



12
Z. Jimenez

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

**DETERMINACION DE METALES PESADOS (PLOMO,
MERCURIO, ARSENICO, COBRE, CADMIO),
EN SANGRE Y ORINA**

TRABAJO MONOGRAFICO

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A:
María de los Angeles Borja Jiménez



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 está 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.

INDICE

I.	INTRODUCCION	2
II.	GENERALIDADES	4
II.1	PLOMO	4
II.2	MERCURIO	15
II.3	ARSENICO	29
II.4	COBRE	37
II.5	CADMIO	42
III.	METODOS - INTRODUCCION	46
III.1	TOMA DE MUESTRA PARA METALES PESADOS	46
III.2	PLOMO	48
III.3	MERCURIO	85
III.4	ARSENICO	107
III.5	COBRE	129
III.6	CADMIO	136
IV.	CONCLUSIONES	147
V.	BIBLIOGRAFIA	149

I INTRODUCCION

En la actualidad ha llamado la atención el efecto de trazas de algunos metales sobre el metabolismo de los seres vivos.

Los progresos industriales han sido cada vez mayores, provocando una acumulación de sustancias tóxicas en el medio ambiente. También puede haber envenenamiento químico por la ingestión de alimentos enlatados, o por las frutas y verduras a las que se les ha administrado insecticidas.

Por estas razones, los métodos para detectar la presencia de elementos que causan daño al organismo deben hacerse más minuciosos por la necesidad de determinar concentraciones cada vez más bajas de metales en una gran variedad de materiales biológicos. Para la valoración de los metales en los dos fluidos, existen varios métodos, como por ejemplo, el análisis colorimétrico, el de espectrofotometría de absorción atómica, que son los que merecen más confianza. En las determinaciones se necesitan efectuar varias pruebas, ya sea para confirmar la presencia o ausencia de metales y después cuantificar los metales en sangre y en orina.

El laboratorio clínico juega un papel importante en el diagnóstico inicial, ahí es donde se detecta la presencia de metales pesados: observando en el frotis de la sangre una elevación de células con punteado basófilo y en la orina se observa color anormal y pue-

de haber también la presencia de proteínas.

El objetivo de este trabajo es hacer una recopilación de métodos más utilizados para la determinación de metales como: el plomo, mercurio, arsénico, cobre y cadmio en sangre y orina.

II GENERALIDADES

II.1 PLOMO

El símbolo de este metal es Pb, derivada de la palabra latina - plumbum que significa pesado.

La ubicuidad es característica del plomo. Ocupa el 16o. lugar - en orden de abundancia en la corteza terrestre, y el 9o. en el mar.

(9)

El plomo es un metal blando y muy pesado, se funde a una temperatura de 325°C y su densidad es de 11.4 g/ml. Reacciona lentamente con el ácido clorhídrico, tiene poca acción sobre el ácido sulfúrico y el ácido nítrico lo ataca fácilmente.

El plomo y sus vapores son venenosos, además, de sus siguientes compuestos; óxido de plomo, albayalde calcinado o litargirio (PbO), - óxido salino o minio (Pb_3O_4), tetrametilo de plomo y tetraetilo de - plomo.

Los usos del plomo en la industria son muchos y muy variados. Existe peligro de exposición al plomo en las siguientes industrias y - ocupaciones:

a) Imprentas (fundición de linotipias, etc.)

- b) Fábrica de pinturas
- c) Fábrica de acumuladores (baterías)
- d) Fabricación de lana blanca para calzado
- e) Manufacturas de anilinas
- f) Plantas de galvanización
- g) Minas de plomo
- h) Fabricación de insecticidas
- i) Fabricación de compuestos fosforados
- j) Depósito de chatarra de acero (cortado al soplete)
- k) Soldadura con plomo o estaño

La causa más frecuente de envenenamiento por plomo en el hogar - es la ingestión de blanco de plomo, pintura que contiene sales (carbonatos) de plomo. Esta sustancia ataca al sistema nervioso central, - causando daño cerebral y físico de secuelas permanentes, manifestadas en problemas de conducta, retraso mental e hiperactividad (25, 47).

El plomo se encuentra en algunas hortalizas en poca cantidad. - Los alimentos enlatados contienen plomo en mayor proporción.

El plomo se encuentra distribuido en los tejidos de los seres - vivos en cantidades pequeñas, como por ejemplo, en el riñón, pulmón y en el tejido óseo (46):

Las vías de entrada de plomo al organismo son:

- 1) Por inhalación de vapores.

2) Por ingestión de compuestos de plomo.

3) A través de la piel, algunos compuestos orgánicos de plomo.

Quando se ingiere plomo, la mayor parte de él pasa a través del organismo sin absorberse y es eliminado en las heces. Por otra parte, la mayor porción de plomo que llega a absorberse es recolectada por el hígado y excretada en parte por la bilis. Por esta razón, para poder producir intoxicación por vía digestiva, se necesita la ingestión de cantidades considerables de plomo. Una dosis tóxica sería de 1 a 2 mg. por día durante varios meses. Por el contrario, cuando el plomo se inhala, es absorbido fácilmente a través de los tejidos del sistema respiratorio, los síntomas tienden a desarrollarse rápidamente. Desde el punto de vista de intoxicaciones industriales la inhalación de plomo es, por lo tanto, más importante que la ingestión (46).

Una exposición al plomo provoca la acumulación en el cuerpo, almacenándose en tejidos, especialmente en los huesos (1). Los síntomas de envenenamiento aparecen cuando el plomo almacenado es liberado a la sangre. Por esta razón se conoce como veneno acumulativo y se agrupa como elemento tóxico junto con el cadmio, arsénico y mercurio (25).

La inhalación de plomo puede variar de 0.01 a 1 mg. y aproximadamente 0.04 mg. de plomo se aspira diariamente. De esta cantidad es retenida por los pulmones y es absorbida de un 30 a 50%. El plomo absorbido es secretado por vía biliar en el curso alimenticio y elimina

do en la materia fecal; de este modo, la excreción fecal de plomo diaria es igual a la ingesta diaria bajo condiciones normales.

ABSORCION EN Mg.		PRODUCCION TOTAL EN Mg.	
Alimento	0.31	Heces	0.32
Agua	0.02	Orina	0.03
Aire	0.02		
	<hr/>		<hr/>
	0.35		0.35

Cuando se incrementa la inhalación de plomo, también se incrementa la excreción urinaria y fecal, además, se elevan los niveles en la sangre y se lleva a cabo un almacenamiento.

Los niveles de plomo en la sangre y orina, han sido determinados en individuos en todas partes del mundo. Los valores de referencia de plomo en sangre son de 30 a 40 mcg/100 ml y en la orina es de 5 a 50 - mcg/l (1).

El envenenamiento por plomo se divide en agudo y crónico.

ENVENENAMIENTO AGUDO:

El envenenamiento agudo por plomo, es raro pero puede resultar de la inhalación en grandes cantidades de plomo. Los síntomas que causan son: sabor metálico en la boca, salivación, cólico, vómito, anuria y - shock.

ENVENENAMIENTO CRONICO

Los signos y síntomas de envenenamiento crónico por plomo se pueden dividir en cuatro:

- 1) hematológico, 2) neurológico, 3) digestivo, 4) otros.

HEMATOLOGICO

El plomo produce fragilidad de los eritrocitos, de manera que ellos se hemolizan con el más ligero traumatismo. A causa de este aumento de fragilidad, los eritrocitos se destruyen más rápidamente de lo normal y se produce anemia. La síntesis del grupo hemo es afectada primariamente por la inhibición de la deshidratasa del ácido delta-aminolevulínico y la ferroquelatasa, siendo esta enzima la que controla la incorporación del hierro a la molécula de hemo (9,25).

Una importante guía química de los efectos del plomo en el sistema hematopoyético, es la aparición de coproporfirina III en la orina, aunque este resultado puede ser inespecífico, ya que la coproporfirina ocurre en una gran variedad de desórdenes y contaminaciones como en la presencia de varios metales (As, Hg, Cd, Bi), en alcoholismo agudo y cirrosis en alcohólicos. Pero existe una evidente correlación entre la cantidad de plomo y la presencia de coproporfirinas en la orina (9).

Se ha demostrado que un mayor nivel del ácido delta-aminolevulí-

Otro importante signo de intoxicación es la aparición de células punteadas en la sangre periférica (1). Estas formas juveniles de eritrocitos son llamados punteado basófilo. Los puntos o gránulos son anomalías de la misma ribonucleoproteína basófila. Uno de cada 10,000 eritrocitos de individuos normales muestra basofilia punteada (19,43). Se encuentran números mayores en las anemias de casi cualquier variedad, pero abundan en la intoxicación por metales pesados, sobre todo el plomo (pero también en plata, mercurio y bismuto). De hecho la basofilia punteada de los eritrocitos es una gran ayuda para el diagnóstico cuando los síntomas o la historia clínica hacen suponer intoxicación saturnina. En estos casos, si se encuentran 30 o más de estas células en 10,000 eritrocitos se cree que hay saturnismo; y el punteado puede ser más fino que en las variedades inespecíficas (anemias, etc.) (9).

2) NEUROLOGICO

Los músculos extensores de las extremidades superiores están paralizados con mayor frecuencia que los flexores de las extremidades inferiores. La parálisis flexora de la muñeca es un ejemplo común y característico. Los primeros síntomas incluyen irritabilidad, dolor de cabeza, insomnio, cansancio, ataxia y después confusión, de lirio, convulsiones y puede desarrollarse un estado de coma (47).

La ausencia de disturbios sensoriales es importante para diferenciar esta forma de otras neuropatías periféricas (1). Después de

Una parálisis prolongada se puede producir atrofia, con recuperación incompleta de la función muscular después de terminada la exposición.

El diagnóstico no se sospecha hasta que ya se haya ingerido - gran cantidad de plomo, debido a las medidas de seguridad de las industrias, y es raro que se presente en adultos.

La encefalopatía en la actualidad se observa principalmente en los niños.

3) GASTROINTESTINAL

El cólico de plomo o de "pintores", que resulta del espasmo - del intestino, trae como consecuencia natural el estreñimiento y son comunes las náuseas y vómitos. Primero, hay pérdida de peso y apetito, después, viene la fatiga. El cólico es intermitente, muchas veces hasta que el paciente se doble de dolor. Entre los ataques sólo hay sensación de opresión. Haciendo presión sobre el abdomen, se puede producir un alivio evidente. En casos de cólico producido por accidentes industriales, basta retirar al paciente del medio al que está expuesto (9).

4) OTROS

Otros de los signos que hacen suponer la intoxicación, aunque

no es específico de este medio, es la aparición de una línea de color negro azulado en el márgen de la encía, esta línea se llega a formar por la precipitación del sulfato de plomo en los bordes gingivales y en los dientes y se le conoce como "la línea de plomo", pero esto no es frecuente, debido a la mayor higiene bucal (9).

Otros metales como el bismuto, mercurio, estaño y el arsénico, aumentan la precipitación en los bordes gingivales, pero no hay una especificidad de la línea en el diagnóstico de intoxicación por el plomo.

Invariablemente la contaminación por plomo produce cambios en la coloración de la piel conocido como "color plomo". El paciente toma una apariencia pálida o gris ceniza y el mecanismo de esta respuesta no ha sido aclarada, pero normalmente se cita a la constricción capilar y aparentemente la anemia juega un papel menor, ya que algunos individuos presentan el color plomo y el contenido de eritrocitos y hemoglobina es normal (9).

TETRAMETILO DE PLOMO Y TETRAETILO DE PLOMO

El tetrametilo de plomo y el tetraetilo de plomo son compuestos solubles en lípidos y son usados como aditivos antidetonantes. Aunque se absorbe por la piel, se requiere mucho tiempo para que los niveles a través de la piel lleguen a ser tóxicos. Los compuestos orgánicos de plomo que entran en el cuerpo, principalmente lo hacen por la vía

respiratoria, normalmente por inhalación de vapores durante la limpieza de cisternas. A causa de la supervisión higiénica industrial, la intoxicación por estos compuestos es rara. El tetraetilo de plomo produce síntomas que están principalmente referidos al sistema nervioso central. El paciente se muestra irritable, padece insomnio, emocionalmente es inestable, y en etapas avanzadas el paciente presenta alucinaciones. El tetrametilo de plomo y el tetraetilo de plomo se experimentaron en ratas involucrando dosis letales para provocar efectos neurológicos, estos animales mostraron hiperactividad, irritabilidad y convulsiones. El tetrametilo de plomo produce letargo, somnolencia y estado de coma. También se vió que en los humanos produce anorexia, vómito, diarrea moderada, sin efecto en el metabolismo de porfirina, además no aparecen células punteadas, ni reducción en el número de eritrocitos en la sangre, y los niveles de plomo en la sangre permanecen cerca de lo normal con la intoxicación de tetraetilo de plomo, mientras que los niveles de plomo en la orina aumentan marcadamente (9,21,22).

Datos clínicos que ayudan en el diagnóstico de saturnismo:

HEMOGRAMA: Anemia moderada, intensa en los casos avanzados, de carácter discretamente hipocromo, con anisocitosis y poiquilocitosis, "punteado basófilo" típico, en una parte de los hematíes, dato casi constante y de valor básico en el diagnóstico (2).

Leucocitosis neutrófila en las fases de agudización. A veces -

trombopenia.

MIELOGRAMA: Médula hipoplástica en unos casos, hiperactiva en otros. En las células reticulares pueden encontrarse hemáticas fagocitadas, - hemosiderina y gránulos basófilos. Microfluorescencia de los normo-- blastos -"fluorescitos"- e incluso otras de "células medulares", y aún de las trabéculas óseas, a la observación microscópica mediante - luz ultravioleta (2).

QUIMICA HEMATICA: Ligera hiperbilirrubinemia responsable de la sub-- ictericia. A veces, hiperuricemia y hematinemia (2).

ORINA: Eliminación aumentada de porfirina, hallazgo regular precoz, - por lo tanto, de notable valor diagnóstico, aunque no exclusivo del - saturnismo, como se explicó anteriormente. En la orina aparece, so-- bre todo, coproporfirina III y ácido delta-aminolevulínico (2).

La determinación de plomo posee, naturalmente un valor definiti-- vo. Pueden considerarse patológicas cifras de eliminación urinaria - superiores de 80 mcg en 24 horas, aunque desde 50 mcg debe sospechar-- se intoxicación.

La prueba terapéutica con calcio-EDTA al movilizar el plomo de los tejidos, motiva un aumento en la eliminación del tóxico.

Glucosuria intermitente de origen renal, con glucemia normal.

Aminoaciduria, ocasionalmente. La orina puede presentar también albúmina y cilindros.

CRITERIO CLINICO: La anemia con punteado basófilo en los eritrocitos, así como la porfinuria, constituyen signos por lo general suficientes para conformar una sospecha clínica. Si todavía caben dudas, debe procederse a la determinación de plomo en la orina y a la prueba de calcio-EDTA.

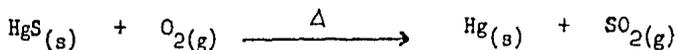
En conclusión, para dar un diagnóstico de plumbismo crónico se presenta anemia, punteado basófilo, incremento del ácido delta-amino-levulínico y la presencia de la concentración elevada de plomo en san gre y orina.

Los procedimientos analíticos deben ser extraordinariamente sen sibles y efectuarse con gran cuidado a fin de que los resultados sean válidos.

II.2 MERCURIO

El símbolo de este metal es Hg. Se le llama también azogue, aunque el mercurio metálico en forma de líquido aparece en ciertas áreas volcánicas. El mercurio comercial disponible hoy en día se extrae del cinabrio (HgS).

El mercurio se obtiene del cinabrio, que es un mineral de color rojo oscuro:



Al escaparse el SO_2 , el cual es un gas, se condensa el mercurio, que después es purificado por destilación triple.

A temperatura ordinaria el mercurio es un líquido muy pesado - (un litro pesa 13.6 kg.), de color semejante a la plata, su punto de ebullición es de 357°C , y es altamente volátil a temperatura ambiente.

El mercurio presenta dos estados de oxidación, como monovalente (Hg^{+1} mercurioso) y como divalente (Hg^{+2} mercúrico).

El mercurio divalente puede formar uniones covalentes con átomos de carbono y por esta propiedad se le conoce como mercurio orgánico (9).

Los usos del mercurio en la industria son múltiples y existe peligro de exposición al mercurio en las siguientes industrias y ocupaciones:

- a) Se emplea en los laboratorios de investigación y médica y en patología clínica.
- b) Manufacturas de instrumentos científicos.

- c) Medidores eléctricos
- d) Lámparas de vapor de mercurio
- e) Amalgamas de cobre, zinc, plata y oro
- f) Para soldaduras
- g) En la producción de compuestos orgánicos
- h) En la fabricación de sombreros de fieltro.
- i) Como catalizadores en la producción de plásticos de vinil, utilizando sales de mercurio.

Los compuestos inorgánicos más tóxicos son las sales de mercurio (cloruro mercurioso y mercuríico, nitrato mercuríico) y también los llamados organomercuriales (fenilmercurio, etilmercurio, sales de alquilmercurio).

El mercurio metálico es el más volátil de las formas inorgánicas del mercurio (43). Una atmósfera saturada a 25°C y a 760 mm de Hg de presión contiene 19.6 mg Hg/m³. Niveles 100 veces más bajos que estos producen síntomas de mercurialismo (9).

Al cloruro mercurioso (HgCl) se le conoce con el nombre de calomel, y es un compuesto color blanco, siendo el menos tóxico de los compuestos mercuriosos que se conocen. Es usado en algunas cremas como antiséptico, también fue usado como catártico, tiene propiedades diuréticas, es insoluble en agua y no es venenoso.

Las sales del mercurio son las más irritantes y las formas más tóxicas del mercurio como el nitrato mercuríico (Hg(NO₃)₂) ganó notq

riedad hace 400 años en la industria de sombreros en donde el mercurialismo llegó a ser una industria peligrosa.

El cloruro mercuríco es un compuesto tóxico, se le conoce también como sublimado corrosivo, y es un veneno violentísimo.

Todos los organomercuriales usados hoy en día, sólo contienen mercurio de unión covalente a un átomo de carbono, como los diuréticos mercuriales que tienen la toxicidad más baja que los compuestos orgánicos y tienen uso clínico, son solubles en agua, y rápidamente excretados en la orina (4). El acetato de fenilmercurio de toxicidad baja, es usado en gelatinas anticonceptivas, en fungicidas en las semillas. El nitrato de fenilmercurio es usado en pastillas para la garganta. El cloruro de metoxietilmercurio pertenece a un nuevo grupo de fungicidas de mercurio, cuya toxicidad es similar a los compuestos de fenilmercurio.

Las sales de alquilmercurio son las más peligrosas de todos los compuestos del mercurio. Las sales simples tales como el cloruro de etilmercurio son suficientemente volátiles como para producir serios efectos tóxicos por inhalación.

También se ha observado que ciertas especies de río, pueden sintetizar metilmercurio a partir de mercurio inorgánico que se descarga de las industrias, como por ejemplo este compuesto aparece en el atún y pez espada.

La absorción del mercurio en el organismo puede ser por las vías respiratorias, gastrointestinal, piel y en el caso de preparaciones anticonceptivas a través de la vagina. En general, la mayoría de los compuestos del mercurio son bien absorbidas.

El calomel o cloruro mercurioso se absorbe pobremente por la región gastrointestinal a causa de su baja solubilidad, por ejemplo, 1 g de calomel se ha usado como catártico sin producir toxicidad, en cambio, una dosis similar de cloruro mercúrico sería letal (9).

Desafortunadamente no hay información precisa en el porciento de la absorción en la región gastrointestinal en el hombre y animales. La absorción debe ser muy rápida ya que en el curso de envenenamiento están determinados por los eventos en los primeros 15 minutos más o menos, particularmente, por el vómito y el lavado terapéutico.

Los aerosoles y polvos (óxido mercúrico, sales mercúricas) son almacenadas y absorbidas en la región respiratoria. Los procesos dependen de ciertos factores como el tamaño de la partícula y solubilidad, como las sales mercúricas se absorben muy bien en la región gastrointestinal.

Las sales de arilmercurio se absorben más completamente a través de la región gastrointestinal. El acetato de fenilmercurio se absorbe en la vagina, por el uso de anticonceptivos. Los estudios clínicos realizados a 100 mujeres, indicaron que los niveles de mercurio urina

rio aumentaron de 20 mcg/24 hr. después, por el uso constante de anticonceptivos vaginales en un año.

La absorción a través de la región respiratoria y por la piel pueden ocurrir y dar síntomas tóxicos (4).

El almacenamiento del mercurio es una consideración importante en la toxicología de este metal (1). Los compuestos del mercurio - inorgánico y orgánico, si se presentan con ciertas concentraciones - anormales pueden envenenar cualquier célula (9).

El mercurio divalente, se acumula en la placenta de los animales según experimentos hechos, sin embargo, sólo penetra un poco en el tejido fetal, en cambio, los compuestos como el metilmercurio pasan el tejido fetal sin dificultad. Estas diferencias en las relaciones de transferencia placentaria pueden tomarse en cuenta para el hecho de los efectos teratológicos.

El almacenamiento en el riñón es probablemente el proceso más importante para determinar el total de la distribución de mercurio - en el organismo (9). Si hay una eficiencia renal, se mantiene la concentración de mercurio baja en el plasma, y en los demás tejidos. Después de una inyección de sales de mercurio inorgánico y diuréticos - mercuriales, el mercurio se remueve del plasma rápidamente y se acumula en altas concentraciones en la corteza renal, en cambio, los niveles de mercurio en otros tejidos son bajos. En cambio los aquilmercurios no se acumulan tanto en el riñón y las concentraciones

La biotransformación de mercurio y sus compuestos, juegan un papel importante en la absorción, distribución y almacenamiento en diferentes órganos y excreción. Hay dos tipos de reacciones que han sido estudiadas: 1) las interconversiones de mercurio inorgánico en los estados elemental a los mono y divalentes, y 2) la ruptura de la unión del mercurio con el carbón en compuestos organomercuriales.

El mercurio en forma de vapor, es oxidado en el organismo a mercurio divalente, esta oxidación ha sido demostrada y ha procedido in vitro, en contacto con el vapor y sangre (humana) heparinizada. El mercurio oxidado une a la albúmina del suero y la hemoglobina. Se cree que el vapor es rápidamente oxidado in vivo a la forma divalente.

Sin embargo, los niveles en el cerebro son más altos después de la exposición al vapor del mercurio, debido a que el vapor es disuelto en la corriente sanguínea, durante el período de exposición. Por eso se dice que el vapor es rápidamente oxidado en el cerebro, ya que el mercurio una vez depositado en este órgano, es lentamente liberado (9).

Hay otros compuestos que dañan a otros órganos, como en el caso de la exposición al acetato de fenilmercurio, causando daño en el riñón en animales experimentales, debido a que este compuesto es degradado rápidamente a mercurio inorgánico.

La sangre normal puede oxidar rápidamente mercurio (mercuroso a

mercurio) in vitro. La baja solubilidad del cloruro mercurioso en los fluidos gastrointestinales, probablemente se debe a la rápida conversión de iones mercúricos. Sus propiedades catárticas y diuréticas se deben tal vez a la formación de pequeñas cantidades de mercurio (mercúrico).

El riñón y el hígado tienen la más alta proporción de mercurio inorgánico. En cambio, se han encontrado pocas cantidades en el bazo, cerebro y sangre. Según las pocas observaciones hechas en heces, parece que la fracción de mercurio (inorgánico) es alta. La proporción en la orina varía según el tiempo transcurrido desde la administración de la dosis.

Cuando el organismo recibe una cantidad de diuréticos mercuriales en una inyección, la proporción de mercurio es del 90% o más, porque el diurético es excretado rápidamente, y el mercurio inorgánico llega a ser abundante. Sin embargo, al administrar acetato de fenilmercurio, el mercurio inorgánico y orgánico están presentes en proporciones iguales, pero después de una o varias exposiciones a compuestos de alquilmmercurio, el mercurio inorgánico cuenta con menos del 10% del total de mercurio en la orina.

En cambio, se encuentra en poca cantidad de mercurio inorgánico en el cerebro, órgano principal para los compuestos de alquilmmercurio. El tiempo de ataque al sistema nervioso central, es más o menos una semana, después de la exposición al metilmercurio.

El mercurio que se adquiere en una dieta diaria es de 5 a 20 - mcg por día. Los niveles de mercurio normalmente son los siguientes:

Orina	20 a 25 mcg/l
Sangre	0 a 4 mcg/100 ml.
Heces	0 a 10 mcg/día

Hay dos tipos de envenenamiento por mercurio; el agudo y el crónico.

ENVENENAMIENTO AGUDO

Los síntomas asociados con la ingestión oral de sales inorgánicas son; gastroenteritis con dolor abdominal, vómito y diarrea con sangre. La anuria y la uremia se asocian con el daño severo al riñón, y pueden aparecer un día o más después de la exposición.

La exposición aguda a altas concentraciones de mercurio en vapor pueden provocar características como el sabor metálico, náuseas, dolor abdominal, vómito, diarrea, y dolor de cabeza. En unos cuantos días se inflaman las glándulas salivales, y hay desarrollo de gingivitis, formándose una línea oscura en la encía inflamada, que se debe al sulfuro mercuríco presente, y se pueden perder los dientes y formar úlceras en los labios.

ENVENENAMIENTO CRONICO

Los síntomas son los mismos que los de la exposición aguda, pue

de aparecer después de una exposición aguda y desata problemas como ataxia, confusión en el hablar, entorpecimientos, temblor en los la bios, manos y pies, dificultad auditiva y disturbios emocionales. - Los síntomas son irreversibles en casos severos.

Si en el embarazo la mujer ingiere cantidades de metilmercu--
rio puede dar a luz niños que sufran convulsiones, parálisis o re--
traso mental.

Los trabajos experimentales indican que los compuestos de me--
tilmercurio son potentes inhibidores de la división celular y de la
segregación de cromosomas (9).

Las evidencias basadas en casos de envenenamiento industrial y
la ingestión de metilmercurio en los alimentos, indican que los sín--
tomas son observados primero en concentraciones de 100 mcg/100 ml de
sangre normal. Los niveles en sangre de 10 mcg/100 ml o menos no es--
tán asociados a síntomas tóxicos (9).

El fenilpropanato de mercurio (usado para evitar el enmoheci--
miento de las casas) puede causar a los niños acrodina, o enfermedad
rosa. Se caracteriza por irritabilidad, insomnio, estomatitis, pér--
dida de dientes, fiebre, leucocitosis y albuminuria.

La exposición industrial, los síntomas característicos hacen -
relativamente fácil el reconocimiento, del envenenamiento mercurial

crónico, pero si falta un dato conocido referente a la exposición, - el diagnóstico puede ser difícil.

Los pacientes con envenenamiento crónico excretan por la orina - de 0.3 mg de Hg por litro.

Voegtlin fue el primero en señalar la importancia de la interacción de los metales pesados con grupos sulfhidrilos (HS^-) de las proteínas (9). En una inyección de cloruro mercuríco y organomercuriales en animales, conduce a la reducción en la concentración de grupos sulfhidrilos en el riñón. El mercurio inhibe la enzima S-S reductasa, responsable de la reducción de uniones disulfuro a grupos tiol, y por este medio causa disminución de estas ligaduras en el riñón. El descubrimiento de la reducción de grupos sulfhidrilos en dicho órgano, en envenenamientos de mercurio no es una demostración experimental, pero se observa que el mercurio está unido a estas ligaduras. Sin embargo, el mercurio está presente en la orina en el grupo sulfhidrilo de la cisteína y une al grupo tiol de la albúmina del suero.

Un nuevo adelanto general al mecanismo de acción de los metales pesados, ha sido explorado por Rothstein. Se ha basado en la premisa de que la membrana celular es el primer punto atacado por metales pesados (9). En estudios realizados con uranio, cobre, molibdeno y mercurio, Rothstein fue capaz de demostrar que los metales pesados se unen a la membrana celular y el primer cambio detectable en la función celular, se debe a los cambios que hay en la membrana por la inhibición del proceso del transporte activo o un aumento en la permeabili-

dad pasiva.

Trabajos hechos con mercurio, han sido reportados e indican que este metal tiene un efecto dramático en las membranas de una variedad de células de mamíferos. Por eso se incrementa la permeabilidad del potasio bloqueando el transporte de los azúcares. Estos efectos se deben a una combinación de mercurio con el grupo sulfhidrilo o de la membrana celular.

Usando suspensiones de glóbulos rojos, se demostró la diferencia entre las variedades de organomercuriales, estos podrían estar relacionadas con las diferencias de compuestos para la capacidad de penetrar a las membranas. Como por ejemplo, el sulfonato p-mercuriobenceno, no pasa a través de la membrana celular, pero reacciona con el grupo sulfhidrilo en la superficie exterior. Estos compuestos sólo bloquean el transporte de la glucosa. En cambio, el diurético mercurial (cloromerodrina) penetra la membrana celular, inhibiendo el transporte a la glucosa e incrementa la permeabilidad del potasio. Una vez dentro de la célula el mercurio puede ser separado en una combinación inactiva o puede reaccionar con enzimas u otros receptores sensitivos para la eliminación de efectos tóxicos.

Se sabe que el mercurio reacciona con un gran número de enzimas in vitro.

Recientes estudios en la distribución celular de mercurio, después de administrarlo a ratas, han indicado que este metal se encuen-

tra en todas partes de la célula. Se cree que el resultado es el daño a las enzimas.

Aunque no son específicas las pruebas bioquímicas, son importantes porque ayudan a diagnosticar el envenenamiento mercurial.

DATOS CLINICOS QUE SE PRESENTAN EN LA INTOXICACION MERCURIAL

EN ORINA: Oliguria y hasta anuria en los casos con necrosis tubular e insuficiencia renal aguda (fase oligúrica), característicamente unida a hipostenuria e incluso isostenuria, es decir, con densidad urinaria en torno a 1010. La escasa orina puede aparecer oscura o hemorrágica, con albuminuria, cilindros granulosos y detritus celulares. Si en el exámen de orina aparecen más de 50 mcg por litro, debe considerarse patológico, e indicativo de intoxicación mercurial - (2).

EN SANGRE: Uremia progresiva en la fase oligúrica con retención de creatinina y sulfatos. Aumenta la potasemia y decrece la concentración hemática de sodio y cloro, a pesar de que existen en exceso en el organismo. Acidosis con disminución del pH de la sangre y de reserva alcalina (2).

En la fase diurética se comprueba anhidremia con hipopotasemia y descenso de la cloremia y sodemia.

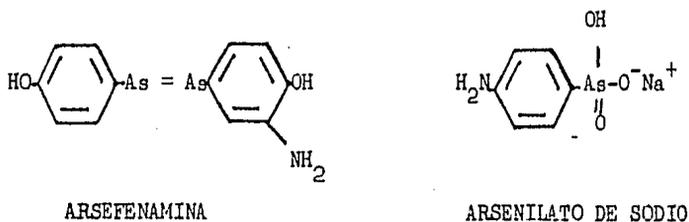
HEMOGRAMA; Anemia y leucocitosis. Durante la poliuria puede aparecer una falsa poliglobulia por hemoconcentración (2).

II.3 ARSENICO

Su símbolo es As. Elemento sólido, quebradizo, de aspecto metálico, se encuentra en forma libre, se funde a la temperatura de - - 817°C. y su densidad es de 5.72 g/ml.

El arsénico puro no es tóxico, pero se oxida rápidamente y se forma el trióxido de arsénico (As_2O_3) conocido también como arsénico blanco. Es un polvo que se utiliza en las intoxicaciones con fines criminales. Este veneno tiene una larga historia como veneno clásico (9,43).

El arsénico presenta un estado de oxidación + 3 en óxidos estables y en compuestos, como por ejemplo, en el arsenito de potasio - ($KAsO_2$). También presenta el estado de oxidación + 5 como en el ácido arsénico (H_3AsO_4). Los arsenicales orgánicos contienen arsénico - trivalente, el arsenilato de sodio contiene el elemento en forma pentavalente. Las estructuras son las siguientes:



El arsénico está ampliamente distribuido en la corteza terrestre y está clasificado en el 20o. orden de abundancia (9). Está presente en el mar en una concentración de 2 a 5 ppb y los organismos marinos lo acumulan. El arsénico está presente en muchos minerales de metales pesados. La producción de arsénico se ha incrementado durante los últimos 50 años, hasta producirse actualmente alrededor de 55,000 toneladas por año en el mundo occidental (12).

Este elemento tiene poco uso en la forma metálica, siendo constituyente activo para cualquier fungicida, herbicida y pesticida. Los más usados con este fin son los arsenitos de calcio y plomo $\text{Ca}_3(\text{AsO}_3)_2$, $\text{Pb}(\text{AsO}_2)_2$ (4,9,43). Es utilizado también en pinturas, en la industria de colorantes, y en un tiempo fue usado en cosméticos. Las propiedades medicinales del arsénico han sido conocidas desde la antigua Grecia, fueron descritas por Hipócrates y Aristóteles. Los Arsenicales orgánicos fueron introducidos en 1905 por P. Ehrlich como medicinales y todavía son usados hoy en día para tratar las infecciones con protozoarios. El ácido arsanílico ($\text{p-H}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{AsO}_3\text{H}_2$) es utilizado para alimento de aves de corral y en la ganadería, para aumentar la relación de crecimiento.

Los arsenitos tienen una alta afinidad por los grupos tiol y son considerablemente más tóxicos que los arseniats, ya que tienen propiedades similares a los fosfatos y no tienen actividad para los grupos tiol (9,43).

La arsina (AsH_3) es un compuesto gaseoso industrial. Se produce

accidentalmente por exposición del trióxido de arsénico (As_2O_3) al hidrógeno nascente.

Las frutas pulverizadas con insecticidas pueden contener arsénico suficiente para ser tóxicas. El whisky de contrabando a veces está contaminado con arsenicales.

El envenenamiento es producido por la absorción desde los pulmones, la región gastrointestinal y a través de la piel. Aproximadamente el 75% del trióxido de arsénico inhalado se retiene en los pulmones. Es absorbido en la región gastrointestinal, pero la absorción es más rápida si el óxido está en una forma finamente dividida. Las sales de arsenito son más solubles en agua y son mejor absorbidas que el óxido.

En la exposición aguda, el arsénico se almacena en el siguiente orden: hígado, riñón, intestino, bazo y pulmones. El arsénico aparece en el pelo, más o menos dos semanas después de la primera exposición, donde se une al sulfuro ligado a la queratina.

En la exposición crónica, permite la acumulación en el pelo, huesos y en la piel (9). El arsénico se puede encontrar en altas concentraciones en el pelo años después de cesar la exposición y después de que la mayoría de los metales se hayan eliminado del tejido blando.

El arsénico puede pasar al cerebro lentamente. Los niveles en el cerebro están entre los más bajos del cuerpo. Sin embargo, este órga-

no retiene el arsénico durante períodos más largos que otros tejidos.

Este metal también atraviesa fácilmente la barrera placentaria y se ha reportado daño fetal en animales y seres humanos (9).

La excreción ocurre por todas las rutas fisiológicas, como son las heces, orina, sudor, y en la leche. Inclusive algunos arsénicos volátiles pueden ser exalados desde los pulmones. El arsénico se puede eliminar por la pérdida normal del pelo y piel, especialmente en casos de exposición crónica (9,12)

La orina y las heces contienen la mayoría del arsénico excretado por eso la muestra de elección es la orina, aún cuando hayan transcurrido dos o tres semanas (43), desde la ingestión del veneno. En general, las sales del arsenito se eliminan principalmente en las heces, y los arseniatos en la orina (12). La excreción de arseniatos es más rápida que la excreción de arsenitos. Se requieren aproximadamente 10 días para eliminar una simple dosis de arsénico en el cuerpo, después de cesar la exposición repetida. También se ha reportado que la excreción más lenta es para compuestos mercuriales (9).

La aspiración media en el hombre es más o menos 910 mcg diarios, de los cuales 890 mcg están en el alimento ingerido y en el agua. La aspiración está balanceada con la excreción que en las heces es 675 mcg y en la orina 225 mcg. El cuerpo humano normalmente contiene aproximadamente 21 mg de arsénico, quedando una retención neta de 2 mcg/día.

En los individuos normales "no expuestos" los niveles son los siguientes:

Sangre	0 a 2 mcg/100 ml
Orina	menos de 50 mcg/100 ml en 24 horas

Hay dos clases de envenenamiento por arsénico: el agudo y el crónico.

· ENVENENAMIENTO AGUDO

Los envenenamientos agudos ocurren a causa del arsénico en la forma de óxido (As_2O_3) que es prácticamente insípido, tiene la apariencia de azúcar y se absorbe rápidamente en la región gastrointestinal. En la entrada oral es seguida por un período asintomático de más o menos 30 minutos. La víctima experimenta una tensión en la garganta y dolores de estómago. Puede seguir con vómito, el cual podría ser la salvación del individuo. Otros efectos que siguen rápidamente son diarrea intensa. Las heces son acuosas con partículas de moco (9,12).

Característico de la intoxicación aguda es la disminución de la corriente de orina. Normalmente resulta la muerte de uno a tres días, con la víctima en estado de colapso. Las muertes que ocurren hasta 14 días después del envenenamiento, son causadas por nefritis. La ingestión de 100 mcg del trióxido de arsénico puede causar envenenamiento severo y la dosis mínima letal en el hombre es como 1 g.

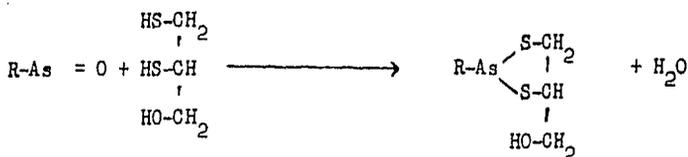
La inhalación de arsina (AsH_3) da una rápida hemólisis de los glóbulos rojos, y al haber destrucción de dichas células, da por resultado una anemia permanente (9). También hay presencia de hemoglobina en la orina. La liberación de la hemoglobina causa ictericia y puede bloquear los conductos del riñón. De 2 a 9 días después de la exposición pueden aparecer síntomas típicos de envenenamiento por arsénico. El límite de arsina en la atmósfera industrial se establece en 0.05 ppm. (4,9).

ENVENENAMIENTO CRONICO

Resulta de la ingestión repetida de pequeñas cantidades. Este método es usual para el homicidio. Los síntomas y signos más importantes son: pérdida de peso, diarrea, vómito, náuseas, anorexia, fatiga, descamación de la piel, dolor de cabeza, confusión, hiperqueratosis de la palma de las manos y de los pies, aparecen estrias transversales en las uñas (líneas de Mees). Es frecuente la perforación del tabique nasal. La hiperqueratosis resulta de la exposición prolongada al arsénico, y llega a ser maligna y da lugar a cánceres múltiples. (se cree que el arsénico causa cáncer en otros tejidos).

ASPECTOS BIOQUIMICOS DE ENVENENAMIENTO POR ARSENICO

Los compuestos arsenicales trivalentes, las sales orgánicas de arsénico y los arsenicales orgánicos monosustituídos, poseen una alta afinidad por los grupos tiol. Las reacciones son las siguientes:



Permite la formación de un anillo de 5 miembros muy estable. Es parecida a la reacción del arsénico trivalente por el grupo tiol de las proteínas y enzimas en tejidos y es responsable de la toxicidad de esta clase de compuestos de arsénico (9).

Ehrlich en 1909 sugirió que los arsenicales se combinan con grupos hidróxilos o sulfhidrilos en los tejidos, pero Voegtlin y colaboradores fueron los primeros en publicar la evidencia definitiva para la reacción con los grupos sulfhidrilos en moléculas de glutación y otros (9).

Peters y colaboradores fueron los primeros en identificar el responsable de la lesión bioquímica de los efectos tóxicos del arsénico trivalente. Demostraron que la oxidación de los cetoácidos es inhibida por el arsénico, tanto in vitro como in vivo, antes de que detectara cualquier otro efecto bioquímico o estructural (9). También demostraron la alta afinidad del arsénico trivalente para grupos tiol vecinales presentes en la queratina reducida y obtenida del pelo humano.

Estas observaciones precedieron al desarrollo de una serie de - agentes complejos ditioles como antídoto, en el envenenamiento por - arsénico. El más útil fue el 2,3-dimercaptopropanol (BAL).

La afinidad del arsénico para los ditioles es importante, sugirió Peters, esa probabilidad de algunos tipos de compuestos sulfhi-- drilos son involucrados, en la oxidación de los cetoácidos. Después de 10 años, la finalización de los estudios de Peters, aisló el ácido alfalipoico, como cofactor esencial en el sistema de oxidación de los cetoácidos. Este ácido graso contiene grupos tiol en los átomos de carbono 6 y 8 (9).

El daño capilar es más claro en el área esplénica, la pérdida - de proteínas plasmáticas dentro de las áreas intestinales, causa bur - bujas debajo de la capa de mucosa. Simultáneamente produce peristal - sis intestinal, y se difunde a las células epiteliales. Hay presen-- cia en la orina de proteínas y eritrocitos.

Clínicamente los síntomas de envenenamiento pueden confundirse fácilmente con otras enfermedades que tengan los mismos síntomas. - Por eso, en casos crónicos de largo término, es importante el análi - sis de cabello y uñas (43).

En el laboratorio también es muy importante determinar si hay - arsénico en la orina, en lavados estomacales, vómitos, sangre, cabe - llos y uñas, o alimentos sospechosos de contaminación. Puede ser de - gran ayuda una biometría hemática, y realizar un general de orina (pa

ra detectar la presencia de proteínas y hemoglobina).

II.4 COBRE

Su símbolo es Cu, es un metal de color rojo característico, es dúctil y maleable, y buen conductor de la corriente eléctrica.

Su punto de ebullición es de 2336° C., se funde a la temperatura de 1083° C. y su densidad es de 8.96 g/ml.

Si el aire es seco, ataca al cobre ligeramente; pero si es húmedo el óxido ya formado se transforma en hidróxido y se puede convertir en carbonato por la presencia del CO_2 del aire.

Este metal se combina directamente con el cloro, reacciona con el ácido sulfúrico concentrado caliente, con desprendimiento de SO_2 . El cobre presenta dos estados de oxidación: + 1 (cuproso) y + 2 (cúprico).

A pesar de que el cobre puede encontrarse sin combinar en la naturaleza, no se usa en esta forma libre porque no abunda. Generalmente, está en forma de carbonatos, sulfuros, óxidos o silicatos.

El cobre se utiliza para hacer aleaciones como bronce (Cu y Sn) y latón (Cu y Zn), que son utilizados en arte decorativo y en la industria para tuberías de agua y de gas. También tiene usos en insecticidas.

ticidas, fungicidas y pinturas, pero el mayor uso del cobre es para fabricar alambres conductores de energía eléctrica (9).

El cobre también es un elemento esencial para los seres vivos, ya que es un constituyente de proteínas, y metaloenzimas, es importante para la síntesis de hemoglobina y para la formación normal del hueso (9). En la hemocianina, que es semejante a la hemoglobina de ciertos invertebrados, es un complejo de cobre-proteína que tiene el mismo funcionamiento de la hemoglobina, transporte de oxígeno.

El cobre actúa como una parte integral de varias enzimas oxidativas, como en el citocromo oxidasa, tirosinasa, ascórbico oxidasa y uricasa (9,43).

De una manera específica no se ha podido demostrar con certeza la deficiencia de cobre en el hombre, ya que las dietas pobres de cobre ofrecen lo necesario para sus requerimientos diarios.

En animales de experimentación que han sido alimentados con raciones sin cobre o con poco de él, presentan signos serios por deficiencia de cobre y son: anemia, crecimiento depresivo, desórdenes óseos, despigmentación del pelo o lana, reproducción anormal, fallas del corazón, disturbios gastrointestinales pudiendo llegar hasta la muerte (9). Esto sugiere que el cobre tiene otro papel además de su función en el metabolismo de los eritrocitos, y se cree que está relacionado con la actividad de las enzimas oxidoreducción de los tejidos.

Cuando hay deficiencia de cobre se disminuye el movimiento del hierro de los tejidos al plasma, también se ha comprobado que esta deficiencia está asociada con padecimientos óseos, que muchos animales han sufrido fracturas y deformaciones.

La ingestión diaria normal de cobre es de 2.5 a 5 mg., pero con sólo 2 mg es suficiente. Las fuentes más importantes del cobre son: las nueces, ciertos mariscos, el hígado, el riñón, las pasas y leguminosas secas.

El organismo humano contiene entre 100 y 150 mg. de cobre, aproximadamente 64 mg. se encuentran en el músculo, 23 mg. en los huesos, y 18 mg en el hígado. Todas las células de la sangre contienen cobre, en los eritrocitos es constante; en cambio en el suero hay mucha variación, también se puede encontrar en el cerebro, en el corazón y en el riñón.

Los niveles de cobre pueden aumentar durante el embarazo.

Los valores de referencia para el cobre son los siguientes:

SUERO:

ADULTOS	70 - 140 mcg/100 ml
R.N.	80 - 280 mcg/100 ml
ORINA	0 - 30 mcg/ 24 horas.

Puede haber envenenamiento agudo debido a la absorción de las sales de cobre, y si no se elimina rápidamente el metal, puede haber daño capilar, del sistema nervioso central, del hígado y del riñón. El envenenamiento también puede resultar del contacto repetido con el sulfato de cobre (CuSO_4) en la piel quemada.

Para que pueda haber envenenamiento crónico, el nivel del cobre debe decaer; esto es, aumentar a 25-50 mg.

Clínicamente el cobre ha tenido mucha importancia en la enfermedad de Wilson (43). Esta enfermedad hace disminuir la excreción biliar de cobre, siendo esto el primer signo de envenenamiento. Se produce una acumulación de cobre en el cerebro, hígado, riñones y otros tejidos. La acumulación se lleva a cabo primero en el hígado, después en los hepatocitos, y luego en los lisosomas. Al progresar la enfermedad, causa daño hepatocelular, con liberación de cobre que sale de los hepatocitos. Este metal es liberado del hígado y distribuido y depositado en varios tejidos del cuerpo, causando daño celular y orgánico (9).

En individuos normales aproximadamente el 95% del cobre sérico está ligado a la ceruloplasmina, la cual es una proteína plasmática que es transportadora del cobre (31). Tiene un peso molecular elevado (151,000), el plasma normal contiene más o menos 30 mg/100 ml. El 5% está unido débilmente a la albúmina sérica. En pacientes con la enfermedad de Wilson hay una disminución en las concentraciones séricas de

ceruloplasmina y de cobre total, hay aumento del elemento ligado a la albúmina que se disocia con facilidad y crece la eliminación de cobre en la orina (9,43).

El cobre del plasma que está unido a las proteínas no es fácilmente excretado por la orina, este metal pasa de la bilis al intestino y es expulsado en las heces, pero sólo una pequeña porción es absorbida por el intestino delgado superior y llega a la sangre.

Se pueden observar bajos niveles de cobre en suero en varias hipoproteínemias, esto se conoce como hipocupremia y se encuentra en padecimientos de hipersideremia, en las lesiones renales con síndrome nefrótico, por la pérdida urinaria de ceruloplasmina; en la degeneración hepatolenticular (enfermedad de Wilson) como hallazgo típico y en relación con el descenso o ausencia de la globulina de transporte (ceruloplasmina) (2,9,43).

Si se encuentran niveles aumentados de cobre en suero significa que hay hipercupremia y está presente en varias enfermedades como: anemias hipocromas, y en otras anemias, en linfomas, leucocitosis y en la enfermedad de Hodgkin; en las poliglobulias tratadas con fenilhidrazina al disminuir los hematíes, luego al interrumpir el tratamiento y reascender los eritrocitos y el hierro sérico disminuye la cupremia; en procesos infecciosos graves; tuberculosis, en el asma bronquial; en la ictericia obstructiva; en la hepatocelular, por el contrario el Fe sérico aumenta igual que el cobre, pero este en menor cantidad; en colagenosis, lupus eritematoso diseminado, fiebre reumática, artritis reu-

matoide y otras (1,2)

Aumenta la cupruria (cobre en la orina) en la enfermedad de Wilson y en el síndrome nefrótico (por la pérdida renal de ceruloplasmina) (1,2,43).

II.5 CADMIO

Su símbolo es Cd. Es un metal de color blanco brillante, su punto de ebullición es de 765°C . y su densidad de 9.8 g/l, y tiene un estado de oxidación + 2.

El cadmio se utiliza industrialmente para fabricar acumuladores de níquel-cadmio, en galvanoplastia y en la preparación de aleaciones.

El sulfuro de cadmio (CdS) es uno de los compuestos más importantes del cadmio, se usa en tintes y pinturas, y está clasificado entre los más tóxicos.

Los principales riesgos industriales de envenenamiento se deben a la inhalación de polvos o vapores de cadmio resultantes de la fundición de minerales y soldaduras. Existe intoxicación por la ingestión de alimentos y bebidas contenidas en recipientes plateados con cadmio (9).

Mediante experimentos hechos en conejos y ratas con cloruro de cadmio (CdCl_2) o sulfato de cadmio (CdSO_4), se ha observado que este elemento se distribuye en menor cantidad en toda la piel, en concentraciones mayores en el hígado y riñón, y en cantidades un poco más bajas en bazo y páncreas, pero la mayor parte de cadmio es excretado en las heces. Después de la administración diaria durante un lapso de 6 semanas, el cadmio aparece en cantidades apreciables en la orina, encontrándose la presencia de una proteína de bajo peso molecular (20,000 a 30,000). La proteinuria por el cadmio clínicamente es muy importante, se debe alejar al paciente del ambiente tóxico.

El cloruro de cadmio (CdCl_2) inhalado se acumula en el hígado, en cambio, el polvo de sulfuro de cadmio (CdS) es insoluble, permanece casi íntegro en los pulmones. En cambio, el óxido de cadmio (CdO) es absorbido por el pulmón o el tracto gastrointestinal y son suficientes para ser considerados muy peligrosos.

Aproximadamente el 10% de 200 a 400 mcg de cadmio ingerido normalmente en el alimento y en agua diariamente, se ha sabido que es excretado en la orina. Alrededor de 3 mcg/día son retenidos en el cuerpo, de los cuáles 1 mcg es confinado al riñón (9,29,36).

El cadmio es importante solamente como veneno, ya que no es un elemento esencial para los seres vivos. Su toxicidad por vía oral es alta, pero si hay vómito disminuye el peligro (9).

La ingestión continua en ratas, conejos, o perros conducen a una severa anemia hiperocrómica, que retarda el crecimiento.

Alimentos o líquidos preparados o conservados en recipientes con cadmio, aún durante lapsos de hora y media, pueden causar envenenamiento por vía oral.

Los síntomas de gastritis son violentos. Aparecen rápidamente (15 a 30 minutos) acompañados por calambres o náuseas, vómitos, diarrea, debilidad y pérdida de conocimiento.

Los utensilios de cadmio plateado nunca deberán ser usados. En la industria la intoxicación se produce por inhalaciones de polvos de óxido de cadmio o vapores en la manufactura de cadmio, acero cadmio plateado, cuando el cadmio se volatiliza y funde en forma de vapores de óxido de cadmio (CdO).

El envenenamiento de cadmio por inhalación es peligroso. El máximo límite tolerable para las exposiciones del cadmio es de 0.1 mg/m^3 .

En la intoxicación aguda por ingestión hay gastroenteritis aguda grave por inhalación, irritación de la mucosa respiratoria, con disnea, tos y expectoración a veces sanguinolenta, sensación de ardor torácico y a veces náuseas y vómito. Después, de un período de latencia de 20 a 36 horas, suele aparecer edema de pulmón.

La intoxicación crónica es más frecuente en las mujeres, y los síntomas pueden manifestarse después, de entre dos y diez años. Puede

haber rino-faringitis crónica que suele ocasionar la pérdida del olfato, enfisema, astenia, cefaleas y vértigos. Además, hay un ribete gingival amarillo dorado, anemia leve y lesiones óseas que reproducen el síndrome de Milkman, vale decir, una osteosis dolorosa con pseudofracturas (9).

La toxicidad crónica severa está asociada con graves daños al riñón, y aparece en la orina proteína del suero (albúmina).

Los niveles de proteína en la orina de 40 trabajadores variaron de 70 a 2,600 mg/día aumentando con la duración al empleo (la exposición de proteína promedio es de 50 mg/día).

La metalotioneína (una proteína) que contiene 5.9% de cadmio, - 2.2% de zinc y 8.5% de azufre ha sido aislada de la corteza renal equina, cerca del 25% de los residuos de aminoácidos son de cisteína, - la cual tiene sitios de unión para los metales (9,36).

El envenenamiento por cadmio puede estar combinado con una inhibición de sulfhidrilos en contenido de enzimas.

También se cree que el cadmio tiene relación con la hipertensión ocasionada por la proporción más alta de cadmio/zinc en el riñón (36).

III METODOS

INTRODUCCION

En la determinación de metales pesados, las cantidades de muestra utilizadas son muy pequeñas, por este motivo, los métodos deben ser sensibles, precisos y exactos, además, los reactivos que se empleen tienen que estar exentos de metales, así como el material que se vaya a utilizar.

En el laboratorio clínico es necesario tomar en cuenta dos pasos importantes: primero, la toma de muestra debe recogerse de una manera adecuada para que no esté contaminada y no afecte los resultados; segundo, se deben efectuar varios tipos de análisis para fines eliminatorios o confirmativos.

De los metales pesados el plomo es el que tiene mayor importancia, debido a la cantidad de industrias que manejan dicho metal.

III.1 TOMA DE MUESTRA PARA METALES PESADOS

Para la toma de muestra, se deben tener cuidados para que no haya problemas de contaminación. Los frascos de Pyrex o de polietileno se deben lavar con ácido nítrico al 1% y enjuagarse con agua deionizada varias veces, con el fin de quitar el exceso de metal. El lavado del material se debe tomar en cuenta para la determinación de meta

les pesados, ya que el material de vidrio que debe usarse, es el de borosilicato con bajo contenido de álcali, el cual está exento de metales pesados.

El tipo de muestra que se requiere para el análisis depende del agente tóxico presente, que en este caso es la sangre y la orina, siendo importante la orina de 24 horas. Pero en caso de emergencia se puede tomar una muestra de orina al azar. Se deben iniciar lo más pronto posible los procedimientos analíticos después de la obtención de la muestra. Si esto no se lleva a cabo y la colección de la muestra es lenta en comparación con las necesidades del procedimiento, se corre el riesgo de que el resultado que se obtenga sea negativo, ya que la sustancia tóxica se encuentra entre los niveles límites de detección para el método analítico, o bien, puede sufrir cambios metabólicos. Otro factor que debe ser considerado, es la administración anterior de otros antídotos que podrían complicar el análisis debido a las interferencias.

El químico debe ser muy cauto en el manejo de material ya que son sustancias desconocidas. Se deben tener precauciones porque puede existir la posibilidad de que el compuesto tóxico pueda ser encontrado cerca del paciente, en la sangre o en la orina.

Solamente debe usarse una parte de la muestra para un análisis, ya que pueda ser requerido para otras pruebas confirmatorias.

Debe usarse un control normal en el procedimiento analítico ya

que es esencial para obtener resultados seguros. Existen a la venta algunas sustancias estándares de los compuestos tóxicos. Hay controles químicos de orina que contienen cantidades conocidas de arsénico, plomo y mercurio.

La toma de muestra para la determinación de metales pesados en orina y sangre tienen que efectuarse directamente en recipientes o tubos limpios.

III.2 PLOMO

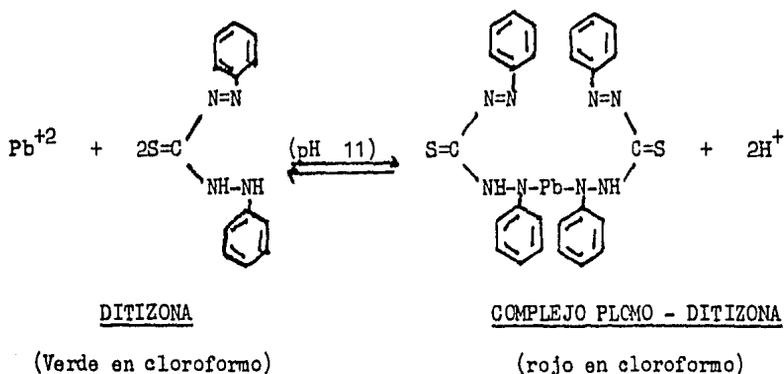
1) DETERMINACION COLORIMETRICA DEL PLOMO

FUNDAMENTO:

El plomo (Pb^{+2}) forma un complejo de color rojo, con la difeniltiocarbazona (ditizona), soluble en varios solventes orgánicos como el cloroformo. Las interferencias con otros metales como el cobre, hierro, plata, mercurio, cadmio, estaño, cobalto, bismuto y talio se eliminan por el uso de agentes formadores de complejos y efectuando extracciones con pH controlados (pH 11) con la presencia de cianuro.

La ditizona inerte es removida con una solución de hidróxido de amonio (HN_4OH) y cianuro, permaneciendo el complejo rojo en la fase -

clorofórmica, el cual se determina espectrofotométricamente a una longitud de onda de 510 nm. El procedimiento se realiza en tubo de vidrio con tapón, por lo que se elimina el uso de embudos de separación y las transferencias de soluciones de embudo a embudo, evitando así la pérdida de muestra. La reacción de plomo con la ditizona se representa como sigue:



REACTIVOS

1) Reactivos para la digestión.

Mezclar cuidadosamente 25 volúmenes de ácido nítrico concentrado y 10 volúmenes de ácido sulfúrico concentrado. Este reactivo debe prepararse antes de usarse.

2) Acido perclórico:

Al 70% (p/v). Guardar en el refrigerador

3) Hidróxido de amonio concentrado.

4) Rojo de fenol:

Al 0.10% (p/v). Guardar la solución en un frasco gotero de plástico.

5) Solución de ditizona:

Disolver 30 mg. de difeniltiocarbazona (ditizona) en un litro de cloroformo bidestilado. Guardar esta solución en un frasco ámbar y refrigerar, pero antes de usarla debe dejarse en temperatura ambiente.

Para tener el cloroformo bidestilado, se disuelven 0.5 g. de ditizona en 2 litros de cloroformo, destilar y desechar los primeros 100 ml del destilado y coleccionar aproximadamente 1800 ml.

6) Solución amortiguadora.

Disolver 118 g. de citrato de amonio dibásico $(\text{NH}_4)_2\text{HC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ en agua. Enfriar a temperatura ambiente y adicionar 75 ml de hidróxido de amonio concentrado y diluir a 250 ml con agua. Enfriar a temperatura ambiente y adicionar 5 g de cianuro de potasio (KCN muy venenoso), y 2.5 g. de sulfito de sodio anhidro (Na_2SO_3). Se extrae la solución amortiguadora con la solución de ditizona hasta la fase clorofórmica y esta debe permanecer de color verde. Añadir 500 ml de hidróxido de amonio concentrado. Esta solución es estable a temperatura ambiente.

Todo el procedimiento anterior se debe desarrollar en un matraz de borosilicato. Acompañar la extracción con 2 ml. de una alícuota de

ditizona. Aspirar la fase cloroformo-ditizona y así separarla de la - fase acuosa, colocar la primera fase en un embudo y burbujear aire - con objeto de eliminar amoniaco. (Los extractos pueden permanecer sin color con la presencia de amoniaco).

7) Reactivo de lavado

Disolver 5 g. de cianuro de potasio (muy venenoso) en 250 ml de hidróxido de amonio concentrado y diluir a 500 ml con agua. Esta solución es estable a temperatura ambiente, si se guarda en recipientes - de borosilicato.

8) Solución patrón de plomo.

1.0 mg/ml. Disolver 0.183 g. de acetato de plomo trihidrato, - $Pb(C_2H_3O_2)_2 \cdot 3H_2O$, en agua que contenga 1 ml de ácido acético glacial y diluir exactamente a 100 ml de agua. Esta solución es estable a temperatura ambiente, debe guardarse en recipientes de plástico bien cerrado.

9) Estándares de trabajo.

4.0 y 8.0 mcg Pb/100 ml. Estos estándares se preparan, sólo - cuando vayan a usarse, de una dilución 1:50 con agua de la solución - patrón de plomo. Se utilizan alicuotas de 2.0 y 4.0 ml. (corresponden a 4.0 y 8.0 mcg Pb/ml) en el paso número 2 de la técnica.

TECNICA

1) En un tubo de borosilicato de 25 X 200 mm, pipetear 2 ml. de san-

gre heparinizada o 10 ml de muestra de orina.

- 2) Marcar cada tubo, el de la muestra, estándares y Blanco. Adicionar a cada uno 10 ml de agua.
- 3) Agregar a todos los tubos 5 ml del reactivo de digestión y 3 perlas de vidrio de aproximadamente 5 mm de diámetro.
- 4) Calentar los tubos sobre una parrilla dentro de una campana, hasta la aparición de vapores blancos. Quitar de la parrilla los tubos y esperar a que estén a temperatura ambiente. En esta etapa la sangre se torna color café obscuro, la muestra de orina es de color amarilla y el blanco y los estándares son incoloros. Añadir 0.6 ml. de ácido perclórico a cada tubo y cubrirlo con un vaso de 50 ml. Se recomienda adicionar de 1-2 ml de la mezcla de ácido nítrico y ácido perclórico.
- 5) Volver a calentar cada tubo. En las muestras aparecen los siguientes cambios: De amarillo se vuelve incoloro, después otra vez amarillo con espuma, y finalmente, incoloro. El remanente del digerido de la sangre permanece amarillo muy claro. En este punto la digestión es completa. A veces con la orina la solución se torna incolora cuando se adiciona el ácido perclórico, por lo que debe seguirse calentando cuando se está en la fase de amarillo y espumoso, hasta que la solución quede incolora, ya que así la digestión es completa. Enfriar los tubos a temperatura ambiente. Adicionar 5.0 ml de agua al residuo enfriado y repetir la digestión. Así se asegura la eliminación de óxi -

dos volátiles.

6) Agregar a cada tubo 5 ml de agua, seguida de la adición de 4 ml de hidróxido de amonio concentrado, gota a gota, agitando constantemente. Esperar que la mezcla se enfríe y añadir una gota de rojo de fenol. Si la solución fue neutralizada lo suficiente, entonces permanecerá de color rojo.

7) Adicionar 10 ml de la solución amortiguadora a cada tubo (en frío) después de un minuto se adicionan 3 ml de la solución de diti-zona.

8) Tapar todos los tubos con un tapón de vidrio, y durante 20 minutos agitar vigorosamente.

9) Eliminar el sobrenadante acuoso con pipeta capilar y una perilla.

10) Adicionar 10 ml del reactivo de lavado, agitar de nuevo hasta que la solución sea translúcida y remover el sobrenadante por aspiración; nuevamente se observa la separación suficiente de la fase acuosa.

11) Humedecer unos 7 cms. de cloroformo, un papel filtro Whatman # 541 y filtrar la solución final de cloroformo del paso 10, colocar en celda. Tapar rápidamente.

12) Determinar la absorbancia del blanco, de los estándares y de las muestras. Se leen a 510 nm, contra el blanco de cloroformo. El color permanece estable durante 24 horas, pero es conveniente obtener las lecturas de absorbancia lo más pronto posible, con el objeto de evitar errores por evaporación del cloroformo.

CALCULOS

SANGRE:

$$\text{mcg Pb/100 ml} = \frac{A_m - A_{bco}}{(A_h \text{ mcg est} - A_{bco}) + (A_g \text{ mcg est} - A_{bco})} \times 12 \times \frac{100}{2}$$

A_m = Absorbancia de la muestra

A_{bco} = Absorbancia del bco.

A = Absorbancia

ORINA:

$$\text{mcg Pb/24 horas} = \frac{A_m - A_{bco}}{(A_h \text{ mcg est} - A_{bco}) + (A_g \text{ mcg est} - A_{bco})} \times 12 \times \frac{\text{ml/24 hr.}}{10}$$

A_m = Absorbancia de la muestra

A_{bco} = Absorbancia del bco.

A = Absorbancia

Usando una celda de 1 cm. La gráfica de absorbancia contra concentración, debe dar una curva lineal, por debajo de los 10 mcg de plomo, corresponden aproximadamente una concentración de sangre u ori-

na a 500 mcg por 100 ml de sangre o a 1000 mcg por litro de orina. La cantidad de ditizona usada es suficiente para reaccionar con el plomo urinario, si aumenta la concentración a 1500 mcg por litro. Pero a este nivel las absorbancias no son medibles. Las soluciones pueden ser diluidas con cloroformo y leer sin error. El total en el blanco equi-vale aproximadamente a 1 mcg de plomo.

VALORES DE REFERENCIA

Sangre	1 - 60 mcg/100 ml.
Orina	0 - 75 mcg/1

2) DETERMINACION DE PLOMO POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA

FUNDAMENTO:

Los principios de absorción atómica están basados en los siguientes puntos: 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.

En la espectrofotometría de absorción atómica la muestra por analizar se transforma en un vapor atómico en la que la mayor parte - de los átomos están en su estado fundamental, no excitado, no ioniza- do (40).

En este método, la muestra no se analiza directamente, sino que hay procedimiento de separación y extracción cuando es necesario, produciéndose una precipitación de iones polivalentes, pero especialmente plomo, con la presencia de bismuto, pueden ser cuantificados y simultáneamente extraídos de los fluidos biológicos. Uno de los aspectos más importantes de este procedimiento es que iones de sodio, potasio y cloro no precipitan y son eliminados antes del análisis. Esto ayuda a minimizar las interferencias y dando un modelo analítico adecuado.

APARATO:

Se utiliza un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer modelo 303 con registrador de gráfica en tira y con los siguientes ajustes:

- a) Un monocromador que se coloca a 283.3 nm. (es la línea de absorción del plomo.
- b) Una flama de aire de acetileno a un porcentaje de flujo 1:1, con mechero del tipo premix Boling.
- c) flujo de muestra, 4 a 6 ml/min, tiempo de aspiración de 15 a 30 segundos.
- d) Una lámpara # 154-0 de catodo hueco con corriente de 6 miliamperios.
- e) Un registrador.

El aparato requiere calentarse 30 minutos antes del análisis.

REACTIVOS:

- 1) Acido perclórico al 70% (HClO_4)
- 2) Acido Clorhídrico 6M (HCl)
- 3) Acido nítrico 69-71% (HNO_3)
- 4) Hidróxido de amonio (NH_4OH) Densidad relativa 0.92
- 5) Reactivo de precipitación: Solución de bismuto metálico -
100 g/l

- a) Lavar el bismuto metálico con acetona, enjuagar con agua destilada, y secar. Pesar 10 g en 100 ml en un vaso de teflón.
- b) Humedecer el bismuto con 0.5 ml. de agua deionizada, lentamente agregar 20 ml de ácido nítrico: 1 ó 2 ml; 1 ó 2 - al mismo tiempo. Con precaución porque la reacción es vi lenta.
- c) Cuando la reacción cesa, decantar el líquido sobrenadante en un vaso de teflón. Lentamente agregar de 10 a 20 ml. de ácido nítrico al bismuto remanente.
- d) Repetir el paso anterior hasta que los 10 g. de bismuto - sean completamente disueltos (se requieren cerca de 60 ml de ácido nítrico).
- e) Transferir el líquido del paso anterior a un matríz volumétrico de 100 ml (lavado previamente con ácido) y agre--gar ácido clorhídrico 6M hasta el aforo.

f) Transferir esta solución a una botella de polietileno con tapa. Este reactivo puede ser usado por un año.

6) Estándares de plomo:

a) Solución patrón al 1%. Disolver con agua exenta de plomo 1.5986 g. de nitrato de plomo desecado previamente. Si la solución se encuentra ligeramente turbia o si se precipita, agregar unas cuantas gotas de hidróxido de amonio. Diluir a 100 ml. y transferir inmediatamente a una botella de polietileno seco, esta solución es estable por seis meses. La concentración de plomo de este estándar es de 10 mg/100 ml.

b) Estándares intermedios. Diluir la solución anterior 1: 100 para preparar una solución estándar de 100 mcg/ml. Esta solución almacenada en botella de polietileno, cerradas y a temperatura ambiente, es estable por un mes.

c) Estándares de trabajo. Preparar los estándares de plomo a concentraciones de 0.1, 0.2, 0.5, y 1.0 mcg de Pb/ml cada vez que se vaya a realizar el análisis.

Las diluciones de los estándares de plomo permanecen estables por lo menos 3 horas, ya que el plomo es rápidamente absorbido en las superficies de los recipientes de plástico y de vidrio. La exposición a la luz, particularmente a la ultravioleta, puede acelerar la reacción.

7) Reactivo para la digestión. Mezclar cuidadosamente volúmenes iguales de ácido perclórico y nítrico, transferir esta solución a una botella de polietileno previamente lavada con ácido.

PLOMO EN SANGRE

TECNICA

La sangre puede ser recibida en tubos especiales libres de plomo como los tubos de VACUTAINER, o en tubos limpios exentos de metales. No agregar heparina ni otro anticoagulante.

- 1) Pesar en un vaso de 100 ml recubierto de teflón de 2 a 3 g de sangre.
- 2) Colocar el vaso en una parrilla, regulando la temperatura a 150°C. Y por cada gramo de sangre agregar 2 ml de reactivo para la digestión, cubrir con un vidrio de reloj (recubrimiento de teflón) para prevenir la pérdida de plomo.
- 3) A un vaso de 100 ml recubierto de teflón, agregar la misma cantidad del reactivo para la digestión usada en paso anterior, y evaporar a sequedad. Esto servirá como parte del blanco, para controlar una posible contaminación de los reactivos.
- 4) Observar el proceso de digestión de la sangre en intervalos de 2 a 3 minutos.

Conforme la digestión vaya progresando, el líquido se irá oxidan

do y se tornará de color amarillo paja. Los vapores de ácido nítrico son café amarillentos y después se volverán más claros. Agregar - 0.5 a 1.0 ml. del reactivo para la digestión para completar la digestión. No sobrecalentar la muestra porque se puede carbonizar. Al final de la digestión se forma un vapor blanco denso que se elimina en un tiempo de 3 a 5 minutos. En este tiempo la solución se tornará clara y de color amarillo brillante. Evaporar esta solución lentamente hasta dejar aproximadamente 0.5 ml. de la solución.

5) Transferir los 0.5 ml del paso anterior a un tubo de centrífuga cónico de 50 ml. Con agua exenta de plomo, enjuagar varias veces un vaso recubierto con teflón y transferir la solución al tubo de centrífuga, adicionar agua hasta llegar a un volumen de 25 ml.

Estos tubos de centrífuga deben estar graduados en intervalos de 5 ml.

6) Agregar 2 ml de hidróxido de amonio a cada uno de los tubos anteriores, al blanco y a las soluciones estándares de 0.25, 0.5, y 1 mcg de plomo por ml. Ajustar el pH entre 8.5 a 9.0 y adicionar unas cuantas gotas de hidróxido de amonio.

7) Agregar 0.3 ml. del reactivo de bismuto a cada tubo.

8) Agregar agua exenta de plomo hasta llegar a un volumen de 50 ml. Agitar.

9) Centrifugar durante 5 minutos a 3000 rpm y desechar el sobrenadante.

10) Disolver el precipitado en 2 ml de ácido clorhídrico 6M, usar un agitador tipo Vortex, un alambre de platino, o una varilla de teflón para desprender el precipitado.

11) Leer los estándares de plomo que contienen 0.25, 0.5 y 1.0 mcg. - de plomo/ml. Leer el blanco y las muestras de sangre. Después de una tercera determinación de sangre, leer una solución estándar.

12) Reducción de datos. La gráfica de transmitancia contra concentración debe ser lineal hasta 1 mcg de Pb/ml. No es necesario convertir la transmitancia a absorbancia en este rango de concentración. El valor desconocido puede ser leído directamente de la gráfica.

CALCULOS

$$\text{mcg de Pb/g de sangre} = \frac{(\text{valor del est-bco})(\text{vol. final})(\text{ml})}{\text{peso de la muestra en g}}$$

El total del blanco no debe exceder del 5% de la cantidad de plomo presente en la sangre. Grandes correcciones en el blanco denotan la presencia excesiva de contaminación de plomo en los reactivos. Para propósitos prácticos, se asume que 1 ml del estándar pesa exactamente 1 g.

VALORES DE REFERENCIA:

Sangre 40 - 60 mcg/100 ml.

PLOMO EN ORINA

TECNICA

La muestra de orina debe ser clara y libre de compuestos precipitados antes del análisis. Para lograrlo, la muestra se centrifuga y se toma una alícuota representativa del sobrenadante, el plomo usualmente se encuentra en las dos fracciones.

- 1) Transferir 50 ml de la orina, tomada a las 24 horas (colectada en un recipiente de polietileno), a un tubo de centrifuga cónico de 50 ml.
- 2) Agregar 0.2 ml. del reactivo de precipitación de bismuto.
- 3) Agregar 0.5 ml de hidróxido de amonio (el pH se debe ajustar a -
- 8.5) agitar bien y centrifugar durante 5 minutos a 3000 rpm.
- 4) Eliminar el sobrenadante.
- 5) Agregar 1 ml. de ácido clorhídrico 6M
- 6) Mezclar con un agitador tipo Vertex, o con un alambre de platino.
- 7) Diluír a 5 ml con agua libre de plomo, para tener una concentración de 10 tantos comparada con la orina original, 6 a 2 ml. para te

ner una concentración de 25 tantos.

8) Preparar el blanco, sustituyendo la orina por agua en el paso 1 y seguir el paso 7.

9) Leer en el espectrofotómetro los estándares de 0.1, 0.2, 0.5 y 1.0 mcg de plomo/ml para cubrir todo rango de los valores anormales de 10 tantos de concentración.

Ajustar los estándares a la concentración final de la orina a 25 tantos de concentración, usando 0.2, 0.5, 1.0 y 2.0 mcg de Pb/ml.

10) Leer el blanco y las muestras de orina. Después de cada 3 muestras de orina, leer una solución estándar y terminar el análisis repitiendo el paso 9.

11) Reducción de datos. Seguir el mismo procedimiento antes descrito, para el análisis de la sangre.

CALCULOS:

$\text{mcg Pb}/24 \text{ h} = (\text{Valor del est-corrección del bco})$

X vol. de orina inicial (50ml)

vol. final (5 ml)

X Vol. de orina de 24 horas (ml)

VALORES DE REFERENCIA:

Orina - menor de 100 mcg/24 horas.

3) DETERMINACION DE PLOMO EN SANGRE POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA CON EL USO DEL HORNO DE GRAFITO.

FUNDAMENTO:

Se basa en el principio de absorción atómica. Con la atomización en horno de grafito esto se logra sin flama, y se realiza introduciendo la muestra en un horno de grafito resistente a altas temperaturas, y protegido de la oxidación por una atmósfera de gas inerte. Debido a que el carbón sublima hasta 3800°C . las temperaturas en horno pueden ser mayores que las de la flama. También se cuenta con un programa de control de temperaturas, cuyas fases son tres: En la primera etapa se pretende eliminar el agua de la muestra por ebullición. En la segunda, se elimina la matriz de la muestra, como por ejemplo, la materia orgánica si se trata de material biológico. La tercera fase es la de producción del vapor atómico.

APARATO

Se utiliza un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer modelo 503 con horno de grafito.

- a) un corrector de fondo de deuterio
- b) una lámpara de arco de deuterio
- c) Una longitud de onda de 283.3 nm .
- d) un registrador

e) Flujo interno de gas puro de nitrógeno. 15 ml/min.

f) Las siguientes temperaturas:

Secado 98°C

Carbonizado 525°C

Atomizado 2300°C

REACTIVOS

Debe usarse agua deionizada en todo el proceso.

1) Acido nítrico

2) Agente tensoactivo. (Tritón X-100). Se prepara una solución acuosa de 1 ml/1

3) Solución patrón de plomo. 1000 mg/ml.

4) Estándares de trabajo: 0, 50, 100, 150 y 200 mcg/1. Se preparan -- con ácido nítrico (5ml/1) con la dilución de la solución patrón. Con la dilución de la muestra de los 5 tantos los estándares de trabajo -- corresponden: 0, 250, 500, 750, y 1000 mcg de plomo por litro en la -- muestra original.

TECNICA

1) La sangre total se diluye, por fuerte agitación mecánica, con una solución de Tritón X - 100 al 0.1%, la dilución que debe hacerse es de 1: 5.

APARATO

Espectrofotómetro de absorción atómica modelo Varian Techtron 5.

- a) Un atomizador de varilla de carbón modelo 63 (Varian Techtron).
- b) Dos celdas diferentes para las muestras construídas de grafito y - recubiertas con grafito pirolítico.
- c) A las celdas se les pasa nitrógeno a una velocidad de flujo de - 4.51 l/min para prevenir la entrada de oxígeno atmosférico.

REACTIVOS

- 1) Acido nítrico al 65%. Se utiliza para la reacción de oxidación y destrucción de la sangre.
- 2) Nitrato de plomo. En una solución de ácido nítrico al 1% para obtener una solución patrón de 1 g/l. Los estándares se preparan en el momento del análisis para las adiciones en serie de las diferentes - cantidades de solución patrón a las muestras de sangre.

TECNICA

Las muestras y estándares se tratan con heparina para prevenir - la coagulación de la sangre.

- 1) Se colocan 5 mcl de muestra en el tubo.
- 2) Se agregan 10 mcl de ácido nítrico.
- 3) Mezclar

4) Se pasa por tres fases sucesivas: secado, calcinación y atomización. (El atomizador realiza automáticamente las tres fases).

Se utiliza un tiempo constante de 0.01 segundo para el amplificador de respuesta rápida para el análisis de plomo.

Las condiciones experimentales para el análisis de plomo en sangre.

PARAMETROS DEL HORNO DE GRAFITO:

Secado	150°C	tiempo 20 segundos
Calcinación	530°C	tiempo 30 segundos
Atomización	1340°C	tiempo 4 segundos

VALORES DE REFERENCIA:

Sangre 10 - 40 mcg/100 ml.

5) DETERMINACION AUTOMATIZADA DE PLOMO EN SANGRE POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA ELECTROTERMICA.

FUNDAMENTO:

Es un método simple y rápido para la determinación de plomo en sangre por medio de espectrofotometría de absorción atómica electro-térmica. Aquí se tratan con alícuotas (25-200 mc1) de muestra, ya sea por punción capilar o venosa, con ácido nítrico para desproteiniza-

ción de la matriz. Después de centrifugar, se toma el análisis automatizado para plomo. El programa de temperatura ebreviado hace posible 370 mediciones por día y la computadora permite acoplar una evaluación inmediata de datos durante los programas, haciendo posibles mediciones de rutina.

APARATO

El aparato de absorción atómica, se equipa de los siguientes instrumentos:

- a) Un horno de grafito HGA 74 y HGA 76
- b) Automuestrador (Perkin-Elmer AS-1).
- c) Impresor UP-1
- d) Registrador PE 56. Se combina con dispositivo M 400 con un sistema PDP 11/10 para la evaluación de datos.

REACTIVOS

Argón al 99.999% de pureza, que se utiliza hasta el final.

TECNICA

La muestra de sangre se colecta en tubos de vidrio perfectamente cerrados con tapones de hule a los que previamente se les añade unas gotas de solución de heparina.

- 1) Agregar de 150 ó 300 mcl de ácido nítrico 2N
- 2) Agregar 100 ó 200 mcl de sangre fresca.

- 3) Agregar 150 ó 300 mcl de agua destilada
- 4) Agitar vigorosamente en un mezclador (Vórtex) por 30 segundos.
- 5) Centrifugar
- 6) Transferir el sobrenadante (1 ml) a una taza de muestra de poliolefin AS-1. (La Solución resultante es de 0.75 M en nitrato).
- 7) Se llevan a cabo tres inyecciones de 10 mcl cada una.

CONDICIONES ESTANDAR PARA EL PLOMO:

Aparato espectrofotómetro Perkin-Elmer 400 con un horno de grafito HGA-74 y 76.

Parámetros para el espectrofotómetro.

LAMPARA:

Lámpara de descarga sin electrodos de plomo (es una esfera de cuarzo en cuyo interior se encuentra el elemento a determinar colocándolo en una atmósfera de gas inerte; en este caso, argón).

CORRIENTE: 10 mA

CORRECCION DE FONDO: Lámpara de arco de deuterio.

LONGITUD DE ONDA: 283.3 nm

ABERTURA: 0.7 mm

PARAMETROS PARA EL HORNO DE GRAFITO:

SECADO	Temperatura	100°C	tiempo 30 a 60 segundos
CALCINACION	Temperatura	600°C	tiempo 30 segundos
ATOMIZACION	Temperatura	2200°C	tiempo 5 segundos

LAVADO Temperatura 2600°C tiempo 2 segundos

Para obtener los valores de concentraciones de las muestras se -
corren soluciones estándares de concentración conocida, se determina
de esta manera una curva de calibración.

VALORES DE REFERENCIA:

Sangre 10 - 20 mcg/l

6) DETERMINACION DIRECTA DE PLOMO EN SANGRE Y ORINA POR ESPECTROFOTO-
METRIA DE ABSORCION ATOMICA SIN FLAMA.

FUNDAMENTO:

Antes del análisis las muestras son diluídas con solventes, no -
es necesaria la previa digestión con ácido nítrico. Las muestras son
precalcínadas en microvasos de grafito en un horno ordinario de labo-
ratorio. De esta manera el plomo es determinado directamente.

APARATO:

Espectrofotómetro de absorción atómica equipado.

- a) Con una hornilla de grafito IL 55
- b) Un graficador Philips PM 8202
- c) Una lámpara de deuterio (para corrección de la línea base).
- d) Dos tubos de grafito: uno cilíndrico para la inyección directa de
la muestra, otro rectangular que se utiliza en conjunción con las

muestras, colocadas en los microvasos de grafito.

REACTIVOS

El agua que se utilice en la preparación de los estándares y las soluciones matriz debe ser destilada y deionizada.

- 1) Las soluciones matriz
 - a) Nitrato de amonio (NH_4NO_3)
 - b) Fluoruro de amonio (NH_4F)
 - c) Fosfato ácido de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

Cada uno tiene una concentración de 10 g/l, se trata con ditiocarbamato pirrolidin amonio, como agente complejante y se extrae con metil, isobutilcetona. El plomo no podrá ser detectado con la solución matriz, sino después del procedimiento de extracción.

- 2) Tritón X-100 (agente tensoactivo).

PLOMO EN SANGRE

- 1) Agregar 20 mcl de tritón X-100 (10 ml/l en agua).
- 2) 10 ml de sangre.

Antes del análisis completar la hemólisis de los eritrocitos.

Las muestras de sangre que se tienen con una cantidad conocida de plomo se usan como estándares.

Para las mediciones de absorción atómica se utiliza el tubo de grafito rectangular, precalcinando las muestras en los microvasos.

- 1) Agregar 25 mcl de la solución de Tritón X-100 a los microvasos.
- 2) Agregar ,posteriormente 2 mcl de la muestra de sangre.

Las muestras se colocan en una placa de titanio y esta se coloca en el horno. Las muestras se secan a 100°C y se calcinan a 500°C. Estos dos procesos requieren aproximadamente 5 minutos. De acuerdo al programa de temperatura se analizan las muestras en el espectrofotómetro de absorción atómica.

VALORES DE REFERENCIA:

Sangre 200 mcg/l.

PLOMO EN ORINA

Tomando en cuenta que el contenido orgánico de la orina no es tan alto como el de la sangre, no es necesario consumir mucho tiempo para la precalcinación de la muestra. Pero en cambio, tiene alto contenido de sales que pueden interferir en el proceso de automatización. Para prevenir dicha interferencia en el proceso, adicionar una solución de nitrato de amonio, es el tratamiento de la muestra.

- 1) Colocar 10 mcl de la solución matriz en los microvasos.
- 2) Agregar 10 mcl de la muestra de orina.

Los microvasos se colocan en el horno, las muestras se secan a 100°C y se calcinan a 350°C . Se analizan en el espectrofotómetro de absorción atómica.

VALORES DE REFERENCIA

Orina 8 - 40 mcg/l

7) DETERMINACION DE PLCMO EN ORINA POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORCION ATOMICA CON ATOMIZACION ELECTROTERMICA.

FUNDAMENTO:

El pretratamiento de la muestra es mínimo, involucra la adición de ácido ortofosfórico y un pretratamiento del tubo de carbón con molibdato de amonio. Esto se lleva a cabo para minimizar las interferencias que se encuentran cuando se analiza la orina.

APARATO

Se usa un espectrofotómetro de absorción atómica (Varian 175 B)

- a) Un atomizador CRA-90
- b) Un sistema de inyección automático ASB-53
- c) Un agitador Denley Espiramix 5
- d) Plato de calentamiento.

Los elementos para el calentamiento eléctrico deben ser coloca-

dos en la base del bloque, y la temperatura debe ser controlada. La superficie del bloque se debe mantener a 40°C .

Los recipientes que se usen deberán ser de vidrio de borosilicato recubierto de capas de polietileno para preparar la muestra.

REACTIVOS

1) Solución de molibdato al 5% p/v. Disolver 5 g de molibdato de amonio en 60 ml de agua desionizada, agregar 5 ml de ácido ortofosfórico, mezclar y transferir a un matraz aforado a 100 ml y llevar al aforo con agua desionizada.

2) Solución de ácido ascórbico al 1% p/v. Disolver 6.25 g. de ácido ascórbico con agua desionizada y llevar al aforo de un matraz volumétrico de 25 ml.

3) Diluyente de la orina. Aproximadamente 60 ml de agua desionizada contenida en un matraz volumétrico de 100 ml, agregar 5 ml de la solución al 1% de molibdato de amonio y 2 ml de ácido ortofosfórico, agitar y agregar 1 ml de la solución de ácido ascórbico, aforar y agitar. La solución toma un color azul.

4) Solución de iodo IN. En un matraz volumétrico de 100 ml. disolver 16.6 g de yoduro de potasio en aproximadamente 80 ml de agua desionizada, agregar 12.7 g de iodo y agitar hasta lograr la disolución. Aforar con agua desionizada y volver a agitar.

5) Solución estándar de plomo. Disolver 0.1599 g de nitrato de plomo

en aproximadamente 80 ml de agua desionizada, agregar 1 ml de ácido nítrico concentrado y destilado. Transferir cuantitativamente la solución a un matraz volumétrico de 100 ml. aforar con agua desionizada y agitar. Esta solución contiene 1 mg/ml de plomo.

6) Dilución de la solución estándar de plomo. Transferir 125 mcl. de la solución estándar a un matraz volumétrico de 25 ml. conteniendo aproximadamente 20 ml. de agua desionizada, aforar y agitar. Esta solución contiene 5 mcg/l de plomo.

TECNICA

a) Acondicionamiento de tubos;

Adaptar un tubo de carbón al CRA 90. Se deben establecer los siguientes parámetros del espectrofotómetro (condiciones estándar de plomo).

Espectrofotómetro 175 B Varian

Longitud de onda	283 nm
Lámpara de cátodo hueco	5 mA
Lámpara de hidrógeno	intensidad para balancear
Expansión	Bajo 5
forma	concentración de picos

ATOMIZADOR GRA-90

Secado 100°C en 60 segundos

Calcinación	900°C en 40 segundos
Atomización	2100°C en 6 segundos

INYECTOR AUTOMATICO ASD-53

Capacidad	5 mcl
Número de inyecciones	5

Transferir a un vaso de vidrio limpio 1.5 ml de la solución de molibdato de amonio al 5%. Colocarla en la posición 24 del carrusel del inyector para iniciar el programa.

Leer la absorbancia. En el curso de la repetición de las inyecciones, la señal base debe estabilizarse en un valor cercano a cero. Leer la absorbancia correcta.

b) Calibración

Cambiar los siguientes parámetros del instrumento:

Atomizador	2100°C tiempo de retención 2 segundos
------------	---------------------------------------

Inyector automático ASD-53

Número de inyecciones	3
-----------------------	---

En cinco vasos de vidrio limpios pipetear 0, 5, 10, 15, y 20 - mcl de la solución estándar de plomo, la cual representa 0, 50, 100, 150 y 200 mcg de plomo por litro de orina respectivamente.

A cada vaso agregar 20 mcl de la solución de iodo y 500 mcl de orina, la cual contiene los límites mínimos normales de plomo. En el plato de calentamiento de 5 a 10 minutos. Quitar las tazas del plato de calentamiento y adicionar 100 mcl del diluyente de la orina a cada vaso. Cubrir los vasos con polietileno y colocarlos en el agitador Denley durante diez minutos. Quitar la cubierta de polietileno de los vasos, y colocarlos secuencialmente en el carrusel del inyector automático para iniciar el programa. Los blancos contienen agua desionizada. Graficar las lecturas obtenidas contra mcg de plomo por litro y extrapolar en la gráfica para obtener el contenido de plomo en la muestra de orina usando este valor. Construir una curva de calibración, de tal manera que la línea obtenida pase por el origen.

c) Análisis de la muestra

- 1) En vasos perfectamente limpios agregar 20 mcl de la solución de iodo.
- 2) Agregar 500 mcl de la muestra de orina.
- 3) Calentar durante 5 a 10 minutos.
- 4) Quitar los vasos del calentador.
- 5) Agregar 1000 mcl del diluyente.
- 6) Tapar los vasos con polietileno y colocarlos en el agitador durante 10 minutos.
- 7) Quitar la cubierta de polietileno y colocar los vasos en el carrusel del inyector para iniciar el programa
- 8) Leer el contenido de plomo de la muestra de orina en la curva de calibración.

VALORES DE REFERENCIA

Orina 0 - 40 mcg/l

8) DETERMINACION DE PORFIRINAS

FUNDAMENTO:

En la orina se puede determinar porfirinuria en pacientes con envenenamiento por plomo. Es importante porque puede determinar la presencia o ausencia de coproporfirinas y uroporfirinuria, sin embargo, la medición cuantitativa del ácido delta-aminolevulínico es un criterio de diagnóstico. Para la determinación de porfirinas se requiere de análisis cuantitativos de varias porfirinas eliminadas en 24 ho--ras. Para poder hacer un diagnóstico adecuado, es importante observar el color de la orina, ya que si hay presencia de porfirinas en gran--des cantidades la orina tiene un color anormal vino característico.

Las porfirinas emiten fluorescencia de color naranja, cuando se exponen a la luz ultravioleta de longitud de onda larga. Esta propiedad se utiliza para la detección y análisis de porfirinas.

REACTIVOS

- 1) Acido acético glacial
- 2) Eter dietílico, grado reactivo.
- 3) HCl al 50% (p/v) se diluyen 58 ml de HCl concentrado a 500 - ml. con agua.

MUESTRA:

Es preferible una muestra de orina reciente tomada al azar. Si --
ha de conservarse la orina durante la noche, se agrega 0.5 g. de --
 Na_2CO_3 /100 ml de orina.

PROCEDIMIENTO:

1) Se transfieren 10 ml. de orina a un embudo de separación del tipo --
Aquibb de 60 ml. con preferencia provisto de llave de paso de teflón --
y tapón de plástico.

2) Se acidifica la orina con 4.0 ml. de ácido acético. (Si la muestra
de orina contiene Na_2CO_3 se hace girar con cuidado el embudo hasta que
cesa el desprendimiento de gas).

3) Se agregan 20 ml. de éter, se tapa el embudo y se agita enérgicamen
te durante 4 ó 5 minutos. En este paso, la coproporfirina es extraída
en la fase de éter. Se desecha la capa acuosa (orina) y se reúnen en --
el segundo embudo los dos extractos etéreos.

4) Se agregan 2.0 ml de HCl al 5% al extracto etéreo combinado. Se agi
ta enérgicamente el embudo durante 4 minutos. En estas condiciones, más
ácidas, la coproporfirina pasa a la fase acuosa (HCl).

5) Después de separar las fases, se examina la fase de HCl (la porción
inferior del embudo) bajo una lámpara ultravioleta de longitud de onda
larga, en el cuarto oscuro o en un ángulo de la habitación, para ver
si aparece la fluorescencia característica de color naranjado rosado.
La lámpara económica "Black Ray" (luz Wurtz) es una fuente cómoda de

de UV, que emite una luz en torno de 360 nm.

INTERPRETACION:

RESULTADO NEGATIVO: No se observa fluorescencia, sólo se ve el color violeta del filtrado de la lámpara o fluorescencia de color azul claro o verde amarillento.

RESULTADO LIGERAMENTE POSITIVO: (1+). Fluorescencia acusada; en caso de duda la lectura se considerará negativa.

MODERADAMENTE POSITIVO: (2+). La fluorescencia es fuertemente evidente.

FUERTEMENTE POSITIVO: (3+). Fluorescencia muy brillante. Se obtendrán lecturas negativas, si el nivel de coproporfirina es inferior a 15 - mcg/100 ml. Las lecturas 1+, 2+, y 3+, reflejarán concentraciones de coproporfirinas de 15 a 25, 20 a 40, y de más de 50 mcg/100 ml, respectivamente.

9) DETERMINACION DEL ACIDO DELTA-AMINOLEVULINICO EN ORINA.

FUNDAMENTO:

La absorción y la intoxicación por plomo causan disturbios en la biosíntesis del grupo hemo, y uno de los precursores que es el ácido delta-aminolevulínico aumenta en la sangre y se elimina en la orina.

Se cuantifica por medio del reactivo de Ehrlich, dando un compuesto colorido que es proporcional a la cantidad de ácido delta-aminolevulínico que está presente en la orina.

REACTIVOS:

- 1) Solución amortiguadora de acetato de sodio (pH 4.6)
- 2) 2,4 pentanodiona (acetilacetona).
- 3) Reactivo de Ehrlich
- 4) Solución de ácido delta-aminolevulínico (25 mg en 100 ml)

TECNICA

- 1) A 1 ml. de orina, agregar 8.8 ml de la solución amortiguadora de acetato de sodio.
- 2) Agregar 0.2 ml de 2,4 pentanodiona
- 3) Poner en agua hirviendo durante 10 minutos
- 4) Dejar enfriar a temperatura ambiente.
- 5) Agregar 1 ml de reactivo de Ehrlich.
- 6) Leer a 555 milimicras en densidad óptica, llevándolo a cero de densidad óptica con el blanco de reactivos.
- 7) El tubo del blanco se prepara con 1 ml de orina y 9 ml de la solución amortiguadora de acetato de sodio.

Se corre una curva de calibración. Con una solución de ácido delta-aminolevulínico 0.25 mg/ml con una solución amortiguadora de acetato

to de sodio. El blanco se prepara con 1 ml de agua y 9 ml de la solución amortiguadora.

VALORES DE REFERENCIA:

ORINA:

Niños	0.58 mg/100 ml
Hombres	0.62 mg/100 ml
Mujeres	0.57 mg/100 ml

COMENTARIO ACERCA DE LOS METODOS

La ventaja que presenta la determinación colorimétrica es que --
bastan dos horas y media para analizar simultáneamente diez muestras,
que pueden digerirse al mismo tiempo.

Este método puede tener una serie de modificaciones, que repre--
senten una reducción en el tiempo de análisis y puede haber un mínimo
de contaminación y reducción de la sangre y orina que requiere el aná--
lisis.

La desventaja que tiene es lo complicado de su análisis, en el -
cual hay digestión de la muestra, empleándose gran cantidad de reacti--
vos y material. Por lo tanto, es costoso tanto en la labor como los -
materiales. También, como están basados en extracciones con solventes
después de realizar la complejación del plomo, con reactivos que con-

tienen grupos ditiocarbamatos, se ha investigado que las extracciones son incompletas.

El método por espectrofotometría de absorción atómica tiene la ventaja sobre el colorimétrico de la sencillez y rapidez.

Es un método exacto y preciso en la determinación de plomo, tanto en sangre como en orina, y por lo tanto, es confiable. Para dar una información valiosa en casos en que se sospeche envenenamiento por plomo.

En cambio, tiene la desventaja de presentar interferencia de varios compuestos orgánicos que contienen las muestras. La cantidad empleada de muestra es mayor con respecto a los métodos de absorción atómica sin flama.

Los métodos de espectrofotometría de absorción atómica sin flama con uso de horno de grafito, tienen una sensibilidad de mil veces más que los métodos de flama, lo que permite realizar análisis de elementos presentes en pequeñas cantidades. Se presentan menos interferencias. Y en algunos casos es posible determinar la muestra sin tratamiento previo, evitando la posible contaminación, reduciendo así la pérdida en la manipulación. El equipo es más barato que cualquier otro para el análisis de trazas.

Con recipientes de grafito se pueden preparar muchas muestras

y se calcinan simultáneamente de 10 a 20, y pueden ser analizados en una hora, incluyendo los estándares.

En los métodos para la determinación de porfirinas y el ácido -delta-aminolevulínico son importantes en la confirmación en los casos que se sospeche envenenamiento por plomo.

III.3 MERCURIO

1. METODO DE REINSCH

FUNDAMENTO:

En esta prueba se detecta la presencia de varios metales como arsénico, antimonio, bismuto y mercurio, en fluidos gástricos, sangre y orina. Se realiza una previa digestión del material biológico, un depósito de color gris plateado sobre el alambre de cobre, indica la - presencia de mercurio. Si al finalizar la reacción hay ausencia de algún depósito, debe hacerse la prueba confirmatoria. Este método es - cualitativo.

REACTIVOS:

1) Alambre de cobre de calibre # 20. Se hace espiral cerca de un 1/4 de pulgada de diámetro y 3/8 de pulgada de longitud. Se sumerge en ácido nítrico concentrado por un segundo, se enjuaga con agua deionizada, después con alcohol y finalmente con éter, y se deja secar.

2) Ioduro cuproso.

- a) Disolver 5 g. de sulfato de cobre y 3 g. de sulfato ferroso - en 10 ml de agua.
- b) Agitar constantemente. Agregar una solución de 7 g. de ioduro de potasio disuelta en 50 ml. de agua.
- c) Filtrar el precipitado y lavar con agua.
- d) Suspender el precipitado en ioduro cuproso con la ayuda de poca agua y transferir a una botella color ámbar.

3) Solución patrón de mercurio. Disolver 1.67 g. de nitrato mercúrico en agua, que contenga 2 ml de ácido nítrico y llevar a 1 litro. Esta solución contiene 1 mg/ml de mercurio. Es estable en una botella - de color ambar.

4) Papel impregnado con bromuro mercúrico. Remojar el papel filtro - Whatman # 40 en una solución de bromuro mercúrico al 5%, hecho en 95% de alcohol etílico por 2 minutos. Dejar secar.

5) Acido clorhídrico al 10% (v/v)

TECNICA:

1) Poner 20 ml de orina en un matrás Erlenmeyer de 50 ml. y agregar 4 ml de ácido clorhídrico concentrado.

2) Introducir el espiral de cobre y calentar poco a poco, por una hora en baño maría a una temperatura baja, (la temperatura de superficie debe ser aproximadamente de 95°C).

3) Mantener el volúmen constante, adicionar solución de ácido clorhídrico al 10%, durante el período de calentamiento. Es importante correr un blanco de orina normal y estándares hechos por la adición de 50 y 100 mg de mercurio, estas cantidades de mercurio se obtienen por el empleo de 0.5 y 1.0 ml ó 0.25 y 0.5 ml a una dilución de 1 : 10 de las soluciones patrón apropiadas dadas.

4) Después de 1 hora, remover el espiral, lavar con agua directamente, y secar con un pedazo de papel filtro.

5) Una coloración plateada en el alambre de cobre indica la presencia de mercurio (la sensibilidad es tan baja como 30 mcg).

PRUEBA CONFIRMATORIA

1) Colocar un pequeño pedazo de papel filtro, en un vidrio de reloj y agregar 2 gotas de la suspensión de ioduro cuproso.

2) Colocar el espiral de cobre usado arriba en el sitio de las manchas de ioduro cuproso y cubrir con un segundo vidrio de reloj.

3) Dejar en reposo 30 minutos y examinar de cerca. En la presencia de 50 mcg de mercurio, de cierto ioduro mercuríco aparecerá la formación de color rosa salmón en el líquido. El color producido se compara con el obtenido en los estándares.

2. DETERMINACION DE MERCURIO EN URINA

FUNDAMENTO:

El mercurio presente en la orina, es rápidamente reducido a mer

curio metálico por un sistema de cobre-hidrazina. El mercurio metálico finamente dividido, es oxidado después a ion mercuríco, por el permanganato ácido, a temperatura ambiente. El exceso de permanganato se destruye mediante el uso de clorhidrato de hidroxilamina. La determinación final se realiza con una técnica adaptada por Grieve, que consiste en una titulación con ditizona.

REACTIVOS:

- 1) Acido sulfúrico 15 N. Esta solución es aproximada. Un litro se puede preparar por la adición cuidadosa y con una agitación constante de 400 ml de ácido sulfúrico concentrado (36N) en 600 ml de agua.
- 2) Sulfato de cobre. 1 mg/ml. Disolver 3.9 g. de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en un litro de agua.
- 3) Hidrazina al 5%. Disolver 5 gr de Hidrazina en agua destilada hasta obtener 100 ml.
- 4) Hidróxido de sodio 10 N. Esta solución es aproximada y puede ser preparada disolviendo 400 g de gránulos en agua y llevarlo a un litro.
- 5) Alcohol caprílico
- 6) Permanganato de potasio al 6%
- 7) Clorhidrato de hidroxilamina al 20%
- 8) Cloroformo
- 9) Solución de ditizona. Disolver 5.5 mg de difeniltiocarbazona Eastman No. 3092, en un litro de cloroformo. Guardar en refrigeración.
- 10) Solución estándar de mercurio. 1 mg/ml. Disolver y diluir 0.1354

g. de cloruro mercuríco en un matríz volumétrico de 100 ml con ácido sulfúrico 1N. Un mililitro contiene 1 mg de mercurio. El estándar de trabajo contiene 10 mcg/ml, y se prepara en el momento de usarla, diluyendo 1 ml de la solución estándar a 100 ml.

TECNICA

1) Medir 50 ml de orina en un matríz Erlenmeyer de 250 ml con tapón.- Si se sospecha de una concentración mayor de 20 mcg de mercurio en 50 ml. de orina, se deben tomar alícuotas y se diluyen con agua, antes de realizar el procedimiento.

2) Agregar los siguientes reactivos en el orden que sigue, agitando el matríz después de añadir cada uno:

a) 0.5 ml de ácido sulfúrico 15 N.

b) 1 ml de solución de cobre.

c) 0.2 ml (4 gotas) de hidrazina, sin tocar el cuello del matríz.

3) Tapar el matríz y dejar reposar 10 minutos.

4) Agregar 2 ml de hidróxido de sodio 10 N.

5) Mezclar durante 20 segundos.

6) Agregar 9 ml de ácido sulfúrico 15 N.

7) 2 gotas de alcohol caprílico

8) Mezclar.

9) Adicionar lentamente y con bureta, 35 ml de la solución de permanganato de potasio.

10) Tapar el matríz y dejar en reposo a temperatura ambiente una hora.

- 11) 1 ml de solución de clorhidrato de hidroxilamina (se lleva a cabo la decoloración del permanganato).
- 12) Agitar el matríz
- 13) Tapar el matríz y esperar 30 minutos.
- 14) Colocar el contenido en un embudo de separación (la solución está lista para la titulación).
- 15) La Mezcla de reacción se agita con 5 ml de cloroformo y el exceso del cual se desecha.
- 16) Se realiza una titulación extractiva con 0.5 ml de la solución de ditizona.
- 17) Con poca experiencia se puede determinar el volumen inicial de ditizona.
- 18) Utilizando la curva estándar trazada, transformar el volumen usado de la solución de ditizona, en microgramos de mercurio.
- 19) La Curva estándar se prepara adicionando 0, 0.25, 0.50, 1.0, 1.5, y 2.0 ml del estándar diluído en 50 ml de agua, en un matríz Erlenmeyer de 250 ml. Las diluciones tienen las siguientes concentraciones: 0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, y 20 mcg de mercurio respectivamente. Se siguen los pasos del procedimiento (a partir del paso # 2).

VALORES DE REFERENCIA:

Orina 0 - 0.3 mg/l

3. DETERMINACION COLORIMETRICA DE MERCURIO EN ORINA.

FUNDAMENTO:

En este método la materia orgánica es destruída por calentamiento con permanganato y el mercurio es extraído como complejo de ditizona. El mercurio se determina por la medida del color de la dilución de ditizona, antes y después del tratamiento con el reactivo que destruye el complejo de mercurio.

REACTIVOS:

- 1) Solución de ácido sulfúrico. Cuidadosamente añadir un volumen de ácido sulfúrico concentrado y 2 ml de agua.
- 2) Clorhidrato de hidroxilamina al 10%. Disolver 10 g. de clorhidrato de hidroxilamina en agua destilada. Aforar a 100 ml.
- 3) Permanganato de potasio.
- 4) Solución de ditizona. Disolver 5 mg. de ditizona (difeníltiocarbazona, Eastman # 3092) en un litro de cloroformo. Esta solución se guarda en el refrigerador; no es estable después de 10 días.
- 5) Solución de reversión. Disolver 10.2 g de ftalato ácido de potasio y 30 g. de ioduro de potasio en 500 ml de agua destilada. Si es necesario, un poco de gotas de la solución de tiosulfato de sodio al 5% para remover el iodo libre. Agitar la solución varias porciones de 10 ml de cloroformo en la solución de ditizona y descartar la capa de cloroformo.
- 6) Solución diluida. Diluir 100 ml de la solución de ácido sulfúrico y 20 ml de la solución de hidroxilamina a un litro.
- 7) Estándares:
 - a) Solución estándar. Disolver 1.354 g. de cloruro mercúrico en agua destilada y diluir a un litro.

- b) Estándares de trabajo. Diluir 2 ml de la solución estándar a -
100 ml con agua destilada. Esta solución contiene 2 mcg de mer-
curio por ml.

TECNICA:

- 1) Tomar una alícuota de orina (25 ml) en 250 ml en un matraz y diluir a 50 ml con agua destilada.
- 2) Agregar 10 ml de solución de ácido sulfúrico y 1 g de permanganato de potasio.
- 3) Adaptar un condensador de reflujo y llevar a cabo la solución a -
ebullición poco a poco por 30 minutos.
- 4) Si la solución se decolora durante la ebullición, enfriar ligera--
mente. En caso contrario, añadir otros 0.5 g. de permanganato de -
potasio y continuar con la ebullición.
- 5) Enfriar un poco y agregar solución de clorhidrato de hidroxilamina,
gota por gota, hasta que el color del permanganato desaparezca.
- 6) Agregar 2 ml más de solución de hidroxilamina y poner a ebullición
durante un minuto.
- 7) Enfriar la solución y diluir a 100 ml. con agua destilada.
- 8) Agitar una porción de 25 ml de esta solución, en un embudo de sepa-
ración, con 10 ml de solución de ditizona. Si el color de la capa
de cloroformo indica un bajo contenido de mercurio (un color verde
claro con un pequeño tinte castaño).
- 9) Adicionar 75 ml del digerido y agitar otra vez.

- 10) Si la capa de cloroformo es más verde con más intensidad en el tinte castaño, se adiciona 75 ml de la solución diluída a la capa acuosa hecha en 100 ml. Si la capa de cloroformo es casi anaranjada clara, diluir una alícuota más pequeña de la digestión a 100 ml con la solución diluída, y extraér.
- 11) Dejar que la capa de cloroformo se separe completamente y filtrar directamente con un pequeño tapón de algodón (insertado en el tubo del embudo de separación) dentro de la celda del fotómetro.
- 12) Tapar la celda evitando la pérdida del cloroformo por evaporación.
- 13) Leer en el espectrofotómetro a 620 nm. Ajustar a cero con el blanco de reactivos (cloroformo). Referirse a esta absorbancia leída con D_1 .
- 14) Transferir la solución a un pequeño embudo de separación y agitar con 10 ml de la solución de reversión.
- 15) Dejar de nuevo la capa de cloroformo separadamente y filtrar directamente con un tapón de algodón en la celda.
- 16) Leer la absorbancia en el fotómetro (esta lectura es D_2).
- 17) Calcular el valor de $D_2 - D_1$.
- 18) Establecer una serie de estándares adicionando 1, 2, 3, y 4 ml. del estándar de trabajo. 2, 4, 6, y 8 mcg de mercurio respectivamente, a 100 ml de la solución diluída y llevar a cabo directamen

te el procedimiento de extracción usando ditizona y la solución de reversión.

- 19) Trazar el valor de $D_2 - D_1$ de los estándares contra la concentración de mercurio del estándar. Determinar la cantidad de mercurio en la alícuota de la muestra de la curva, usando el valor de $D_2 - D_1$ contra la muestra. De esta manera calcular la cantidad de mercurio en la muestra total.

VALORES DE REFERENCIA:

0 - 6 mcg/100 ml de orina

- 4) DETERMINACION DIRECTA DE MERCURIO EN SANGRE POR REDUCCION CON BOROHIDRURO DE SODIO Y ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA.

FUNDAMENTO:

El mercurio presente en la sangre se encuentra como metilmercurio principalmente y una mínima parte de mercurio inorgánico. En este método se lleva a cabo la formación de hidruro de mercurio mediante la reacción entre un compuesto alquilmecúrico con un complejo metal hidruro que lleva una rápida producción de mercurio. El borohidruro de sodio (reductor potente) reduce las sales de mercurio a metal.

APARATO

- 1) Un espectrofotómetro de absorción atómica Varian Techtron AA6.

2) Un quemador de aire acetileno, que se puede reemplazar por una celda de absorción con ventanas de cuarzo.

El aparato se ensambla como se muestra en la figura 2. Tanto el tubo de reacción como el tubo de secado son de vidrio fuerte y con tubos de ensayo de 15 X 2.5 cm. La entrada de aire de ambos tubos tiene una punta fina. La entrada al tubo de reacción se conecta al suministrador de aire mediante un medidor de flujo, la salida del tubo de secado es conectado a la celda de absorción.

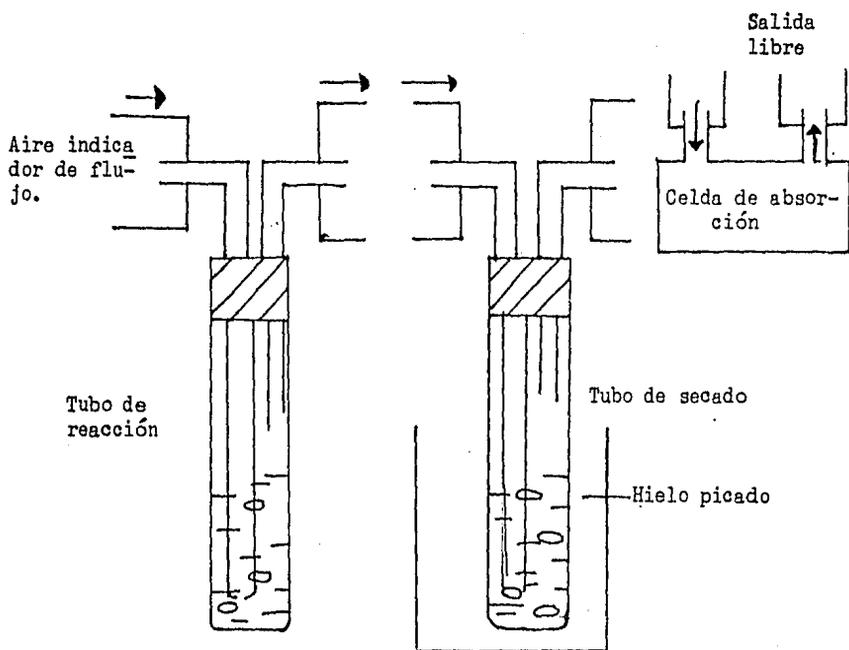


Figura No. 2

REACTIVOS

- 1) Borohidruro de sodio. Preparar una solución de 50 g/l de borohidruro de sodio (Merck) en una solución de hidróxido de sodio concentrado 1 mol/l y prepararla antes de usarse. Las instrucciones de la preparación de este reactivo deben ser estrictamente observadas.
- 2) Cloruro mercúrico. De una concentración de 1000 $\mu\text{mol/l}$. Se prepara disolviendo 0.2715 g. de cloruro mercúrico en ácido sulfúrico al 5% (v/v). Antes de aforar a un litro con el ácido sulfúrico se adiciona 1 g de L-cisteína.
- 3) Solución patrón. (500 mg de mercurio por litro). Disolver 676.7 mg de cloruro mercúrico en ácido sulfúrico de concentración de 50 g/l y diluir a un litro con el mismo ácido.
- 4) Solución patrón diluida. (500 μg de mercurio por litro). Diluir 1 ml de la solución patrón en un litro de agua que contenga 9.0 g de cloruro de sodio, 754.5 mg de ácido etilendiaminotetracetato disódico y 0.1 g de L-cisteína. Esta solución es estable más o menos 6 meses conservándola en refrigeración.
- 5) Solución estándar de trabajo. Se prepara de la solución patrón haciendo diluciones con agua fría, en el momento de utilizarla.
- 6) Cloruro de metilmercurio. Preparar algunas diluciones de la solución estándar de cloruro de metilmercurio en agua.
- 7) Antiespumante. Tri-n-butilfosfato.

NOTA: Debido a que el grado de liberación de mercurio depende de la temperatura, todos los reactivos que se vayan a usar deben estar en el momento a temperatura ambiente.

TECNICA:

- 1) Medir 2.0 ml de sangre y verterla en el tubo de reacción.
- 2) Agregar 3.0 ml de agua destilada, seguida de una gota de antiespumante.
- 3) Adicionar 1.0 ml de borohidruro de sodio, inmediatamente tapar el tubo y agitar vigorosamente durante 2 minutos en un agitador vértex.
- 4) Leer el pico de absorbancia, encendiendo el suministrador de aire. Cuando la lectura de absorbancia casi haya llegado a cero, se deja de suministrar aire.
- 5) Quitar la tapa del tubo y adicionar cantidades conocidas de la solución de cloruro mercúrico, por medio de una micropipeta Eppendorf, de tal manera que se obtenga una lectura de absorbancia igual a la de la prueba.
- 6) Agitar por 30 segundos, purgar la solución con aire y anotar la altura del pico de absorbancia (estándar).
- 7) Quitar el tubo de reacción el tapón y colocarlo sobre otro tubo que contenga agua destilada, con el fin de remover todos los vapores de mercurio del sistema.

- 8) Apagar el aire cuando la absorbancia regrese a cero, o bien, al nivel de la línea base.
- 9) Quitar el tapón y el sistema estará listo para la siguiente muestra.
- 10) Para la preparación de la solución blanco, se toman 5.0 ml de agua destilada que contenga 1 gota del antiespumante, adicionar 1.0 ml de boro-hidruro de sodio, luego purgar con aire hasta obtener el pico de absorbancia del blanco. Finalmente, se calcula la cantidad total de mercurio con la fórmula siguiente:

CALCULOS:

Mercurio total en sangre = $(\text{prueba-bco})/(\text{estándar-bco}) \times (\text{ngHg adicionado/vol de sangre ml})$.

Sí se tienen muchas muestras para determinar el contenido de mercurio, entonces es necesario construir una curva de calibración, de tal manera que los valores desconocidos del mercurio en las muestras puedan ser determinados rápidamente por referencia en esta curva.

Los parámetros del espectrofotómetro:

- 1) Lámpara de mercurio con catodo hueco.
- 2) Corriente de la lámpara 3 mA
- 3) Longitud de onda 253.7 nm.
- 4) Ancho de la rejilla 0.5 nm.
- 5) flujo de aire 31 minutos.

5) DETERMINACION AUTOMATIZADA DE MERCURIO EN SANGRE Y ORINA POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA Y VAPOR FRIO.

FUNDAMENTO:

La determinación de mercurio por el método de espectrofotometría de absorción atómica con vapor frío, es un proceso automatizado, donde se lleva a cabo un pretratamiento de la muestra, permitiendo cuantificar el mercurio en sus formas inorgánicas y orgánicas en sangre y orina, y con una técnica automatizada.

APARATO:

- 1) Espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer 403
- 2) Registrador Perkin Elmer mode o 56
- 3) Lámpara de mercurio con catodo hueco
- 4) Celdas de Corning Eel de 7 mm de diámetro y 100 mm de longitud, - con ventanas de cuarzo.
- 5) Autoanalizador Technicon II
- 6) Analizador múltiple (fig. 3) Se bombean las muestras y reactivos.
- 7) Inyector automático II Hook y Tucker A. 40. (pasan las muestras y lava el analizador múltiple durante 30 y 75 segundos respectivamente.
- 8) Separador para el vapor/líquido (fig. 4) se hace con material de - vidrio Quickfit y tubos de plástico.
 - a) Tubo de vidrio en ángulo recto de 4 mm de diámetro externo y -

2 mm de diámetro interno (donde se inyecta la muestra).

- b) El Tubo de vidrio con punta, cuyo diámetro interno debe ser 0.8 mm. Las dos piezas se montan en una pieza de polietileno rígido de 9 mm de diámetro interno y 50 m de longitud (en el tubo de vidrio con punta se inyecta nitrógeno).

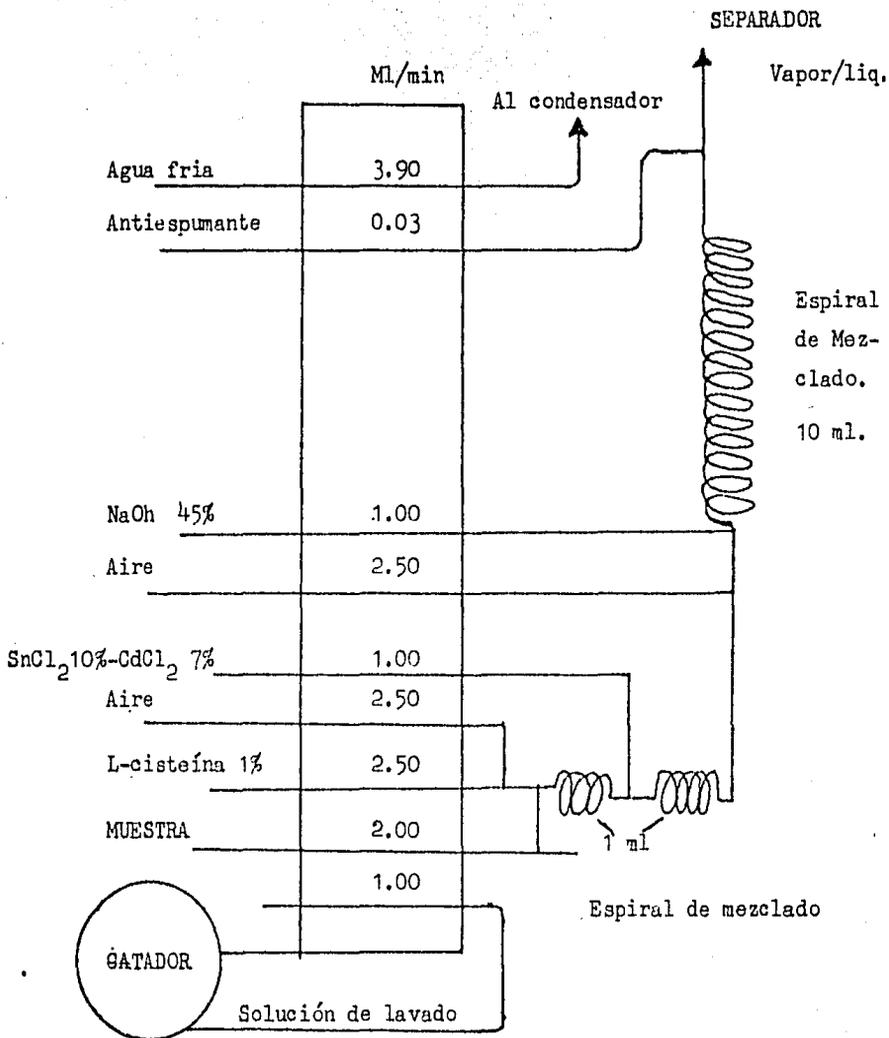


Fig. 3 Diagrama del autoanalizador múltiple de mercurio.

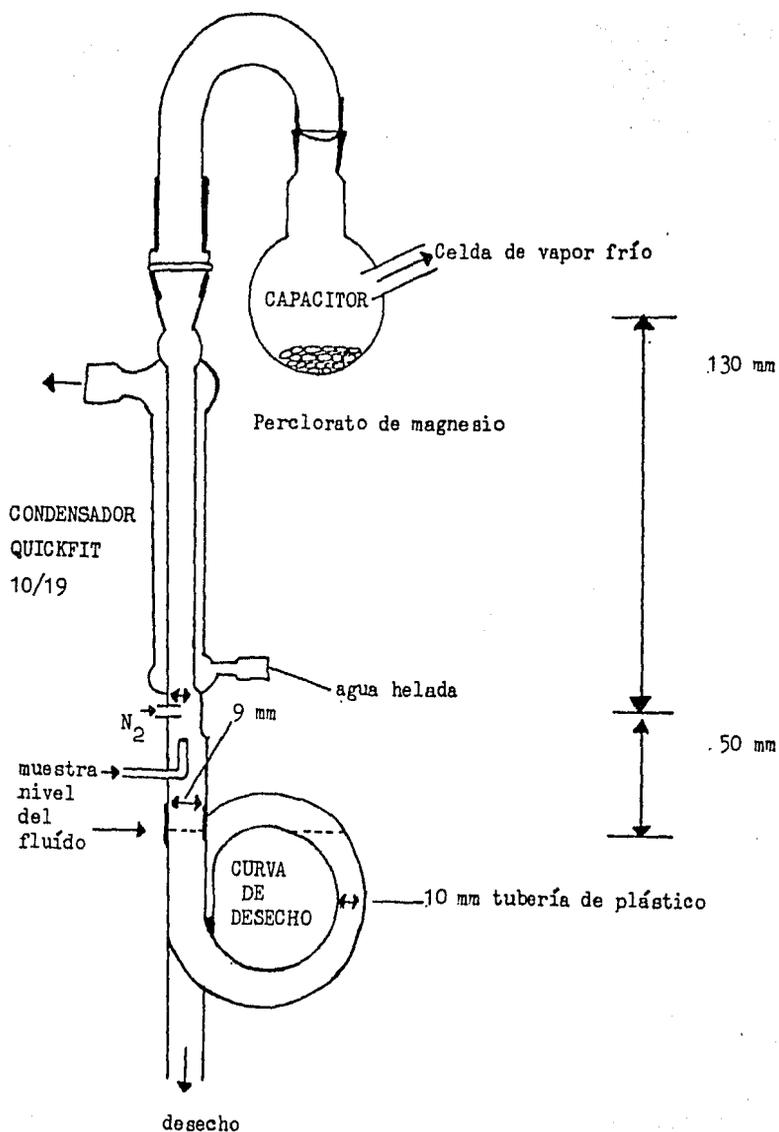


Fig. 4. Separador de vapor/líquido.

REACTIVOS

Todos los reactivos tienen que ser de grado analítico.

- 1) Solución de NaOH al 45%. Diluir con agua destilada.
- 2) Solución de L-cisteína al 1%, en HCl 2 M (sol. de lavado).
- 3) Solución de SnCl_2 - CdCl_2 se preparan en ácido clorhídrico 2 M.
 - a) La solución de SnCl_2 es al 10%
 - b) La solución de CdCl_2 es al 7%
- 4) Solución antiespumante. Se prepara con 1-octanol al 10% en etanol.
- 5) Solución estándar de mercurio inorgánico. De una concentración de 1000 $\mu\text{mol/l}$. Se prepara disolviendo 0.2715 g de cloruro mercuríco en ácido sulfúrico al 5% (v/v). Antes de aforar a un litro con el ácido sulfúrico se adiciona 1 g de L-cisteína.
- 6) Solución estándar. Cloruro de metilmercuríco de una concentración de 1000 $\mu\text{mol/l}$. Se prepara disolviendo 0.2511 g de anhídrido sólido en 100 ml de acetona. El volúmen final se ajusta a un litro de agua destilada.

Los estándares de trabajo se preparan en las mismas concentraciones que los estándares de mercurio inorgánico.

PREPARACION DE LA MUESTRA:

- a) Determinación de mercurio total en orina

Las muestras de orina o las soluciones estándares son analizadas directamente. Una alícuota de 1 ml se coloca en el recipiente del inyector automático. La solución de $\text{SnCl}_2\text{-CdCl}_2$ se usa en el autoanalizador múltiple.

b) Determinación de mercurio total en sangre.

Se lleva a cabo un pretratamiento de las muestras de sangre y es el siguiente:

- 1) A 1 ml de sangre total se adiciona 1 ml de una solución de L-cisteína al 6% o bien, al estándar acuoso.
- 2) Mezclar
- 3) A cada tubo se le adiciona 1 ml de ácido tricloroacético al 40%
- 4) Agitar los tubos vigorosamente.
- 5) Centrifugar durante 5 minutos a 3000 rpm.
- 6) El sobrenadante claro, libre de proteínas, se transfiere a los recipientes del inyector automático.
- 7) La solución de $\text{SnCl}_2\text{-CdCl}_2$ se utiliza en el analizador múltiple.

c) Determinación de mercurio inorgánico en sangre.

Las muestras son tratadas de la misma manera que en la determinación de mercurio total en sangre, por lo tanto, la solución de $\text{SnCl}_2\text{-CdCl}_2$ del autoanalizador múltiple se sustituye por una solución de SnCl_2 al 10%.

d) Cálculo de mercurio inorgánico.

El contenido de mercurio orgánico en sangre, se calcula restando el valor del mercurio inorgánico del valor total de mercurio.

Hg orgánico en sangre = mercurio inorgánico - mercurio total.

TECNICA

- 1) En este método las reacciones se llevan a cabo en el flujo continuo del analizador múltiple.
- 2) En la reacción final donde los iones de mercurio son reducidos a mercurio, ocurre en mezola fría. De aquí la corriente es bombeada en el separador especial de vapor/líquido donde la muestra se nebuliza con un flujo de nitrógeno de 1 l/min.
- 3) Se deja reposar para lograr la difusión completa de mercurio de la fase líquida a la fase de vapor. El exceso de fluido es dejado perder a los desechos directamente a una trampa de desagüe, y el vapor se transporta por el nitrógeno hasta el condensador. Alimentado con agua y hielo, el mejoramiento de agua en el condensador de vapor deja descender el desecho.
- 4) El vapor de mercurio seco pasa a través de una matríz de bola que contiene alrededor de 5 g de perclorato de magnesio que funciona como desecador. En conclusión, cualquier exceso de vapor de agua en el matríz es importante, porque amortigua las pulsaciones de la acción capacitadora en el flujo del vapor, antes de que este pase a

la celda de análisis. Después continua la absorción atómica y controlando la señal en la gráfica de registro aumentados y disminuídos.

La señal es amplificada por medio de un control de expansión de la escala, ambos conectados al instrumento de absorción atómica y el registrador.

Se construye una curva, donde se grafica concentración contra la altura de los picos, después las concentraciones desconocidas de las muestras, leer directamente en la curva.

COMENTARIO ACERCA DE LOS METODOS

En el primer método, la prueba de Reinsch puede ser un método importante en especímenes concentrados, pero si ya se conoce la presencia de mercurio, esta prueba puede ser eliminada. La ventaja es de ser sensible y específico.

En el método por titulación con ditizona en orina, es una técnica sencilla, fácil de realizar, sin la necesidad de aparatos costosos, lo cual es económico, y con poca experiencia de parte del químico, se puede determinar mercurio en orina. Este método no es muy sensible como el método de absorción atómica, tampoco se puede distinguir las formas del mercurio.

En el método colorimétrico las ventajas que se presentan es el

tiempo, donde se pueden elaborar varias muestras simultáneamente, sin embargo, puede haber errores por manipulación y pérdida de la muestra.

En el método por espectrofotometría de absorción atómica, utilizando borohidruro de sodio como reductor las ventajas que se presentan son de que es un método muy sensible, rápido, ya que la muestra no requiere de pretratamiento, además, el reactivo de borohidruro de sodio puede obtenerse comercialmente, libre de impurezas metálicas y por este método también pueden hacerse otras determinaciones biológicas como en el cabello y en el pescado. Sin embargo, se debe cuidar la presencia de ácidos en los estándares, porque puede haber una descomposición del agente reductor y producir hidrógeno, el cual presenta un peligro.

El método automatizado para la determinación de mercurio, es una prueba rápida y simple, es sumamente sensible y exacto, aunque el método es complicado en su manejo.

III. 4 ARSENICO

1. METODO DE REINSCH

FUNDAMENTO:

El método de Reinsch para la determinación de arsénico observa - que algunos metales pesados incluyendo al arsénico, son depositados -

en un alambre de cobre, y durante el calentamiento con ácido clorhídrico diluido aparece un color negro.

REACTIVOS:

- 1) Alambre de cobre de calibre # 20. Se enrolla el alambre alrededor de un tubo de vidrio, se hace un espiral aproximadamente $1/4$ de pulgada de diámetro y $3/8$ de pulgada de largo.
- 2) Acido nítrico al 20% (v/v).
- 3) Zinc, libre de arsénico.
- 4) Cloruro estannoso.
 - a) Disolver 20 g de cloruro estañoso en ácido clorhídrico al 2%
- 5) Acido sulfúrico al 10% (v/v).
- 6) Acetato de plomo. Solución saturada
- 7) Papel con bromuro de mercurio.
 - a) Remojar el papel filtro Whatman # 40 en solución de bromuro mercuríco al 5% hecho en 95% de alcohol etílico por 2 minutos. Dejar secar.
- 8) Acido clorhídrico al 10% (v/v).
- 9) Solución patrón de arsénico.
 - a) Disolver 1.32 de óxido arsenioso y 4 g de gránulos de hidróxido de sodio en 20 ml de agua a un litro, en un matraz volumétrico. Cuando el óxido ha sido disuelto, diluir a 200 ml con agua y ne

utralizar con fenoftaleína y con ácido clorhídrico concentrado, entonces diluir a un litro. Esta solución contiene 1 mg/ml de arsénico. Es estable en el refrigerador.

PROCEDIMIENTO:

- 1) Poner 20 ml de orina en un matraz Erlenmeyer de 50 ml, agregar 4 ml de ácido clorhídrico concentrado.
- 2) Introducir un espiral de cobre y calentar poco a poco por una hora en baño maría.
- 3) Mantener el volumen constante añadiendo ácido clorhídrico al 10% durante el período de calentamiento. Es necesario correr un blanco de orina normal y estándares hechos por la adición de 25 y 50 mcg de arsénico, de una alícuota de 20 ml de la orina normal. Estas cantidades se obtienen adicionando 0.5 y 1.0 ml o 0.25 y 0.50 ml de una dilución 1: 10 de la solución patrón.
- 4) Después de una hora, remover el espiral, lavar directamente con agua y secar con papel filtro.
- 5) Una coloración negra indica la presencia de arsénico.
- 6) Las manchas en el cobre se comparan con las que producen los estándares.
- 7) Se debe llevar a cabo la prueba confirmatoria en caso de no haber cambio de color.

PRUEBA CONFIRMATORIA

- 1) Lavar el espiral otra vez con agua.
- 2) Colocar el espiral de cobre en un matraz o botella que contenga de 5 a 10 g de zinc.
- 3) Adicionar unas gotas de la solución de cloruro estanoico y 15 ml de ácido sulfúrico al 10%.
- 4) Inmediatamente colocar el tapón en la parte superior del aparato - con el papel impregnado de bromuro mercuríco. (Aparato de Gutzeit).
- 5) La generación de hidrógeno, arsina, ácido sulfhídrico y antimonio se atrapa en el algodón impregnado de acetato de plomo.
- 6) Cuando hay arsénico o antimonio, el papel con bromuro mercuríco -- cambia de amarillo a café dependiendo de la concentración del metal presente.
- 7) En el disco coloreado o la tira que se expone a los vapores de ácido clorhídrico se observan los colores, si el metal es antimonio - el color desaparece, mientras que si es arsénico el color persiste.

2. METODO DE GUTZEIT

FUNDAMENTO;

Se requiere de una previa digestión del material biológico. Una alícuota del digerido se coloca en un generador de hidrógeno, donde - el arsénico es transformado en arsina (AsH_3), el cual se pasa a tra--

vés de un papel filtro impregnado con bromuro mercúrico. Si se observa una coloración que va de amarillo a café, muestra la formación de AsHg_3 y $\text{As}(\text{HgBr})_3$, lo cual indica la presencia de arsénico.

APARATO DE GUTZEIT

Un matraz unido mediante un tapón a un tubo, en cuyo centro se coloca un algodón impregnado de acetato de plomo. Otro tapón une el extremo superior del tubo a otro tubo de vidrio, alrededor del cual se coloca una tira de papel filtro con bromuro de mercurio.

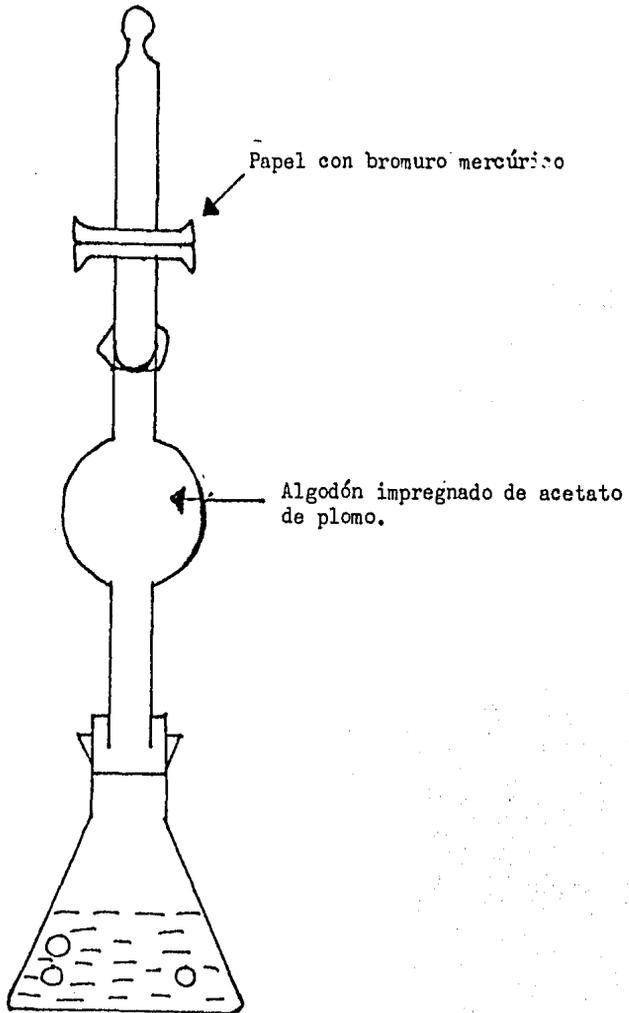


Fig. 5 Aparato de Gutzeit.

REACTIVOS:

Los reactivos para la digestión de la muestra son los siguientes:

- 1) Acido nítrico concentrado. Grado analítico.
- 2) Acido sulfúrico concentrado. Grado analítico.
- 3) Acido perclórico al 70%. Grado analítico.
- 4) Bisulfito de sodio granular. Grado reactivo.
- 5) Solución de cloruro estanoso. Disolver 40 g. en agua destilada.
- 6) Acido sulfúrico al 10%. Adicionar 10 ml de ácido sulfúrico concentrado, cuidadosamente agregar 70 ml. de agua destilada, enfriar y llevar a 100 ml.
- 7) Lana de vidrio seca. Impregnada con acetato de plomo, saturando el tapón de la lana de vidrio, llenar suficiente abajo de 2/3 del volumen en el aparato de Gutzeit por inversión en una solución de acetato de plomo (aproximadamente 50 g en 100 ml de agua). Entonces separar en una estufa de secado, airear y después insertar en la columna.
- 8) Solución de sulfato cúprico. Disolver 10 g de sulfato cúprico cristalino en agua destilada. Llevar a 100 ml.
- 9) Gránulos de zinc, libre de arsénico. Grado analítico.
- 10) Solución de bromuro metanol mercuríco. Disolver 5 g de bromuro mercuríco en metanol absoluto y diluir a 100 ml. Proteger de la luz.

- 11) Tira de papel filtro impregnada con bromuro mercuríco. Sumergir el papel Whatman # 1 6 # 4, de 12.5 ó 15 cm. en la solución de bromuro mercuríco por 5 minutos. Entonces separar con unas pinzas, secar y cortar la tira desde el centro de la hoja. Adaptar al pequeño tubo del aparato, cuya salida es una cola hacia afuera que está en la parte alta facilitando la separación. Evitar tocar la tira con la mano.

PROCEDIMIENTO PARA LA DIGESTION

- 1) Poner 100 ml de orina o 20 ml de sangre en un matraz de Kjeldahl -- (matraz para digestión).
- 2) Agregar 10 ml de ácido nítrico a la orina o 20 ml del mismo ácido a la sangre.
- 3) Adicionar 5 ml de ácido sulfúrico y algunas perlas de vidrio.
- 4) Se calienta en una pequeña flama el matraz reduciendo el volumen, - hasta que se observe signos de oscurecimiento.
- 5) Para prevenir que se queme la solución, remover en la flama y adicionar gota a gota de la mezcla de ácido perclórico y ácido nítrico con un volumen 2 : 1. Repetir la operación hasta que la solución - esté clara.
- 6) Suspender el tratamiento cuando el color de la solución obtenida -- cambie de amarillo pálido a incoloro; no debe oscurecerse con el ca lentamiento.
- 7) Continuar el calentamiento para eliminar los vapores de los ácidos

nítrico y sulfúrico.

- 8) Enfriar a temperatura ambiente.
- 9) Adicionar 5 ml de agua y transferir cuantitativamente a un matraz Erlenmeyer con pequeñas porciones de agua destilada.
- 10) Agregar 100 mg de bisulfito de sodio.
- 11) Calentar más o menos 5 minutos hasta que aparezcan vapores blancos.
- 12) Enfriar y transferir cuantitativamente a una probeta de 50 ml con agua destilada.
- 13) Agregar 3 gotas de la solución de cloruro estanoico y diluir a 50 ml.
- 14) Preparar un blanco de reactivos adicionando 200 mg de bisulfito de sodio al 10% al matraz. Calentar hasta la aparición de humos blancos, enfriar y adicionar 6 gotas de la solución de cloruro estanoico. Diluir a 100 ml con agua.

METODO DE GUTZEIT

- 1) Poner la lana de vidrio impregnado con acetato de plomo en la columna como se describe en la fig. 5, y una tira de papel filtro impregnado con bromuro mercuríco en el tubo superior.
- 2) Preparar los estándares de trabajo por dilución de 1 ml de la solución patrón a 200 ml con agua destilada. Esta solución contiene 5 -

mcg de arsénico por ml.

- 3) En una botella o matraz de Gutzeit poner 20 ml de la muestra digerida.
- 4) En otras tres botellas o matracs poner 20 ml del blanco:
 - a) A la primera botella, adicionar 1 ml del estándar de trabajo (5 mcg de arsénico).
 - b) A la segunda botella, agregar 2 ml del estándar (10 mcg de arsénico).
 - c) La tercera botella, va a servir como blanco.
- 5) A cada una de las botellas:
 - a) Agregar 1 ml de la solución de sulfato de cobre.
 - b) 5 g de zinc libre de arsénico.
- 6) Tapar inmediatamente.
- 7) Poner la columna en un recipiente con agua a 25°C por 45 minutos.
- 8) Al terminar el tiempo se examina la tira de papel filtro.
- 9) Si hay presencia de arsénico, se observará en la parte inferior de la tira un color que va de naranja a café, dependiendo de la concentración del elemento.
- 10) La cantidad en la muestra (alícuota) puede ser estimada por comparación de la tira de la botella de la muestra con la botella del estándar.

CALCULOS

La cantidad de arsénico de la muestra problema puede ser estimada con la comparación de coloraciones entre el papel filtro impregnado de bromuro mercuríco y la solución estándar. Por ejemplo: de 50 ml. de orina que quedaron al final de la digestión de 100 ml. se toma una muestra de 20 ml para el aparato de Gutzeit. El color amarillo correspondrá a 30 mcg de arsénico según el estándar. Los cálculos serán:

$$30 \times \frac{50}{20} = 63 \text{ mcg/100 ml o } 0.63 \text{ mg/1 de orina}$$

VALORES DE REFERENCIA:

Sangre	6 - 20 mcg/100 ml
Orina	0.1 mg/1

3. METODO DE MARSH-BERZELIUS

FUNDAMENTO:

En este método la arsina se forma igual que la prueba de Gutzeit, pero el arsénico es obtenido en estado metálico y requiere de una prueba confirmativa. El arsénico en forma de arsina se deposita como una mancha oscura sobre el crisol. En la modificación hecha por Berzelius a la prueba de Marsh, la descomposición del arsénico se realiza por calentamiento en un tubo; a través de este pasan gases, y el metal libre se deposita en un espejo en la pared interior del tubo. En esta forma

el arsénico se identifica mediante pruebas químicas. La determinación puede hacerse cuantitativamente por adición de cantidades conocidas - de arsénico al matraz del aparato para más tarde comparar los espejos formados con los de los estándares.

APARATO

Un generador convencional puede hacerse de la siguiente manera: Un matraz Erlenmeyer con un tapón de dos horadaciones. El matraz se - envuelve con una toalla y se coloca en un baño de agua fría porque la reacción es violenta.

En el tapón se coloca un embudo con llave en la parte media o en la superior, y un tubo de vidrio en ángulo recto, que se conecta a un tubo de secado con cloruro de calcio. Este tubo se une a uno Pyrex - (de 10 a 12 pulgadas de largo y 7 mm de diámetro interno), con ambos extremos estrangulados hasta 1 ó 2 mm de diámetro y de 2 a 4 pulgadas de largo. Alrededor de este tubo se enrolla un alambre. Este tubo debe unirse a otro Pyrex de las mismas características, y en la juntura se coloca un rodillo envuelto en papel filtro humedecido con agua. El extremo libre del segundo tubo Pyrex se embona a otro tubo de vidrio en ángulo recto, el cual debe sumergirse en una probeta graduada, llena de agua. Finalmente, se pone un mechero para calentar el Pyrex con alambre, y un gotero continuo de agua sobre el rodillo envuelto en papel filtro.

En la conexión entre el tubo de secado y el primer tubo Pyrex se introduce una torunda de algodón. A continuación, en la figura 6 se -

presenta el aparato de Marsh-Berzelius.

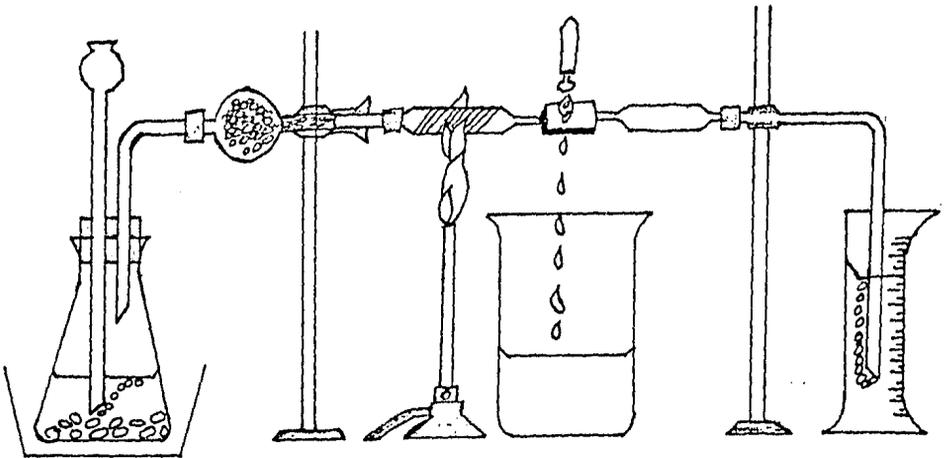


Fig. 6 Aparato simple de Marsh-Berzelius

REACTIVOS

- 1) Zinc, libre de arsénico (como en la prueba de Gutzeit).
- 2) Acido sulfúrico al 10% (libre de arsénico.
- 3) Cristales de sulfato cúprico o en solución (como en el procedimiento de Gutzeit.

PROCEDIMIENTO

- 1) Se colocan de 20 a 30 g de zinc y algunos cristales de sulfato cúprico hidratado en el matraz generador y se tapa bien.
- 2) Agregar 20 ml de ácido sulfúrico de 10 a 15% (cubrir completamente

- el zinc con el objeto de generar hidrógeno).
- 3) Dejar en reposo el matraz durante 15 minutos.
 - 4) Regular la corriente por enfriamiento del matraz generador con el agua necesaria. Al final del tubo de combustión, se extiende bajo el agua, abasteciendo el contador de burbujas, impidiendo que se forme aire inconveniente para el generador y pudiendo causar una explosión.
 - 5) Con un mechero se calienta la manga de gasa de alambre hasta que esté roja, cuidando que el rollo de papel se remoje con el agua fría.
 - 6) Pasar con cuidado la solución caliente, introduciendo lentamente un volumen conocido de la muestra digerida directamente al embudo. Esta solución debe ser previamente ajustada que contenga de un 10% a un 15% de ácido sulfúrico por volumen.
 - 7) Después de las adiciones, dejar en reposo (para generación del gas) durante 45 minutos.
 - 8) Si la muestra tiene arsénico se forma un espejo en el extremo del estrangulamiento.

PRUEBA SOBRE EL ESPEJO DE MARSH

Si se obtiene un resultado positivo, la determinación puede ser repetida hasta formarse varios espejos. Cortar los tubos capilares fuera del diámetro de los tubos de combustión con una lima filosa. Se

lleva a cabo la siguiente prueba.

- 1) Vaciar dentro de uno de los capilares, una solución de hipoclorito de sodio o calcio. Si el depósito se solubiliza, entonces el residuo es arsénico, y si el depósito no solubiliza, se trata de antimonio.

- 2) Verter en otro de los tubos capilares ácido nítrico concentrado. - Los depósitos de arsénico o antimonio se disuelven inmediatamente. Poner algunas gotas de esta solución en varios portaobjetos o en una placa de porcelana y dejar secar:
 - a) Se adicionan unas gotas de una solución de ácido sulfhídrico en la mancha. Si está presente el arsénico se forma una coloración amarilla, causada por el As_2S_3 (sulfuro arsenioso).

 - b) En otro de los residuos se adiciona una solución de molibdato de amonio. El arsénico origina un precipitado amarillo, mientras que el antimonio no presenta ninguna reacción.

 - c) La prueba de Bettendorf: Se prepara una solución saturada de cloruro estañoso en ácido clorhídrico concentrado (mililitros). Se adiciona una gota de esta solución en otro de los residuos donde se origina una coloración negra, de la cual es responsable el arsénico.

 - d) A otro de los residuos se le adiciona una gota de solución acuosa de nitrato de plata. Observar una coloración roja a causa de la formación de Ag_3AsO_4 (arseniato de plata).

4. DETERMINACION DE ARSENICO EN ORINA GROMATOGRAFIA DE INTERCAM- BIO IONICO Y ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA.

FUNDAMENTO:

Se lleva a cabo una separación de arsénico inorgánico de los compuestos orgánicos, como lo son el ácido monometil arsénico y el ácido dimetilarsénico presentes en la orina, llevandose a cabo por cromatografía de intercambio iónico con resina Ag 50 W-X8. Se determina el arsénico directamente en la fracción eluída. Después se lleva a cabo la determinación de los compuestos orgánicos por espectrofotometría - de absorción atómica.

APARATO

- 1) Una columna de vidrio de 100 mm X 9 mm (de diámetro interno).
- 2) Baño termostático de secado.
- 3) Espectrofotómetro de absorción atómica modelo 5000.
- 4) Una lámpara de HCl Perkin Elmer con arsénico.
- 5) Accesorios para la determinación de los hidruros volátiles de Perkin Elmer MHS-1.
- 6) Tubo para la muestra de polietileno de 10 a 20 ml.

REACTIVOS

Todos los reactivos deben ser de grado analítico;

- 1) Solución de ácido clorhídrico 6N y 5N.
- 2) Solución de hidróxido de sodio 0.1N y 0.6N.
- 3) Solución de hidróxido de amonio al 5% (v/v). 5 ml de NH_4OH concentrado en 100 ml de agua.
- 4) Solución de hidróxido de amonio al 20%
- 5) Solución de borohidruro de sodio al 10% (p/v), en hidróxido de sodio 0.6N. La solución obtenida se filtra y se conserva en botella oscura.
- 6) Tapón con acetato/ácido acético con pH de 4.
- 7) Solución de permanganato de potasio al 6% (p/v).
- 8) Antiespumante DB 110 A al 1% (v/v).
- 9) Resina AG 50W-X8.
- 10) Solución estándar de arsénico (As III). 1 mg/ml As. AsCl_3 (1mg/ml As).
- 11) Solución estándar para arsénico V. 0.416 g de $\text{Na}_2\text{HASO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de hidróxido de sodio 0.1N.
- 12) Solución estándar para el ácido monometilarsénico. 0.389 g de $\text{CH}_3\text{AsO}(\text{ONa})_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, se diluyen en 100 ml de agua.
- 13) Solución estándar para el ácido dimetilarsénico. 0.134 g de $(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2\text{H}$ en 100 ml de agua.

CONSERVACION DE LA MUESTRA

La muestra de orina se recolecta en recipientes de polietileno de 100 ml y cuando no se efectúa la separación cromatográfica de arsénico, es posible conservarla, tomando una alícuota de 2 ml por largo tiempo en congelación a temperatura de -20°C . En estas condiciones, no es necesario agregar conservadores.

I) SEPARACION CROMATOGRAFICA DE COMPUESTOS DE ARSENICO

a) Preparación de la resina. Es necesario purificar la resina AG 50W-X3 antes de su uso, con agua deionizada. Se repite la operación hasta que el líquido salga incoloro.

También puede lavarse con hidróxido de amonio al 20%, hasta neutralizar el pH. Se condiciona la resina en HCl 6N (se necesita un volumen triple con respecto a la resina) por 30 minutos, agitar la mezcla poco a poco, y se lava de nuevo la resina hasta pH neutro.

La columna de separación cromatográfica en forma de H, se rellena con 4 g de resina ya purificada, en suspensión acuosa, y se condiciona haciendo un precolado, según señale el instructivo de la resina, adicionando 10 ml de HCl 0.5N, con el objeto de que la resina no quede seca.

b) Tratamiento de la muestra. La muestra de orina se acidifica con 40 μl de HCl al 37% por cada ml de orina, antes del análisis. - Pipetear en la columna 2 ml de orina acidificada, eluir enseguida co

mo lo indica el siguiente esquema

FRACCION ELUIDA	TIPO DE ELUYENTE	ml DE ELUYENTE	COMPUESTO DE AS ELUIDO
F1	HCl 0.5N	5	As inorgánico
F2	H ₂ O	7	Ac. MMA
F3	NH ₄ OH al 5%	10	AsF
F4	NH ₄ OH al 20%	11	DMA, AsF

c) Antes del análisis en absorción atómica se corrige el pH y el volúmen de los eluidos como sigue:

- F1 Llevar un volumen a 10 ml con HCl 0.5N
- F2 Agregar 420 mcl de HCl concentrado y llevar al volúmen de 10 ml con agua.
- F3 Calcinar para determinar AsF.
- F4 Llevar a sequedad a 90°C, recoger el residuo con 10 ml con el - tapón de acetato, o bien calcinar para determinar AsF + DMA.

Para valorar el contenido de arsénico de los reactivos (blanco), se analiza las eluciones obtenidas según las siguientes indicaciones, de una columna no cargada con orina.

ANALISIS DE LA FRACCION EN ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA:

AA CONECTADO

mA 18
 Pico 193.7
 t(seg) 21.0

Gas de transporte nitrógeno.

CURVA DE CALIBRACION

Las soluciones estándares de As III, MMA y DMA (500 ng/ml As), se preparan al momento del análisis: 50 mcl de la solución correspondiente de 1 mg/ml se diluyen en 100 ml de agua. De los estándares para la curva de calibración vienen a prepararse directamente en el matraz de reacción del MHS-1, agregando al diluyente 25 mcl (S1=12.5 ng de arsénico) o 50 mcl (S2 = 25 ng de arsénico) de la solución estándar de 500 ng/ml de arsénico, según el esquema siguiente:

ELUIDO	ESTANDAR	DILUYENTE	ml DEL DILUYENTE	KMnO ₄ mcl	ANTIESPUMANTE
F1	As (III)	HCl 0.5N	10	50	200
F2	MMA	HCl 0.5N	10	50	200
F4	DMA	Tapón de acetato	10	-	500

ANALISIS

En el matraz de reacción, pipetear una lícuota del eluido, tal que la absorbancia no sea superior de S2, llevar a un volumen de 10 ml con HCl 0.5 N o el tapón de acetato según la fracción cromatográfica

ca que se está analizando, agregar permanganato de potasio y antiespumante según el esquema anterior para la curva de calibración.

CALCULOS

Restar la absorbancia de la muestra con la absorbancia de la alícuota equivalente del correspondiente eluido el "blanco". De la curva de calibración se determina en ng de arsénico presente en el volumen del eluido extraído.

La concentración de arsénico de la muestra de orina se calcula - como sigue:

$$\text{As (mcg/l)} = \frac{N \times 10 \times 10^3}{V \times 2 \times 10^3} = \frac{N \times 5}{V}$$

DONDE

V = ml del eluido extraído para el análisis

N = ng de arsénico en V

10 = ml totales del eluido

2 = ml de la orina analizada

$10^3 = \text{mcg/ng}$

$10^3 = 1/\text{ml}$

Para la determinación de arsénico total, se lleva a cabo la descomposición en seco con óxido de magnesio y nitrato de magnesio, modificando el volumen de orina, la cantidad de sal de magnesio adicionada

la temperatura de calcinación (660°C), y el tiempo (30') que vaya a permanecer la muestra.

VALORES DE REFERENCIA:

6 - 20 mcg/100 ml

COMENTARIOS ACERCA DE LOS METODOS

Los tres primeros métodos son importantes para determinar la presencia de arsénico.

La prueba de Reinsch puede ser importante para especímenes concentrados y la cantidad detectable de arsénico es de 0.02 mg, sin embargo, si se sabe de la presencia de arsénico la prueba de Reinsch debe ser eliminado, por ser un método cualitativo.

La prueba más sensible es la de Gutzeit, pero no es tan específica como la de Marsh-Berzelius.

Pero si ya se ha confirmado la presencia de arsénico, es necesario cuantificarlo por el método de espectrofotometría de absorción atómica.

III.5 COBRE

1) DETERMINACION DE COBRE EN SUERO POR ESPECTROFOTOMETRIA.

FUNDAMENTO:

En este método la determinación total de cobre en suero, se emplea la oxalildihidrazida. El suero es tratado con una solución de oxalildihidrazida en ácido clorhídrico, con la cual se extrae el cobre de su combinación con las proteínas del plasma. Después se prepara una solución de ácido tricloroacético. Se adiciona una alícuota de esta solución, además de hidróxido de amonio y acetaldehído, produciéndose un intenso color lavanda, que es leído a 542 m μ , ya que es el máximo de absorción del complejo colorido.

REACTIVOS

- 1) Oxalildihidrazida. Disolver 146 g de oxalato de dietílico en 770 ml de etanol absoluto. Disolver también 59 g de hidrato de hidrazina en 295 ml de etanol absoluto y mezclar las dos soluciones. En menos de una hora se forma un precipitado, que va de amarillo a blanco. Este se recristaliza una sola vez, empleando agua hirviendo. La oxalildihidrazida puede obtenerse comercialmente.
- 2) Acido clorhídrico 2N. Conteniendo oxalildihidrazida 0.10%.
- 3) Acido tricloroacético. (Concentrado p.e. 0.90) 20% libre de sulfato y fierro. De alta pureza.

- 4) Hidróxido de amonio. Concentrado p.e. 0.90
- 5) Solución acuosa de acetaldehído 50% (v/v). Preparar este reactivo con una parte de agua fría y una parte de acetaldehído frío, y guardar en refrigeración.
- 6) Etilenedinitrilo. Sal sódica del ácido tetra-acético. EDTA.
- 7) Cristales de ácido cítrico.
- 8) Solución estándar de cobre. 1.0 mg de cobre por ml. Disolver - - 0.3928 g de sulfato cúprico, pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en agua y diluir a 100 ml. Los estándares de trabajo se preparan diariamente por dilución del estándar inicial. Por rutina un estándar - contiene 200 mcg por 100 ml y así se diluye 1: 500 con agua.

PROCEDIMIENTO:

- 1) En un tubo de prueba de 13 X 100 mm, adicionar 1 ml de suero o - plasma heparinizado, 0.70 ml de ácido clorhídrico 2 N, mezclar y dejar reposar durante 10 minutos.
- 2) Adicionar 1.0 ml de ácido tricloroacético, mezclar bien con un agitador de vidrio, tapar el tubo con papel parafilm, dejar reposar 5 minutos y centrifugar rápidamente por 15 minutos. Además, agregar a 2 - tubos de agua para el blanco, un tubo para el estándar (2.0 mcg. de - cobre por ml).
- 3) En un tubo se añade un poco de cristales de ácido cítrico, y hacer una solución transparente, pipetear 2.0 ml a cada blanco, al estándar y a la muestra problema, agitar y disolver los cristales.

- 4) A uno de los tubos del blanco adicionar un poco de EDTA, al otro - no.
- 5) Adicionar a todos los tubos 0.5 ml de hidróxido de amonio y 0.50 ml de la solución de acetaldehído. Dejar reposar 30 minutos a temperatura ambiente, luego determinar las absorbancias a 542 m μ contra el blanco que contiene EDTA. El color es estable por algunas - horas.

CALCULOS

$$\frac{(\text{Absorbancia del problema}) - (\text{Absorbancia del blanco})}{(\text{Absorbancia del estándar}) - (\text{Absorbancia del blanco})} \times 200 = \text{mcg. Cu/100 ml de suero.}$$

VALORES DE REFERENCIA:

70 - 150 mcg/100 ml

2. DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRIA DE COBRE EN PLASMA CON

4-(2-QUINOLILAZO) FENOL.

FUNDAMENTO:

En la determinación espectrofotométrica de cobre, se emplea cuproína (2,2'-biquinolyl) y sus análogos. En este método se requiere del uso de 4-(2-quinolilazo) fenol, compuesto azoheterocíclico seco como un reactivo sensible o selectivo para la determinación de cobre.

Los reactivos forman un complejo amarillo verdoso (máximo de absorción 440 nm) entre un rango de pH 2.9-4.0 y en un medio que contiene 40% de etanol. El complejo es estable durante más de 24 horas. Bajo estas condiciones no existe interferencia de otros iones metálicos - por lo que el cobre se determina selectivamente. El método también se emplea para la determinación de cobre en sangre obteniéndose resultados favorables.

APARATO:

- 1) Espectrofotómetro Unicam SP 600
- 2) Celdas de vidrio de 10 mm.
- 3) Potenciómetro Beckman Expansomatic SS-2 (para ajustes de pH).

REACTIVOS:

Todos los reactivos que se usen tendrán que ser de grado químico.

- 1) Solución 4-(2-quinolilazo) fenol. Se prepara disolviendo 0.249 g - en un litro de etanol. La solución es estable durante varios días.
- 2) Solución de cobre (II). Se prepara una solución patrón de cobre (II) de concentración $2 \times 10^{-2} M$. Se disuelve una cantidad de sulfato de cobre pentahidratado en agua, y se estandariza (o valora) complejométricamente con EDTA, usando 1-(2-piridilazo)-naftol como indicador. La solución patrón puede diluirse si se requiere.
- 3) Acido ascórbico. Se prepara una solución al 2% y se guarda en un frasco ámbar. Esta solución se prepara antes de usarse.

4) Acido tricloroacético al 20%

TECNICA:

- 1) A una cierta cantidad de muestra que contenga entre 1.1 a 11.4 mcg de cobre, se le adiciona 2 ml de la solución de ácido ascórbico.
- 2) Se deja reposar la mezcla durante 5 minutos, después se agrega 1 ml de la solución de 4-(2-quinolilazo) fenol.
- 3) Se ajusta el pH alrededor del 3.3 con una solución diluída de hidróxido de sodio o ácido clorhídrico y diluir a 10 ml con agua big destilada manteniendo la concentración del etanol al 40% (v/v).
- 4) Tomar la lectura de absorbancia de la solución a 440 nm usando una solución blanco preparada bajo las mismas condiciones.
- 5) La cantidad de cobre en la muestra, se determina con una curva estándar de calibración preparada con cantidades conocidas de cobre y con el procedimiento anterior.

Determinación de cobre en plasma:

- 1) Pipetear cuidadosamente 0.5 ml de plasma en un tubo 13X100 mm.
- 2) Adicionar 2 ml de la solución de ácido ascórbico.
- 3) Dejar reposar 10 minutos.
- 4) Adicionar 0.5 ml de ácido tricloroacético, mezclar, tapar el tubo y centrifugar hasta que el sobrenadante sea claro.

- 5) Tomar una alícuota de 1 ml del sobrenadante y vertirlo a un matraz de 10 ml.
- 6) Adicionar 1 ml de la solución 4-(2-quinolilazo).
- 7) Ajustar el pH a 3.3 con una solución diluida de hidróxido de sodio y llevarlo a un volumen de 10 ml cuidando que la concentración de etanol se mantenga al 40%.
- 8) Medir la absorbancia de la solución a 440 mμ, utilizando un blanco preparado en las mismas condiciones.
- 9) Calcular la cantidad de cobre en la curva de calibración.

VALORES DE REFERENCIA:

80 - 180 mcg/100 ml

3. DETERMINACION DE COBRE POR ABSORCION ATOMICA CON ATOMIZADOR DE GRAFITO.

FUNDAMENTO:

Se ha logrado alcanzar con espectrofotometría de absorción atómica, una determinación rápida de rastros metálicos, ya sea en muestras sólidas o secas, usando un atomizador de grafito. En esta técnica no se requiere manipulación en la muestra, por lo tanto, la determinación de cobre se lleva a cabo directamente.

APARATO;

- 1) El Espectrofotómetro de absorción atómica.
- 2) Atomizador de grafito HGA 70
- 3) Lámpara de arco de deuterio
- 4) Gas puro de nitrógeno.

TENNICIA:

- 1) la sangre o suero se diluye con agua deionizada 1: 10
- 2) De la muestra ya diluida se toman 20 ml con una pipeta Eppendorf, se introduce directamente al horno de grafito.

Para obtener los valores de las concentraciones de las muestras, se corren soluciones estándares de concentraciones conocidas, así se elabora una curva de calibración con la altura del pico en mm contra la concentración de los estándares, donde se pueden calcular las con centraciones de las muestras por interpolación.

VALORES DE REFERENCIA:

120 - 140 mcg/100 ml.

COMENTARIO ACERCA DE LOS METODOS

El método espectrofotométrico con el uso de la oxalildihidrazida es un método bastante fácil y sensible, y se puede llevar a cabo

una microtécnica, reduciéndose el volumen de la muestra y reactivos, en las determinaciones ya sea macrotécnicas o microtécnicas se obtienen resultados idénticos.

En el método donde se utiliza el reactivo 4-(2-quinonilazo) fenol, es una técnica sencilla y sensible y puede realizarse aunque haya presencia de otros iones sin haber interferencias, otra ventaja del método es que no es necesario realizar una extracción, además de que el desarrollo de color es instantáneo y el complejo que se forma es altamente estable.

En espectrofotometría de absorción atómica con uso de un atomizador de grafito tiene varias ventajas, una de ellas es la pequeña cantidad de muestra que se requiere ya sea de sangre o suero, no requiere manipulaciones de largo tiempo y por lo cual se evitan riesgos de contaminación, también la instrumentación analítica es disponible comercialmente y no requiere de costosas modificaciones de los instrumentos. Otra ventaja importante, es la sensibilidad del método para la determinación de cobre.

III.6 CADMIO

1. DETERMINACION DE CADMIO EN SANGRE Y ORINA POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA CON EL USO DEL HORNO DE GRAFITO.

FUNDAMENTO:

Por este método de espectrofotometría de absorción atómica con -

horno de grafito, se puede llevar a cabo la determinación de cadmio ya sea en sangre o en orina, con una previa digestión del material biológico.

APARATO

- 1) Espectrofotómetro de absorción atómica modelo 403
- 2) Lámpara de arco de deuterio
- 3) Horno de grafito HGA 2000
- 4) Registrador

REACTIVOS

- 1) Acido nítrico concentrado
- 2) Agua oxigenada al 30%
- 3) Solución patrón de cadmio. Se prepara una solución de 1000 mg/1 de cadmio en ácido nítrico diluido (10 ml/1)

TECNICA

- 1) En un tubo para digestión se agrega 0.5 ml de sangre ó 1.0 ml. de orina.
- 2) Agregar 1 ml de ácido nítrico concentrado a la muestra de sangre - ó 0.2 ml a la muestra de orina.
- 3) Se coloca el tubo en una parrilla, a una temperatura baja (abajo del punto de ebullición), con un tiempo de 3 horas, hasta reducir el volumen a 1/3

- 4) Adicionar 0.4 ml de agua oxigenada, donde se provoca una evaporación de la muestra.
- 5) Retirar los tubos del calentamiento y los residuos se disuelven en 5.0 ml de ácido nítrico (10 ml/l) la muestra de orina, y 2.0 ml a la muestra de orina.
- 6) Se elabora un blanco con 20 ml de ácido clorhídrico en 1500 ml de agua destilada.
- 7) Se toman 20 mcl de la muestra con una pipeta Oxford y se transfiere al tubo de grafito.
- 8) Las temperaturas óptimas y tiempos en el horno de grafito son:

Secado	150°C	- 30 segundos
Carbonización	300°C	- 60 segundos
Atomización	1950°C	- 8 segundos
Longitud de onda		- 228.8 nm
- 9) Para el cálculo de los valores, se lleva a cabo por interpolación de la curva estándar.

VALORES DE REFERENCIA:

Sangre	2 a 5	mcg/l
Orina	0.5 a 2	mcg/l

2. DETERMINACION DE CADMIO EN SANGRE Y ORINA POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA SIN FLAMA.

FUNDAMENTO:

Antes del análisis, las muestras son diluídas con solventes. No es necesaria la previa digestión con ácido nítrico. Las muestras son precalcínadas en microvasos de grafito en un horno ordinario del laboratorio. De esta manera el cadmio se determina directamente.

APARATO

Espectrofotómetro de absorción atómica equipado:

- a) con una hornilla de grafito
- b) El graficador.
- c) La lámpara de deuterio.
- d) 2 Tubos de grafito; uno cilíndrico para la inyección directa de la muestra. Otro rectangular que se utiliza en conjunción con las muestras, colocadas en los microvasos de grafito.

REACTIVOS;

- 1) Solución de nitrato de amonio.
- 2) solución de fluoruro de amonio
- 3) Solución de fosfato ácido de amonio.

Tienen una concentración de 10 g/l y se tratan con ditiocarbamato pirrolidin amonio, el cual actúa como agente complejante y es extraído como metil, isobutílcetona.

TECNICA:

a) Cadmio en sangre.

- 1) Se agregan 10 mcl de la solución fosfato ácido de amonio, en el microvaso de grafito.
- 2) Se adiciona 10 mcl de sangre.
- 3) Colocar los vasos en el horno del laboratorio.
- 4) Secar la muestra a 100°C.
- 5) Calcinar a 300°C.
- 6) Analizar la muestra.

b) Cadmio en orina

- 1) Se toman 10 mcl y se toman 10 mcl de la solución de NH_4F (10g/l)
- 2) Se coloca en el recipiente y enseguida se ponen en el horno.
- 3) Secar a 100°C.
- 4) Calcinar a 300°C. y analizar la muestra.

Correr una curva estándar, con concentraciones conocidas de cadmio, leer por interpolación la concentración de la muestra.

VALORES DE REFERENCIA:

Sangre	0.7 - 3.8 mcg/l
Orina	0.5 - 3.2 mcg/l

3. DETERMINACION DE CADMIO EN SANGRE POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA SIN FLAMA, UTILIZANDO UN TUBO Y RECIPIENTE DE CARBON.

FUNDAMENTO:

Por este método se permite llevar a cabo una determinación directa de rastros metálicos en material biológico, requiriendo volúmenes de muestra microlíticas, por estos métodos de atomización sin flama - propuesta para la determinación de cadmio en 100 ml o menos de muestra, esta la de absorción atómica con el uso de celdas, varilla y tubo de grafito. En esta determinación el análisis de cadmio en la sangre es directa.

APARATO

Espectrofotómetro de absorción atómica con:

- a) El atomizador de varilla de carbón modelo 63 (Varian Techtron)
- b) Dos celdas diferentes para las muestras construídas de grafito y - recubiertas con grafito pirolítico.
- c) A las celdas se les pasa nitrógeno a una velocidad de flujo de 4.51 l/min.

REACTIVOS

- 1) Solución de ácido fluorhídrico al 38 - 40%
- 2) Sulfato de cadmio (grado analítico). En una solución de ácido ní---

trico al 1%, para obtener una solución patrón de 1 g/l respectivamente.

Los estándares se preparan en el momento del análisis.

Para prevenir la coagulación, todos los estándares y muestras - se tratan con heparina.

TECNICA

- 1) En un tubo se introducen 5 mcl de muestra.
- 2) Agregar 15 mcl de ácido fluorhídrico.
- 3) Mezclar.
- 4) Se pasa por tres fases sucesivas.

Secado	-	150°C	20 segundos
Calcinación	-	530°C	30 segundos
Atomización	-	1340°C	4 segundos

Se utiliza un tiempo constante de 0.001 segundos, para el amplificador de respuesta rápida para el análisis de cadmio.

VALORES DE REFERENCIA:

0.5 - 3.5 mcg/l

4. DETERMINACION DE CADMIO EN SANGRE Y URINA POR ESPECTROFOTOMETRIA DE FLUORESCENCIA ATOMICA DE FLAMA.

FUNDAMENTO

El cadmio en la orina se determina por aspiración directa en una flama separada de aire-acetileno, en la sangre por la disolución 1 + 4, y enseguida la aspiración directa. La fluorescencia es la emisión de la energía que ocurre cuando ciertos compuestos absorben radiación electromagnética, se excitan y luego regresan a un nivel de energía - que de ordinario es algo más bajo que su nivel de energía original.

APARATO

1) Fluorómetro. (fig. 7).

2) Lámpara de descarga sin electrodos (excitada por microondas, se provoca la fluorescencia atómica de cadmio).

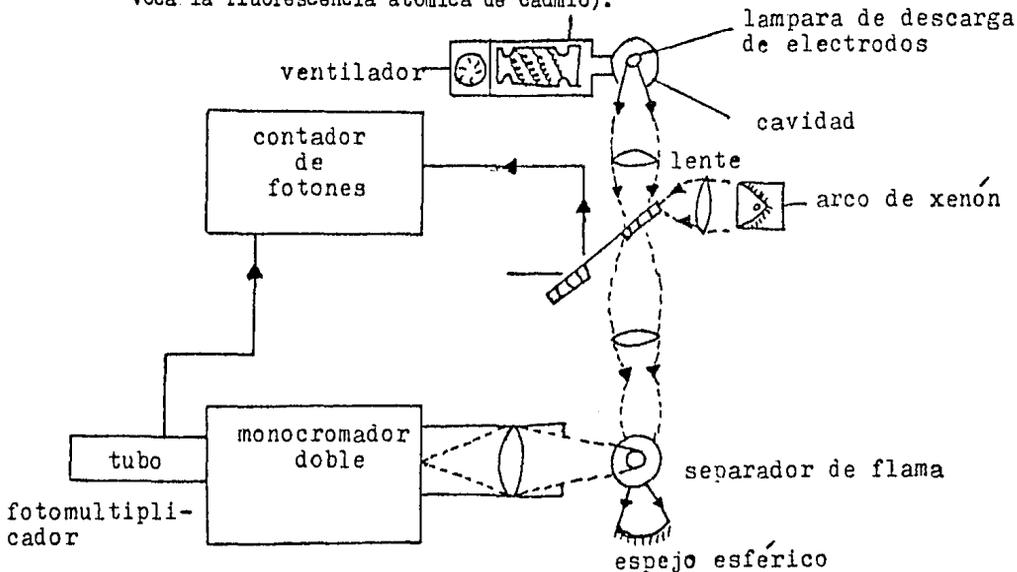


Fig. 7 INSTRUMENTACION

REACTIVOS

- 1) Acido clorhídrico 0.2 M.
- 2) Solución de Tritón X al 25%
- 3) Solución patrón de Cadmio. Una solución Patrón de 2000 mcg/ml de - cadmio en 0.04 M de ácido clorhídrico, se prepara disolviendo una cantidad conocida de cadmio puro, en 10 ml de ácido clorhídrico - 11 M (libre de cadmio).

TECNICA

Muestra: Sangre u orina de 24 horas.

a) En sangre

- 1) En un tubo de centrifugar de 10 ml, adicionar 2 ml de sangre.
- 2) Diluir la muestra a 10 ml con:
 - a) 2 ml de ácido clorhídrico.
 - b) 2 ml de solución de Tritón X.
 - c) 4 ml de agua deionizada.
- 3) Centrifugar a 3000 rpm, 30 segundos.
- 4) Analizar la muestra, con 10 ml es suficiente para un análisis do-
ble.

b) Orina

- 1) Se agregan 3 gotas de ácido clorhídrico a la orina

2) Se aspira directamente en la flama.

Se preparan soluciones de cadmio para construir una curva de calibración para el análisis, tanto para las muestras de sangre como las de orina. Se acidifican los estándares con ácido clorhídrico.

VALORES DE REFERENCIA:

Sangre	3.1 mcg/l
Orina	0.5 mcg/l

COMENTARIO ACERCA DE LOS METODOS

En la determinación de cadmio por espectrofotometría de absorción con el horno de grafito, permite que el cadmio sea medido con una sensibilidad de cien veces más de lo que es posible que con atomizadores de flama. Los métodos con horno de grafito soportan problemas más severos de absorción y hay menos interferencia que los métodos de flama.

En el método de absorción atómica sin flama, las ventajas que presenta es que la contaminación se simplifica con el uso de las micropipetas, que tienen punta de plástico. El tiempo de análisis es pequeño, y con el uso de microrecipientes de grafito, se pueden preparar muchas muestras y pueden ser precalcinadas simultáneamente, de 10 a 20 muestras pueden ser analizadas en una hora, incluyendo los estándares.

dares. Este método es exacto y preciso.

Por la determinación de fluorescencia atómica de flama, la rapidez y simplicidad del método, se atribuyen a la alta sensibilidad de la técnica y al mínimo de muestra pretratada requerida. Pero se ha de mostrado menor exactitud en la determinación de cadmio en orina.

V. CONCLUSIONES

Actualmente en nuestro país no se le ha dado la importancia necesaria a la determinación de metales, ya que el grado de contaminación de ciertas áreas industriales es mayor que en otras.

Se tienen que tomar en cuenta las vías de entrada al organismo de diferentes tóxicos, como en este caso se refiere a metales, siendo estos acumulativos y no son fácilmente detectables.

El mayor problema de intoxicación por estos elementos es la inhalación de sus compuestos y la duración a la exposición. De estos factores depende que pueda existir envenenamiento agudo o crónico, llegando a presentarse síntomas relacionados con otro tipo de enfermedades y si falta algún dato clínico se puede perder la secuencia de la intoxicación.

Por lo anterior, el propósito de este trabajo ha sido el de proporcionar los métodos más usuales en el desarrollo de un programa realizado para problemas toxicológicos, que se presentan cada día y con mayor frecuencia.

En este trabajo se han expuesto métodos de gran utilidad que servirán para eliminar un compuesto o un grupo de compuestos y enfocarse al área específica del tipo de tóxico que en este caso se refiere a ciertos metales pesados.

También se deben de llevar a cabo varias pruebas de comparación para confirmar la presencia de metales en el organismo, por eso, la mayoría de los métodos mencionados son importantes, sin embargo, en la actualidad los más usados son los métodos de espectrofotometría de absorción atómica con flama y sin flama.

En la absorción atómica de flama el método posee la sensibilidad que se requiere para la determinación de metales, sin embargo, el volumen utilizado de muestra, es demasiado grande (10 a 15 ml).

En cambio en el método de absorción atómica sin flama que es de mayor importancia, ofrece la determinación directa de trazas de metales en material biológico, requiriendo solamente mcls de muestra. Este método presenta las siguientes propiedades:

- 1) Tiene mayor sensibilidad sobre otros métodos
- 2) Posee exactitud y precisión
- 3) Las interferencias son mínimas
- 4) Por el poco manejo de la muestra no hay contaminación.

Por todas estas características el método por excelencia para la determinación de metales pesados es el de Espectrofotometría de absorción atómica.

V. BIBLIOGRAFIA

1. American Association of Clinical Chemists., Standard Methods of -
Clinical Chemistry, Vol. IV Academic Pres (1963).
2. Balcells, A., La clínica y el Laboratorio, 11a. Ed., Ediciones Ma
rin (1978).
3. Barua, S., et al., Spectrophotometric Determination of Copper in
Blood serum with 4-(2-Quinolylazo)phenol. Analyst 106 799-802 -
(1981).
4. Bauer, J.D., Clinical Laboratory Methods, 8a. Ed., The M.C.Mosby,
Co., Saint Louis. (1974).
5. Bratzel, M.P., Reed, J.A., Microsampling for Blood Lead Analysis.
Clin. Chem., 20 217-19 (1974).
6. Brooke P.J., Evans W.H., Determination of Total inorganic arsenic
in fish, Shellfish and Fish Products. Analyst. 106 514-16 (1981).
7. Coyle, P., Hartley T., Automated Determination of Mercury in Uri-
ne and Blood by the Magos Reagent and Cold Vapor Atomic Absorp-
tion Spectrometry. Anal. Chem. 53 354-58 (1981).
8. Delves, H.T., A. Microsampling Method for the Rapid Determination
of Lead in Blood by Atomic Absorption Spectrophotometry. Analyst.
95 431-33 (1970).
9. Edipalma, J.R., Drill's Pharmacology in Medicine, 4a. Ed. McGrow-
Hill (1974).
10. Evenson, M. A., et al., Rapid Ultramicro direct Determination of
Erythrocyte Lead Concentration by Atomic Absorption Spectrophoto-
metry with use of a Graphite tube Furnace. Clin. Chem. 20 171-73
(1974).
11. Fernández, F.J., Micromethod for Lead Determination in Whole -

- Blood by Atomic Absorption, with use of the Graphite Furnace, Clin. Chem. 21 558-61 (1975).
12. Foa V., et al., Significance of Metabolites of Arsenic in the Urine and Optimization of Analytic Methods for Their Determination - Mec. Lavoro., 73 365-80 (1982)
 13. Frankel, S., Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis Vol. I, 7a. Ed., The M.C. Mosby Co., Saint Louis (1970).
 14. Gilbert, T.R., Hume, D.N., Improved Apparatus for Determination of Mercury by Flameless Atomic Absorption. Anal. Chim. Acta. 65 461-63 (1973).
 15. Giri, S.K., et al., Determination of Lead in Whole Blood by Electrothermal Atomic-Absorption Spectrometry using graphite probe - Atomisation. Analyst 108 244-53 (1983).
 16. Halls, D.J., et al., Determination of Copper in urine by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. Clin. Chim. Acta. 114 21-7 (1981).
 17. Hatch, W.R., Ott, W.L., Determination of Submicrogram quantities of Mercury by Atomic Absorption Spectrometry. Anal. Chem. 40 - 2085-86 (1968).
 18. Hawley, J.E., Ingle, J.D., Improvement in Cold Vapor Atomic Absorption Determination of Mercury. Anal. Chem. 47 719-21 (1975).
 19. Hernberg, S., et al., Delta-aminolevulinic Acid as a Measure of Lead Exposure, Arch Environ Health. 21 140-5 (1970).
 20. Hinners T.A., Arsenic speciation; Limitation with Direct Hydride Analysis. 105 751-2 (1980).
 21. Hodges, D.J., Skelding, D., Determination of Lead in Blood by Atomic-Absorption with Electrothermal Atomisation. Analyst. 108 813-20 (1983).

22. Hodges, D.J., Skelding, D., Determination of Lead in urine by - Atomic-Absorption Spectroscopy with Electrothermal Atomisation,- Analyst. 106 299-304 (1981).
23. Hwang, J.Y., et al., Direct Flameless atomic Absorption Determination of Lead in Blood. Anal. Chem. 45 795-98 (1973).
24. Wwang, J.Y., et al., Microdetermination of Lead in Blood by Flameless atomic Absorption Espectrometry. Ana. Chem. 43 1319-22 - (1971).
25. Kehoe, R. A., Pharmacology and Toxicology of Heavy Metals: Lead, Pharmac, Thor., 1 161-88 (1976).
26. Kopp, J.F. Ephedine in Cloroformo as a Solvent for Silver Diethyl dithiocarbamate in the determination of arsenic. Anal. Chem. 49 1786-88 (1973).
27. Kubasik, N. P., et al., Carbon rod Atomizer Applied to Measurement of Lead in Whole Blood by Atomic Absorption Spectrometry. Clin. - Chem. 18 1410-14 (1972).
28. Kubasik, N.P., Volosin, M.T., Use of the carbon rod atomizer for direct Analysis of Lead in Blood, Clin. Chem. 20 300-2 (1974).
29. Lagesson, V., Andrasko L., Direct Determination of Lead and Cadmium in Blood and Urine by Flameless Atomic Absorption Spectrophotometry. Clin. Chem., 25 1948-53 (1979).
30. Lauways, R., et al., Intercomparison Program of Lead, Mercury, - and Cadmium Analysis in Blood, Urine, and Aqueous Solutions., - Clin. Chem. 21 551-57 (1975).
31. Lehninger, A.L., Bioquimica, 2a. Ed. Ediciones Omega, Barcelona,- (1979).
32. Lundgren, G., Direct Determinat on of Cadmium in blood with a Temperature-controlled heated Graphite-Tube Atomizer. Talanta 23 -

309-12 (1976).

33. Marcus, M., et al., Micro-Scale Blood Lead Determination in Screening: Evaluation of factors affecting Results. Clin. Chem. 21 - 533-37 (1975).
34. Michel, R.G., et. al., Determination of Cadmium in Blood and Urine by Flame Atomic-Fluorescence Spectrometry. Analyst 104 - 491-504 (1979).
35. Muzzarelli, R.A., Rocchetti, R., Atomic-Absorption Determination of Manganese, Cobalt and copper in whole blood an serum, with graphite Atomizer. Talanta 22 683-85 (1975).
36. Perry, E.F., et al., Determination of Cadmium in Blood and Urine by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry. Clin. - Chem. 21 626-29 (1975).
37. Posma, F.D., et al., Microdetermination of Cadmium and Lead in - Whole Blood by Flameless Atomic Absorption Spectrometry Using Carbon-tube and Carbon-Cup as Sample Cell and Comparison with Flame Studies. Anal. Chem. 47 834-37 (1975).
38. Prasad, A.S., Oberleas, D. (Editores), Trace Elements in Human - Health and Disease, Vol. II, Academic Press (1976).
39. Sharma, D.C., Davis, P.S., Direct Determination of Mercury in - Blood by Use of Sodium Borohydride reduction and Atomic Absorption Spectrophotometry. Clin. Chem 25 769-72 (1979).
40. Slavin, M., Atomic Absorption Spectroscopy, 2a. Ed., John Wiley - (1978).
41. Stevens, B.J., Biological Applications of the Carbon rod Atomizer in Atomic Absorption Spectroscopy. Determination of Copper in - small of tissue. Clin. Chem. 18 1379-80 (1972).
42. Stoppler, M., Brandt, K., Contributions to Automated Trace Analysis. Part II. Rapid Method for the Automated Determination of -

- Lead in Whole Blood by Electrothermal Atomic-Absorption Spectrophotometry. *Analyst.* 103 714-22 (1978).
43. Tietz, N.W., *Fundamentals of Clinical Chemistry*, W.B., Saunders, Co. (1982).
44. Toffaletti, J., Davory, J., Use of Sodium Borohydride for Determination of total mercury in urine by atomic absorption spectrometry. *Anal. Chem.* 47 2091-3 (1975).
45. Ullycci, P.A., Hwang, J.Y., Determination of Cadmium in Biological Materials by Atomic Absorption. *Talanta* 21 745-50 (1974).
46. Underwood, E.J., *Trace Elements in Human Nutrition*, 4a. Ed., Academic Press (1977).
47. Valciukas, J.A., et al., Central Nervous System Dysfunction Due to Lead Exposure, *Sciences* 201 465-67 (1978).
48. 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).
49. Wela, B., *Atomic Absorption Spectroscopy*, Verlag Chemie, (1976).
50. Willis, B., Ultimos Adelantos en las Técnicas de Absorción Atómica para el Análisis de Sustancias Biológicas, *Endeavour*, 32 106-11 (1973).