITROCITOS (HEMOLISIS)	Zn PLASMA (DILUCION)
$\sum f_i = N$	28	27	27	27	28
\bar{X}	1.29	1.38	0.917	11.62	1.38
S_x^2	0.083	0.041	0.0096	2.28	0.260
S_x	0.294	0.206	0.099	1.539	0.520
$\bar{X} \pm S_x$	1.29 ± 0.294	1.38 ± 0.206	0.917 ± 0.099	11.62 ± 1.539	1.38 ± 0.520
C.V.	0.227	0.149	0.108	0.132	0.376
C.C.	0.27	- 0.029	- 0.217	0.404	- 0.026
\bar{x}	27.32	27.59	27.48	27.48	27.32
\bar{y}	1.29	1.38	0.917	11.62	1.38
m	0.0061	- 0.00045	- 0.0016	0.047	- 0.0010
ECUACION RECTA	$y = 0.0061x + 1.12$	$y = -0.00045x + 1.39$	$y = -0.0016x + 0.96$	$y = 0.047x + 10.32$	$y = -0.0010x + 1.41$

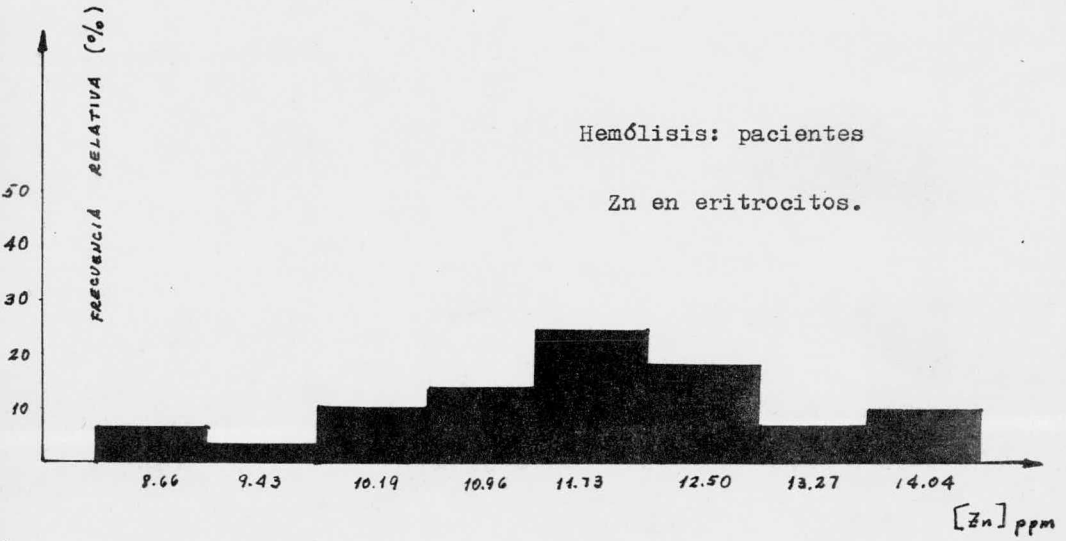












VI. RESUMEN Y CONCLUSIONES

En base al trabajo realizado, podemos hacer las siguientes consideraciones:

1. La técnica de Espectroscopía de Absorción Atómica es de gran utilidad para la determinación de trazas de cobre y zinc en material biológico.
2. Para la eliminación de materia orgánica en este tipo de material biológico, se recomienda el uso de la mezcla $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$ debido a su poder oxidante y la rapidez con que se efectúan las oxidaciones.
3. En la precipitación de las proteínas con ácido tricloroacético como agente precipitante, no se presentan mayores problemas.
4. Antes de enfocarnos en los resultados obtenidos, es necesario conocer los valores que menciona la literatura, como una base de comparación respecto a los nuestros.
(Se mencionan como parámetros la $\bar{X} \pm S_x$, en ppm)

Valores encontrados en la literatura (21,22,23,24) para cobre y zinc en plasma y eritrocitos humanos.

Cu(plasma)	Zn(plasma)	Cu(erit.)	Zn(erit.)
1.19(0.94-1.44)	1.22 \pm 0.32	1.15 \pm 0.32	14.4(9-19.8)
0.70-1.40	0.96 \pm 0.13	0.90	14.00
1.09 \pm 0.17	0.55-1.50	1.15 \pm 0.22	8.6-16.1
1.16	1.21 \pm 0.19	0.89 \pm 0.085	12.0-13.0
1.05-1.10	0.98	-	10.7-28.5
1.06 \pm 0.15	1.20	-	14.4 \pm 2.70
-	0.90 \pm 0.103	-	-

Desafortunadamente, la mayoría de los datos provienen de citas bibliográficas que no especifican el método utilizado para la obtención de dichos datos, sin embargo se puede observar que los datos son bastante concordantes entre sí.

Cabe aclarar que los datos anteriores son de sujetos normales exclusivamente.

A continuación se muestran los resultados obtenidos en este trabajo, especificando los mismos parámetros estadísticos.

Valores experimentales para cobre y zinc en plasma y eritrocitos humanos.

Cu(plasma)	Zn(plasma)	Cu(erit.)	Zn(erit.)
0.72 \pm 0.11 ^a	1.24 \pm 0.36 ^c	1.094 \pm 0.18 ^d	9.34 \pm 0.84 ^b

Cu(plasma)	Zn(plasma)	Cu(erit.)	Zn(erit.)
1.20 ± 0.17^c	1.30 ± 0.68^a	0.91 ± 0.10^b	10.42 ± 2.19^d
1.30 ± 0.27^a	-	-	11.64 ± 1.50^b
1.37 ± 0.18^d	-	-	-

Donde:

a = dilución normales.

a. = dilución pacientes.

b = hemólisis normales.

b. = hemólisis pacientes.

c = precipitación de proteína normales.

c. = precipitación de proteína pacientes.

d = destrucción de materia orgánica normales.

d. = destrucción de materia orgánica pacientes.



Por vía comparativa, podemos decir que:

4.1. Todos los valores obtenidos por los diferentes métodos caen dentro de los valores reportados en la literatura.

4.2. En la literatura se reportan mayores niveles de cobre en pacientes nerviosos que en personas normales. Esto sucede en la mayoría de nuestros casos, excepto en cobre en eritrocitos por hemólisis.

Es necesario tomar en cuenta que los resultados reportados en la literatura son de otros Países (principalmente de EE.UU.),

y que las diferencias en los niveles normales pueden manifestarse por causas diversas, desde la dieta hasta la vida social en los diferentes Países.

4.3. Los valores obtenidos para zinc en pacientes son menores que en personas normales, en contradicción a lo que se menciona en la literatura; en este caso lo que se aceptó por " normales " fueron donadores de sangre que podrían tener problemas de tipo orgánico ó metabólico, no detectables por los métodos tradicionales usados.

5. En general las desviaciones estándar obtenidas no fueron considerables, ésto posiblemente se debió a que existía cierta homogeneidad en el grupo bajo estudio.

6. Las curvas de ajuste obtenidas por todos los métodos, son aplicables con mayor validez en el intervalo de tiempo considerado (edades de los sujetos bajo estudio). En general la concentración del metal varía muy poco en relación a la edad.

7. En base a lo expuesto anteriormente y para determinaciones futuras, es posible preferentemente elegir alguno de los métodos de análisis propuestos. Considero que el método de dilución es el más apropiado, pues, al no incorporar sustancias

ajenas a la muestra, se evita la posibilidad de cualquier tipo de interferencia. Y es además, un método rápido y fácil de realizar.

En un futuro no muy lejano, la investigación de los elementos trazas ocupará un lugar preponderante en el desarrollo humano. Día a día las necesidades a cualquier nivel exigen el cuanteo de éstos elementos en diferentes tipos de materiales, indudablemente para solventar dichas necesidades recurriremos a un amigo: la Espectroscopía de Absorción Atómica.

VII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Schroeder, H.A. and Tipton, I.H., Metal binding in Medicine, Seven, M.J. and Johnson, L.A. Eds., Lippincott, Pha. 1960.
- 2.- Weissman, N., Pileggi, V.J. Inorganic Ions. Clinical Chemistry, Principles and Technics. Chap. 19, Harper and Row Publishers, Inc. 1974.
- 3.- Cartwright, G.E. and Wintrobe, M.M. Perspectives in Nutrition. Copper metabolism in normal subjects. American Journal of Clinical Nutrition. 14, 224-232 (1964).
- 4.- Neumann, P.Z. and Sass-Kortsak, A. The state of copper in human serum: Evidence for an amine acid-bound fraction. Journal of Clinical Investigation. 46, 4, 646-658 (1967).
- 5.- Markowitz, H., Cartwright, G.E. and Wintrobe, M.M. Studies on copper metabolism. XXVII. The isolation and properties of an erythrocyte cuproprotein (erythrocuprein). J. Biol. Chem., 234, 1, 40-45 (1959).
- 6.- Kimmel, J.R., Markowitz, H. and Brown, D.M. Some chemical and physical properties of erythrocuprein. J. Biol. Chem. 234, 1, 46-50 (1959).
- 7.- Heyroth, F.F. Copper in Biology. The Science and Technology of the metal, its alloys and compounds. Chap. 43, Reinhold Pub. Corp. N.Y. 1954.
- 8.- Halsted, J.A. and Smith, J.C. Plasma zinc in health and disease. The Lancet. 322-324, february 14, 1970.

- ✓ 9.- Schroeder, H.A. and Nason, A.P. Trace-element analysis in Clinical Chemistry. Clinical Chemistry. 17, 6, 461-474 (1971).
- ✓ 10.- Robinson, J.W., Atomic Absorption Spectroscopy. Analytical Chemistry. 32, 8, 17A-29A (1960).
- ✓ 11.- Kahn, H. Instrumentación para Espectrofotometría de Absorción Atómica. The Perkin Elmer Corp. pags. 1-18
- ✓ 12.- Menzies, A.C., A study of Atomic Absorption Spectroscopy. Analytical Chemistry. 32, 8, 898-904 (1960).
- ✓ 13.- Willard, H.H., Merritt, L.L. and Dean, J.A., Instrumental Methods of Analysis. Fourth Ed. D. Van Nostrand Co. 1965.
- 14.- Manual Perkin-Elmer. Model 360/370, Atomic Absorption Spectrophotometer. July, 1975.
- ✓ 15.- Analytical Methods Committee. Methods for the destruction of organic matter. 85, 643-656 (1960).
- ✓ 16.- Martinie, G.D. and Schilt, A.A. Investigation of the wet oxidation efficiencies of perchloric acid mixtures for various organic substances and the identities of residual matter. Analytical Chemistry. 48, 1, 70-74 (1976).
- ✓ 17.- Christian, G.D. Medicine, trace elements, and Atomic Absorption Spectroscopy. Analytical Chemistry. 41, 1, 24A-40A (1969).

- ✓ 18.- Ham, A.W., Tratado de Histología, 7^a ed., Edit. Interamericana, 1975.
- 19.- Spiegel, M.R., Estadística. McGraw-Hill Book, Co. 1970.
- ✓ 20.- Parker, M.M., Humoller, F.L. and Mahler, D.J. Determination of copper and zinc in biological material. Clinical Chemistry. 13, 1, 40-48 (1967).
- ✓ 21.- Dawson, J.B., Ellis, D.J. and Newton-John H. Direct estimation of copper in serum and urine by Atomic Absorption Spectroscopy. Clinica Chimica Acta. 21, 33-42 (1968).
- ✓ 22.- Prasad, A.S., Oberleas, D. and Halsted, J.A. Determination of zinc in biological fluids by Atomic Absorption Spectrophotometry in normal and cirrhotic subjects. J. Lab. Clin. Med. 66, 3, 508-516 (1965).
- ✓ 23.- Hackley, B.M., Smith, J.C. and Halsted, J.A. A simplified method for plasma zinc determination by Atomic Absorption Spectrophotometry, Clinical Chemistry. 14, 1, 1-5 (1968).
- ✓ 24.- Markowitz, H. et al. Spectrophotometric determination of total erythrocyte copper. Analytical Chemistry. 33, 11, 1594-1598 (1961).

✓ Bibliografía adicional.

Liebhafsky, H.A. and Pfeiffer, H.G. Beer's law in analytical Chemistry. Journal of Chemical Education. 450-452 (1953).

Pfeiffer, H.G. and Liebhafsky, H.A. The origins of Beer's law. *Journal of Chemical Education*. 123-125 (1951).

Hieftje, G.M., Copeland, T.R. and Olivares, D.R. Flame Emission, Atomic Absorption, and Atomic Fluorescence Spectrometry. *Analytical Chemistry*. 48, 5, 142R-174R (1976).