



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

36

ZET

FACULTAD DE QUIMICA



DESARROLLO DEL METODO PROFESIONALES QUIMICA
PARA DETERMINAR ALUMINIO
EN LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

Q U I M I C A

P R E S E N T A :

NADIA MARCELA MUNGUIA ACEVEDO

MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

PRESIDENTE: Prof. FRANCISCO FERNANDEZ NORIEGA
VOCAL: Profa. LILIANA SALDIVAR OSORIO
SECRETARIO: Profa. MARIA DEL CARMEN SANSON ORTEGA
1er. SUPLENTE: Prof. FRANCISCO ROJO CALLEJAS
2do. SUPLENTE: Prof. JOSE ALEJANDRO BAEZA

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

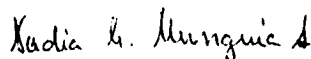
DEPTO. DE QUIMICA ANALITICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE QUIMICA U.N.A.M.
Cd. UNIVERSITARIA

ASESOR DEL TEMA:



DRA. LILIANA SALDIVAR OSORIO

SUSTENTANTE:



NADIA MARCELA MUNGUIA ACEVEDO

A mis tías consentidas
Pepita y Vivi, desde el fondo de mi corazón.

A todos mis amigos
por que me han enseñado el valor de la amistad.

A todos mis maestros
por sus valiosas enseñanzas.

A mi madre

**con profundo amor y gratitud por el apoyo, consejos,
y amor que una linda madre sabe dar.**

A mi padre

con amor y gratitud por todo lo que me ha dado en la vida.

A mis queridísimos hermanos Héctor y Raúl

**que me dieron el ejemplo y
por todas las gratas experiencias
que juntos hemos vivido.**

A Carmen, Rodry, Pau y Riqui,

a Marilú y Raulito,

a Bety y Armando,

a Bety, Chavo, Chavito, Oliver y Berny,

a Armando, Armando Jr., Mario, Jorge y Alejandro,

a Vicky, René, Renecito, Quique y Leonardo,

a Lalo, Clemen y Beto,

a Jorge, Emilia y Camila,

a Arturo,

a Caro, Pablo, Anita y Emilio,

con todo mi cariño.

A Dios

por darme la oportunidad de vivir.

A Gustavo

**gracias, porque con tu amor y apoyo me has
ayudado a realizarme en todos los sentidos,
por todas las alegrías que hemos compartido,
por formar una bella familia y
por confiar en mí, para culminar esta parte de mi vida.**

A Nadia, Bety y Gus

**con todo mi amor a mis tres hijos,
que son el pilar de mi ser.**

Agradezco de manera muy especial y sincera a la Dra. Liliana Saldivar por todas sus enseñanzas, sus consejos, sus estímulos, su apoyo, su paciencia y sobre todo por haberme brindado su amistad.

Agradezco al Dr. Alfonso Escobar su valioso apoyo académico, su orientación y aportaciones para el desarrollo de este trabajo.

Agradezco al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Departamento de Patología el haber proporcionado las muestras.

Agradezco a mi jurado sus valiosas recomendaciones.

Agradezco a todos aquellos que de una u otra manera me ayudaron en la elaboración de esta tesis.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente a la Facultad de Química.

**Proyecta lo difícil
partiendo de donde aún es fácil.**

**Realiza lo grande
partiendo de donde aún es pequeño.**

**Todo lo difícil comienza siempre fácil.
Todo lo grande comienza siempre pequeño.**

**Por eso el sabio nunca hace nada grande
y realiza lo grande, sin embargo.**

**El árbol de ancho tronco
está ya en el pequeño brote.**

**El viaje hacia lo eterno
comienza ante tus pies.**

Lao-Tsé

INDICE

	Pág.
I. ANTECEDENTES	2
II. OBJETIVO	3
III. GENERALIDADES	4
a) Aluminio	
b) Líquido Cefalorraquídeo	
c) Enfermedad de Alzheimer	
d) Técnicas Analíticas	
IV. PARTE EXPERIMENTAL	17
PRIMERA ETAPA	18
a) Equipo	
b) Soluciones y reactivos	
c) Material	
d) Muestras	
e) Técnica	
f) Método	
g) Procedimiento	
SEGUNDA ETAPA	25
a) Equipo	
b) Soluciones y reactivos	
c) Material	
d) Muestras	
e) Técnica	
f) Método	
g) Procedimiento	
V. RESULTADOS	34
VI. DISCUSION Y CONCLUSIONES	59
VII. REFERENCIAS	61

I. ANTECEDENTES

Actualmente existe una gran y creciente demanda de aluminio debido a su gran versatilidad. Entre sus aplicaciones industriales se incluyen el uso del metal solo o en aleaciones con cobre, zinc, silicio, magnesio y manganeso en la manufactura de materiales de construcción, cables aislantes, materiales de empaque, utensilios domésticos e instrumentos de laboratorio, explosivos y fuegos artificiales, así como también el uso de compuestos de aluminio en abrasivos y refractarios, papel, cerámica, vidrio, industrias textiles, sistemas de purificación de agua como catalizadores, en procesos alimenticios y en medicamentos (1). Es por ésto que debe tomarse en cuenta el incremento en la exposición tanto ocupacional como cotidiana al aluminio y sus compuestos.

El aluminio entra al organismo vía oral y respiratoria (2,3). Se ha observado que un incremento en las dosis de aluminio (por alimentos o medicamentos) ocasionan un aumento de la concentración del aluminio principalmente en el cerebro, hígado y sangre (1). Los pulmones y el sistema nervioso central pueden ser considerados como los órganos críticos (u órgano blanco) en la exposición al aluminio ocupacional. Las manifestaciones tóxicas que se encuentran en trabajadores de la industria del aluminio son: la fibrosis pulmonar (4), la acción neurotóxica (1), la hipofosfatemia y cambios en algunas enzimas séricas (1). El contenido de aluminio en la sangre de personas normales está sujeto a variaciones circadianas y es regulado por el sistema nervioso autónomo (el sistema nervioso parasimpático aumenta la acumulación del aluminio en el cerebro y disminuye la concentración del aluminio en la sangre y en el líquido cefalorraquídeo, mientras que el sistema nervioso simpático actúa inversamente).

Se cree que las concentraciones tóxicas del aluminio tienen un significado etiológico en la demencia degenerativa primaria y en la demencia por diálisis (1,5). Las enfermedades que se encuentran asociadas con la concentración elevada de aluminio son: fibrosis pulmonar, enfermedad de Alzheimer, osteodistrofia renal, enfermedad de los huesos asociada con la nutrición total parenteral, anemia, toxicidad gastrointestinal, cardiotoxicidad, cáncer y encefalopatía de diálisis (6).

Son muchos los efectos negativos que se deben a pequeñas cantidades de aluminio en el organismo humano, por lo que es necesario efectuar determinaciones precisas del aluminio en los diferentes materiales biológicos, tanto para conocer los niveles normales como para detectar los niveles anormales en los casos clínicos.

II.OBJETIVO

La determinación del aluminio en el líquido cefalorraquídeo se realiza como monitoreo biológico en personas que tienen problemas crónicos renales bajo diálisis. Estas personas están altamente expuestas al aluminio por las siguientes razones: en primer lugar, la eliminación del aluminio de su organismo vía renal es insuficiente; en segundo lugar, el agua y los concentrados químicos utilizados en la preparación del fluido para la diálisis contienen aluminio (7,8) y finalmente, durante su tratamiento ingieren geles que también contienen aluminio. Todos estos factores contribuyen a una acumulación de aluminio en sangre y tejidos (1).

La enfermedad de Alzheimer es un desorden neurológico común en las sociedades modernas debido al tamaño de su población de edad avanzada. En los Estados Unidos de Norteamérica según el censo de 1980, de una población de 1.2 millones con demencia severa y 2.5 millones con demencia moderada hasta ligera, el 55% padecían la enfermedad de Alzheimer, que corresponde a 2 millones de personas. La acumulación del aluminio en el cerebro ha sido relacionada con la enfermedad de Alzheimer. Para dar un diagnóstico clínico de esta enfermedad, además de una serie larga de diferentes tipos de análisis, se hacen pruebas con el líquido cefalorraquídeo, obteniéndose diagnósticos acertados en un 90% (9).

En México no hay valores normales reportados. Yves Pegon cita un valor promedio de aluminio en personas francesas en el líquido cefalorraquídeo de 19.8 $\mu\text{g/l}$ con una desviación estándar relativa del 2.5% (10) y Tsalev, D.L. menciona un valor promedio reportado originalmente por Clavel, J.D. et al, de 10 $\mu\text{g/l} \pm 2.5$ (11), sin mencionar el país de origen.

Debido a lo anteriormente expuesto, el objetivo de este trabajo es desarrollar una metodología confiable para la determinación del aluminio, a nivel de trazas, en material biológico, específicamente en líquido cefalorraquídeo.

III. GENERALIDADES

a) Aluminio

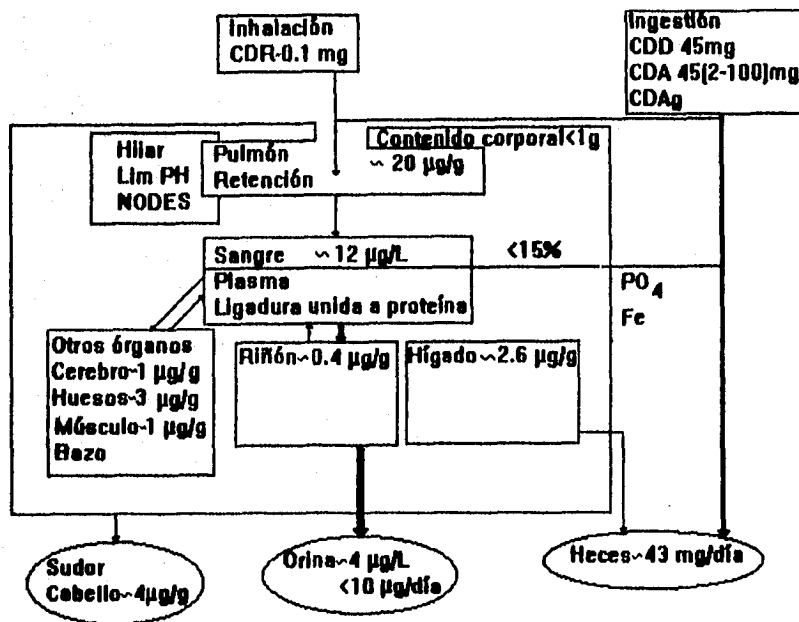
El aluminio es el metal más abundante en la litósfera, pero sus niveles en agua natural, plantas y animales son bajos. El consumo en la dieta diaria se encuentra en el intervalo de 2.3 a 4.5 mg según unos investigadores y de 10 a 100 mg según otros (1). Durante la preparación de los alimentos y su transporte las concentraciones se pueden incrementar debido a los aditivos o al empaque de aluminio. Los niveles que se alcanzan no son considerados como dañinos para la salud. El aluminio tampoco es un contaminante del agua, aún cuando el agua se almacena en depósitos de aluminio o es purificada con $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ o benonita como coagulante (1). La actividad industrial y la emisión de partículas de los automóviles contribuyen a la contaminación atmosférica.

El consumo total diario de aluminio se estima ser de aproximadamente 80 mg por persona. Estas cantidades entran al cuerpo humano ya sea por inhalación hacia los pulmones (por el polvo que se encuentra en el aire) o vía oral-gastrointestinal (comida y agua). En el diagrama #1 se muestra la cinética del aluminio en el hombre en condiciones normales.

La cantidad de aluminio en el cuerpo es de aproximadamente 1 g y se encuentra distribuido en todos los órganos. El metal se encuentra ya en tejido fetal. La absorción del aluminio vía gastrointestinal es baja ($\text{eg} < 15\%$) e interfiere con la absorción de fosfato y hierro. Se sugiere que existe una regulación homeostática del aluminio. En el plasma sanguíneo este elemento está unido a componentes no dializables (1). Diversos estudios clínicos y experimentales no han dado aún las condiciones bajo las cuales ocurre la absorción intestinal del aluminio, pero en experimentos con ratas se ha visto que la absorción intestinal del aluminio depende del pH (14).

Existe la hipótesis de que el aluminio inhalado entra por las neuronas sensoriales del epitelio olfatorio y se deposita en áreas del cerebro que están relacionadas con el olfato (13).

El aluminio se secreta en la leche materna. En cuanto a la eliminación del elemento del cuerpo humano la excreción renal juega un papel importante. La excreción en la bilis es mínima. Las concentraciones fecales reflejan predominantemente la cantidad ingerida y no absorbida. También el sudor es una ruta adicional de la eliminación del aluminio.



CTD = Consumo total diario
CDD = Consumo de la dieta diaria
CDA = Consumo diario en alimentos
CDAg = Consumo diario en agua
CDR = Consumo diario por respiración
EDP = Exposición diaria de la piel

$$CTD = CDD + CDR + EDP$$

$$CDD = CDA + CDAg$$

Diagrama #1
 Cinética del Al en el hombre (condiciones normales)

El aluminio está distribuido en todos los órganos y tejidos. Algunas concentraciones reportadas se encuentran en el cuadro #1.

**CUADRO #1
CONCENTRACION DE AI EN FLUIDOS Y TEJIDOS DEL CUERPO HUMANO***

MUESTRA	UNIDADES	VALORES DE REFERENCIA SELECCIONADOS
Sangre	µg/L	12.5±4
Hueso	µg/g	2.39±1.18 ^{a,b,c} 3.88±1.73 ^{a,b,d}
Cerebro	µg/g	0.5±0.1 1.9±0.7(1.0-3.9) ^a
Líquido cefalorraquídeo	µg/L	10±2.5 19.8(16.5-25.5)
Eritrocitos	µg/L	(42-80)
Heces	mg/día	43
Cabello	µg/g	\bar{x} (3.4-5.6) ^c , (0.8-30) \bar{x} , 5(1-17) \bar{x} , 10.3(1.8-74)
Riñón	µg/g	0.4±0.1
Hígado	µg/g	2.6±1.3
Pulmón	µg/g	18.2±9.7 \bar{x} , 21(10-100)
Leche	mg/L	0.33 0.33±0.042 (0.023-0.872)
Músculo	µg/g	0.5±0.2 1.22±0.72 ^b
Uñas (dedo de la mano)	µg/g	\bar{x} , σ 13.2; \bar{x} , σ 15.7 (2.1-98.6) ^a (16-260) ^a
Plasma o suero	µg/L	2.1±2.2 <4(<2.5-7) 6±3 \bar{x} , 14(3-39)
Sudor	mg/día	6.1(3-10)
Diente (dentina)	µg/g	65.9 68.6±22.5 150±50 ^f ; 210±110 ^g
Diente (enamel)	µg/g	\bar{x} , 5.6(1.5-7.0) 66.6(8-325) 86.13±4.54 89.8 240±80 ^f ; 330±280 ^g
Orina	µg/L	3.7±1.4 4.7±2.5 (3.5-31)

Modificado de Tsalev, D.L., 11.

Peso húmedo a menos que se indique otro

Promedio \pm SD(intervalo en paréntesis)

\bar{x} = media

a = peso seco

b = sin grasa

c = trabecular

d = cortical

e = rango de medias

f = diente permanente

g = diente de leche

El aluminio se considera un elemento traza no esencial en el cuerpo humano y de baja toxicidad en personas sanas. Se supone que su importancia biológica radica en el desarrollo y la actividad del cerebro, así como en la conductividad nerviosa. Especialmente el aluminio activa el sistema succinato oxidasa del miocardio.

Entre los efectos bioquímicos del aluminio se encuentran los siguientes:

- a) Incremento en la ingestión del aluminio, reduce la absorción intestinal del fósforo y crea un balance negativo del mismo, afectando el metabolismo del fósforo y del calcio.
- b) Una concentración alta del aluminio, suprime la fosforilación en la relación ATP/ADP, a nivel celular.
- c) Un exceso de aluminio en las células altera la enzima que transfiere el fosfato en los sistemas que involucran el ATP y el magnesio.
- d) El aluminio tiene un efecto tóxico en la biosíntesis del grupo hem (1).

A partir de la década pasada, el aluminio se reconoce como un metal tóxico (6,14) y debido a los fenómenos clínicos tóxicos asociados a él, lo incluyen en la lista de los elementos iatrogénicos (4).

Para las personas sanas el aluminio ambiental es probablemente poco dañino. Sin embargo, de acuerdo con algunos datos, el aluminio se puede considerar potencialmente tóxico en las enfermedades que afectan su metabolismo (1).

En los individuos con funciones renales normales, los niveles de aluminio en el suero se elevan ligeramente, después de un tratamiento con antiácido de hidróxido de aluminio (15). El aluminio se absorbe vía gastrointestinal y se observa un aumento en el suero, seguido de una eliminación vía orina (4).

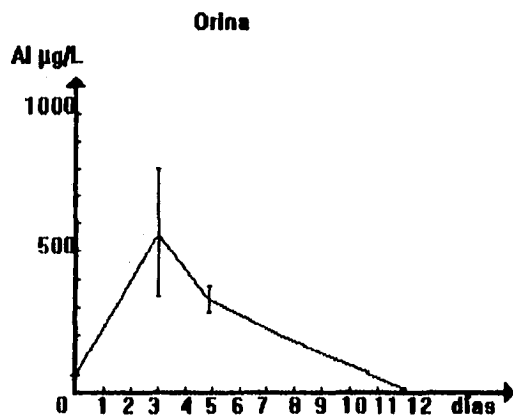
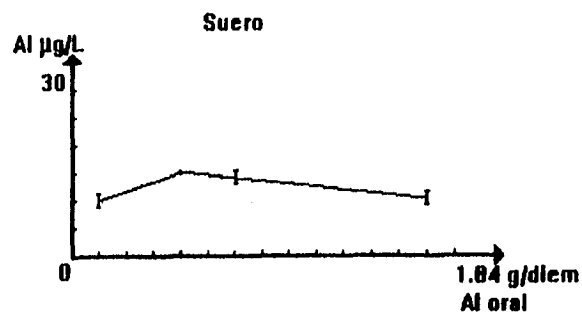


Figura #1
Cambios de la concentración y eliminación de aluminio
en suero y orina después de una administración oral
en 10 personas normales

En cambio, en pacientes con deficiencias renales, aún una absorción intestinal moderada puede producir efectos tóxicos, acumulando el aluminio en diferentes tejidos (1,4). Andress et al (16) observaron que los pacientes diabéticos dependientes de la insulina que tenían problemas crónicos renales, acumulaban el aluminio en la superficie de sus huesos más rápidamente que los pacientes no diabéticos con uremia.

Los investigadores están de acuerdo en que la concentración del aluminio en el cerebro se incrementa durante el envejecimiento normal (6,17,18,19). Sin embargo, las altas concentraciones de aluminio encontradas en los cerebros de pacientes que murieron de demencia degenerativa primaria (enfermedad de Alzheimer o demencia senil) demuestran el posible papel etiológico del aluminio en esta enfermedad (20). La toxicidad del aluminio también está relacionada con el síndrome de encefalopatía por diálisis así como en la osteomalacia en casos encefalopáticos. La absorción y acumulación del aluminio en sangre y

tejidos [especialmente en la materia gris del cerebro (21)] ocurre con deficiencias crónicas renales que se encuentran bajo diálisis (1,4).

El significado toxicológico de la exposición ocupacional del aluminio aun no se ha demostrado totalmente. El significado ambiental en la salud es cuestionable (22) y debe ser aclarado el efecto en niños, en la senectud y en pacientes con insuficiencias y enfermedades renales. Por estos motivos, los niveles de los parámetros no se han fijado todavía.

b) Líquido Cefalorraquídeo.

Los primeros estudios referentes a la composición del líquido cefalorraquídeo datan de principios del siglo XX. El interés en la fisiología del líquido cefalorraquídeo radica principalmente en el hecho de que el líquido cefalorraquídeo es un reflejo de lo que está pasando en el cerebro y de sus funciones reguladoras. Se han hecho estudios sobre su volumen, dónde se forma, su composición iónica y su papel en la regulación de funciones autónomas.

Numerosos estudios (23,24) han demostrado que el líquido cefalorraquídeo tiene efecto sobre la ventilación, la función cardiovascular, el flujo sanguíneo en el cerebro y el estatus mental. Las muestras de líquido cefalorraquídeo utilizadas en esos estudios provienen de la región lumbar y de la cisterna magna.

El líquido cefalorraquídeo es un fluido que se secreta principalmente en los plexos coroideos en el sistema nervioso central. Es un fluido casi libre de proteínas que rodea al cerebro y la médula espinal y ocupa el espacio subaracnoideo y ventricular. El líquido cefalorraquídeo sostiene al cerebro y provee de amortiguamiento mecánico a esta delicada estructura. El líquido cefalorraquídeo es secretado por el plexo coroideo, por el tejido cerebral y por la membrana endotelial de la red capilar. Se piensa que las dos terceras partes del fluido se secretan por el plexo coroideo y un tercio por el tejido cerebral extracoroideo. El líquido cefalorraquídeo se forma y se reabsorbe continuamente; fluye de los ventrículos laterales al tercer y cuarto ventrículos y después pasa al espacio subaracnoideo alrededor de la médula espinal y del encéfalo. La reabsorción total del líquido cefalorraquídeo se hace a través de las vellocidades aracnoideas, localizadas en las paredes de los senos venosos de la duramadre cerebral. Las vellocidades parecen actuar como válvula unidireccional, ya que permiten el flujo del líquido cefalorraquídeo hacia la sangre venosa. Ver figura #2.

El volumen normal del líquido cefalorraquídeo es aproximadamente de 140 ml en el hombre, cerca del 23% se encuentra en los ventrículos cerebrales. El volumen craneal del líquido cefalorraquídeo es cerca del 10% de la cavidad craneal en los humanos y puede ser mayor en otras especies. El promedio de la producción del líquido cefalorraquídeo es aproximadamente del 0.5% de su volumen por minuto (0.75 ml/min), o sea que en un lapso aproximado de 2 a 3 horas se ha producido el volumen total de este líquido.

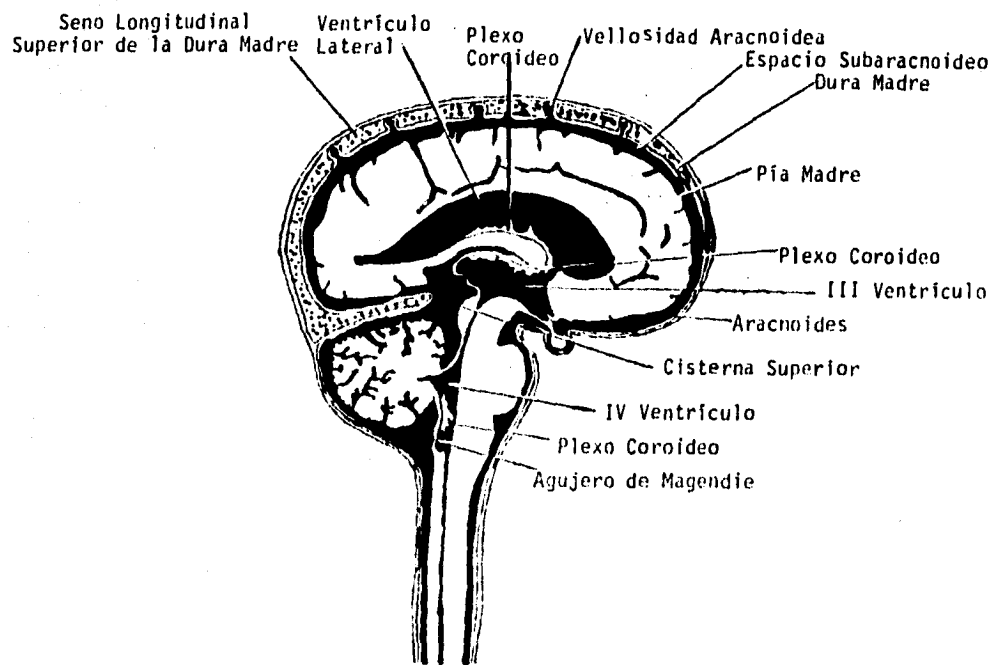


Figura 2.
Diagrama del cerebro humano.

Algunos datos de las concentraciones de especies químicas y presión en el líquido cefalorraquídeo humano se encuentran en el cuadro #2.

**CUADRO #2
DATOS DEL LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO HUMANO***

Sodio, mmol/kg H ₂ O	147.0
Potasio, mmol/kg H ₂ O	2.9
Magnesio, mmol/kg H ₂ O	4.5
Calcio, mmol/kg H ₂ O	1.2
Cloro, mmol/kg H ₂ O	113.0
Bicarbonato, mmol/kg H ₂ O	23.0
pH	7.33 7.35(C)
P _{CO₂} , Torr	49
Proteínas, mg/100 ml	28

*Modificado de Kazemi y Johnson, 23

Nota: Todos los valores del líquido cefalorraquídeo son lumbares, excepto los marcados con (C) que son cisternales.

La separación que existe entre el plasma sanguíneo y el líquido cefalorraquídeo y el fluido del espacio intersticial del cerebro permite que las células de la barrera hematoencefálica (BHE) regulen el movimiento de sustancias y iones hacia fuera y dentro del cerebro. Esto previene la entrada de ciertas sustancias al cerebro y facilitan el transporte a otras. Esta BHE permite gradientes de concentración de proteínas, aminoácidos y iones entre el plasma y el líquido cefalorraquídeo y el fluido del espacio intersticial del cerebro (23,24).

Las determinaciones de aluminio en el líquido cefalorraquídeo se realizan generalmente en pacientes con problemas neurológicos (1). Las muestras del líquido cefalorraquídeo se toman por punciones lumbares en tubos de plástico previamente tratados. Debido a que los niveles de concentración son muy bajos, el control de la contaminación es esencial.

Algunos parámetros fisicoquímicos del líquido cefalorraquídeo lumbar se presentan en el cuadro #3.

**CUADRO #3
PARAMETRO DE LA MATRIZ DEL LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO***

PARAMETRO	UNIDAD	VALOR**
Sustancia seca	%	1.08(0.85-1.7)
Residuo de cenizas	%	0.67
Densidad	g/cm ³	(1.002-1.009)
Tensión superficial	dyn/cm ³	(60-63)
Viscosidad relativa		(1.01-1.06)

*Modificado de Tsalev, D.L., I.

**Valor promedio; el intervalo se encuentra entre paréntesis

En algunos casos patológicos el contenido proteico de las especies puede aumentar a 50 g/l ocasionando que las muestras estén turbias, viscosas e inestables durante su almacenamiento. En esos casos es recomendable utilizar adiciones estándar para su análisis (1).

c) Enfermedad de Alzheimer

El primer caso de la enfermedad de Alzheimer fue reportado en 1907 por el propio Alois Alzheimer. El realizó la autopsia en una señora que murió a los 51 años con demencia progresiva y encontró que con tinciones de plata se demostraba la presencia de neuronas anormales que contenían "bucles" u "ovillos" formados por el citoesqueleto neurofibrilar engrosado, fuertemente argirófilos, y abundantes terminaciones nerviosas degeneradas, las llamadas "placas neuríticas" o "placas seniles", muchas de ellas con depósito de la proteína Beta-amiloide.

El mundo médico denominó esta demencia como la Enfermedad de Alzheimer, una forma de la demencia presenil. En 1955, Roth demostró que los cambios mentales se podían deber a una variedad de enfermedades tanto funcionales como orgánicas, iniciándose así la era moderna sobre los conocimientos de la enfermedad de Alzheimer. A principios de los sesentas, Terry, et al y Kidd demostraron que los cambios ultraestructurales en los cerebros de personas mayores con la enfermedad del tipo de Alzheimer y aquellos con demencia senil eran idénticos. Estos conocimientos junto con los de Blessed, et al y Terry, et al guiaron al reconocimiento de la enfermedad de Alzheimer como una entidad individual (9). A partir de entonces el interés en la enfermedad de Alzheimer ha venido en aumento y diversos investigadores se dedicaron a cuantificar el aluminio en diferentes áreas del cerebro de personas sin enfermedades neurológicas (control) y en los casos con demencia presenil y senil del tipo Alzheimer. Entre los estudios realizados, Traub reporta de 1.9 a 3.0 $\mu\text{g Al/g}$ peso seco en cerebros de personas con Alzheimer y de 0.9 a 2.4 $\mu\text{g Al/g}$ peso seco en personas control (25); Mc Dermont reporta de 0.15 a 19.6 $\mu\text{g Al/g}$ peso seco en personas control y de 0.15 a 18.5 $\mu\text{g Al/g}$ peso seco en las personas con Alzheimer (26); Crapper y Krishnan citan de 0.23 a 2.7 $\mu\text{g Al/g}$ peso seco en personas control y mayor a 4 $\mu\text{g Al/g}$ peso seco en personas con Alzheimer (27,28). La diferencia entre los resultados reportados por los investigadores se debe al tamaño de la muestra utilizada para el análisis, el criterio en la selección de la muestra, la variación del método analítico y la variación en la fuente y naturaleza del material patológico. Se ha encontrado que es esencial utilizar pequeñas cantidades de muestra (~ 10 mg peso seco) y asegurarse de que las muestras de los cerebros control no contengan degeneraciones neurofibrilares y las de los cerebros con Alzheimer sí (6,26,28). Además, la concentración del aluminio dentro de cada región del cerebro es altamente variable debido a que la distribución del metal no es uniforme. Es menor en el cuerpo calloso de la materia blanca y es mayor en la materia gris. Por otra parte, la variación en la exposición o el suministro ambiental del aluminio puede afectar el nivel de concentración del metal en el cerebro (21,26,27).

Actualmente se sabe que el aluminio es neurotóxico y que se acumula en el cerebro principalmente en la materia gris. Se sabe que está relacionado con la enfermedad de Alzheimer; sin embargo, no se conoce exactamente el papel patológico en esta enfermedad (14,21,27,29). Hay dos puntos de vista opuestos sobre el significado funcional del aluminio en la enfermedad de Alzheimer: uno que dice que el aluminio simplemente se acumula de manera pasiva en las neuronas que están relacionadas con el proceso degenerativo en la enfermedad de Alzheimer y que la acumulación no es significativa en el mecanismo de la enfermedad, y el segundo, que dice que el aluminio es un candidato plausible para ser factor neurotóxico ambiental que actúa en la patogénesis de los procesos neurodegenerativos asociados con el tipo de degeneración neurofibrilar de Alzheimer (14,21,30,31,32,33,34).

Son cuatro los sitios principales en donde se acumula el aluminio en el cerebro y que han sido identificados en la enfermedad de Alzheimer: a) las estructuras del DNA contenidas en el núcleo, b) en las moléculas proteicas de los "ovillos" neurofibrilares, c) en los depósitos de amiloide de las placas seniles y d) en ferritina cerebral (6,13,21,28,35).

El nivel neurotóxico del aluminio para el hombre propuesto por Crapper, Krishnan y Dalton (27) es de 4 a 6 $\mu\text{g/g}$ y el de Mc. Dermott et al es de 10 a 20 $\mu\text{g/g}$ (26).

La mayoría de las personas con demencia pueden caer en dos categorías, un grupo mayor del 50 al 60% con cambios característicos de la enfermedad de Alzheimer y un grupo menor del 10 al 20% con enfermedades vasculares y múltiples infartos. Algunos pacientes caen en ambos grupos. Quizá en el 5% de los casos la causa permanece aun desconocida a pesar de extensos estudios post mortem. La demencia se reconoce ahora como un síndrome caracterizado por el deterioro intelectual que ocurre en el adulto y que es lo suficientemente severo para interferir con la ejecución ocupacional o social (la característica funcional se necesita diferenciar de demencia temprana de cambios leves en la memoria que ocurren durante el envejecimiento normal). Los cambios cognoscitivos incluyen no solamente los distribuidos en la memoria sino todos los distribuidos en otras áreas cognoscitivas como el uso del lenguaje, percepción, práctica y habilidad para aprender, habilidades o destreza necesaria, resolución de problemas, pensamiento abstracto y emisión de juicios. Características personales se mantienen o se intensifican en algunos pacientes y se alteran en otros. La evasión social y el miedo son comunes. Se puede desarrollar irritabilidad, agitación y aun agresión física y verbal contra miembros familiares, particularmente si la demencia progresa y el paciente siente un incremento en la pérdida de control de su medio ambiente. Al principio de la demencia, frecuentemente los pacientes mantienen su habilidad social y de conversación; más aún, ellos pueden estar ignorantes de que tienen culaquier déficit cognoscitivo, o pueden negar la presencia de dichos problemas (9). La duración de esta enfermedad en promedio es de 10 años (el rango es de 2 a 19 años)(6).

Para dar un diagnóstico clínico con casi el 90 % de seguridad, los médicos deben efectuar pruebas formales del status mental además de una historia cuidadosa tomando en cuenta los exámenes físicos, psiquiátricos y neurológicos.

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad a la cual todas las personas están expuestas, por lo que es de gran interés para las instituciones de salud pública. En los Estados Unidos de Norteamérica se estima que un promedio del 4.6% de personas mayores de 65 años de edad tienen demencia severa y el 10% tienen un grado de disfunción cognoscitiva de leve a moderada, y para el año 2000 se incrementará a un 17%. El porcentaje de demencia grave aumenta a un 15% en personas mayores de 85 años de edad. En personas de 75 a 85 años se encontró que los casos de demencia se presentan con la misma frecuencia que los infartos (6,9,29). Debido a que la enfermedad de Alzheimer es una enfermedad frecuente en personas de edad avanzada, es un foco de atención para las comunidades de investigación de diferentes partes del mundo.

d) Técnicas Analíticas.

Las concentraciones normales del metal en material biológico son relativamente pequeñas, por lo general del orden de microgramos por gramo. La clave para obtener un monitoreo de aluminio confiable radica en la exactitud y precisión del método analítico junto con la recolección de la muestra sin contaminación externa. Uno de los problemas principales en la determinación de trazas de aluminio en muestras biológicas es la contaminación externa que éstas adquieren durante su recolección, almacenamiento, transportación y su manipulación. El aluminio se puede determinar por varios métodos; sin embargo, las interferencias de otros metales, problemas en la matriz de la muestra y la sensibilidad inadecuada limita el número de técnicas posibles. La mayoría de las técnicas instrumentales requieren equipos muy costosos, lo cual en ocasiones reduce las posibilidades para utilizar algún método analítico más sensible. Entre las técnicas para la determinación de trazas de aluminio en material biológico se encuentran: espectrofotometría de absorción atómica con flama o con horno de grafito, espectrometría por emisión con plasma, espectrografía, activación neutrónica y espectrometría de masas (11,21,36,37).

La técnica de espectrografía es una técnica clásica para la determinación de trazas de aluminio en muestras biológicas y por lo general se lleva a cabo una calcinación de la muestra. Con esta técnica se ha determinado aluminio en sangre, huesos, heces, leche, saliva, suero/plasma, dientes y tejidos (11).

Varios investigadores han utilizado la técnica de activación neutrónica para determinar el contenido de aluminio en muestras biológicas, sin y con algún proceso químico previo. El análisis instrumental de activación neutrónica implica el bombardeo de una muestra con neutrones y la medición de la radiactividad inducida por las reacciones nucleares. Con la activación, ^{27}Al forma el nuclido ^{28}Al por una reacción (n,y). Entre los atractivos de esta técnica se incluyen sensibilidad, una independencia relativa de la matriz, una menor contaminación de la muestra, ya que ésta se analiza directamente con una manipulación mínima y la ausencia de blancos. Sin embargo, esta técnica también tiene varios inconvenientes. Existe la dificultad de separar el aluminio de isótopos que causan interferencia como el sodio, cuyo tiempo de vida media es menor a la del aluminio. Otro

problema es que las reacciones neutrónicas rápidas del fósforo también producen ^{28}Al , por lo que es necesario hacer una corrección. Debido a que la vida media del ^{28}Al es pequeña, del orden de 2.27 minutos, junto con los problemas asociados con las separaciones químicas o con las interferencias espectrales, convierten a la activación neutrónica en una técnica poco conveniente y poco práctica para muchos investigadores. Se han hecho determinaciones de aluminio con esta técnica en sangre, huesos, cabello, uñas, suero/plasma, dientes y cerebro (6,11,17,28,36,37).

La técnica de espectrometría de masas ha sido utilizada por muy pocos laboratorios. Los análisis de aluminio realizados en muestras biológicas se han hecho en sangre, líquido cefalorraquídeo, cabello, uñas, plasma, dientes (11) y cerebro (17,21,28).

La espectrofotometría de absorción atómica ha sido empleada ampliamente para analizar el contenido de aluminio en muestras biológicas. Esta técnica se puede elegir para la rutina en los laboratorios químicos de análisis (36). En una flama reductora de óxido nitroso-acetileno, a una longitud de onda de 309.3 nm, la concentración característica es de 0.3 a 1 $\mu\text{g/ml}$ y el límite de detección es de 0.03 $\mu\text{g/ml}$. Se agrega un buffer de ionización, como por ejemplo KCl, tanto a la muestra como a los estándares. La estequiometría de la flama y la altura de la misma se deben optimizar cuidadosamente para reducir interferencias y para obtener una buena relación señal-ruido. Los medios apropiados para la determinación del aluminio con esta técnica son ácidos diluidos y extractos de disolventes orgánicos (11). Esta técnica es sensible, pero no lo suficiente para algunas muestras biológicas, cuya concentración de aluminio es muy baja. La espectrofotometría de absorción atómica con flama se utiliza en muestras que tienen una concentración relativamente alta, como por ejemplo digestiones de alimentos y heces fecales. Esta técnica se ha utilizado para determinar aluminio en cerebro (6,21,27,28), líquido cefalorraquídeo (27,38), tejidos de ratas, alimentos orina heces, corazón, plasma y tejidos (11,37).

La técnica más sensible y selectiva para determinar concentraciones de nanogramos de aluminio en muestras biológicas es la espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito. En esta técnica la muestra se coloca en un tubo de grafito que está montado en el paso de la fuente luminosa del espectrofotómetro. La fuente luminosa proviene de una lámpara de cátodo hueco que contiene el metal que se va a analizar y emite energía a longitudes de onda características de dicho metal. Primero se calienta el tubo de grafito a baja temperatura para secar la muestra. En el segundo paso, la muestra es calcinada para destruir y eliminar la materia orgánica y evaporar las especies inorgánicas que pueden interferir y finalmente la temperatura se aumenta rápidamente y el material por analizar se atomiza; los átomos en estado basal absorben la luz que pasa por el tubo de grafito. Las ventajas de esta técnica son: 1) se puede eliminar, por lo general, el pretratamiento de la muestra, 2) la cantidad de muestra necesaria es pequeña (de 2 a 100 μl), 3) el horno de grafito es capaz de alcanzar la temperatura necesaria para pasar los átomos a su estado basal y 4) los átomos permanecen en el paso de la luz por un tiempo relativamente largo, lo cual incrementa la sensibilidad. Por otra parte, las muestras biológicas contienen una serie de compuestos que pueden interferir en la determinación del aluminio con horno de grafito. Los cloruros producen una interferencia negativa debida a la formación del cloruro de aluminio. El cloruro

de aluminio es volátil, por lo que la presencia de cloruros puede producir la pérdida de aluminio durante el secado de la muestra. El suero tiene proteínas, las cuales pueden producir un residuo orgánico que puede interferir en el análisis. El ácido perclórico no se recomienda para la digestión de muestras biológicas analizadas por esta técnica ya que reduce la respuesta del aluminio, aún en pequeñas concentraciones ($\text{HCl} > 0.01\text{M}$). Sin embargo, se han desarrollado una variedad de procedimientos para eliminar estas interferencias, entre las que se encuentran: 1) frecuentemente se efectúa una simple dilución de la muestra antes de ser inyectada para minimizar el efecto de las proteínas, 2) la adición de hidróxido de amonio ayuda a eliminar el efecto de los cloruros debido a la formación del cloruro de amonio que es volátil, 3) se sugiere utilizar ácido nítrico y sulfúrico para la digestión de material orgánico de la muestra, 4) la adición de EDTA previene la precipitación de fosfatos insolubles en diluciones de mezclas alcalinas, y otros (11,37,39). Se han hecho determinaciones con horno de grafito en: bilis (11), sangre (5), hueso (11), líquido cefalorraquídeo (10), cabello (11), suero (5,11,36), fracciones de proteínas de suero (11), dientes (11), tejidos (5), orina (5) y cerebro (25,26,28).

El uso de la espectrometría por emisión con plasma está creciendo firmemente, ya que es una técnica lo suficientemente sensible para determinar trazas de elementos en diversas muestras (límite de detección de 0.2 a 5 ng/ml), y todo lo que se necesita es una dilución de los líquidos biológicos o digestiones. En esta técnica se ioniza una corriente de argón por un aparato de radiofrecuencia y el plasma de argón ionizado puede alcanzar temperaturas de 4000°C . La espectrometría por emisión con plasma es una técnica multielemental (se pueden determinar 80 elementos simultáneamente), la cual está relativamente libre de interferencias químicas. Los problemas de matriz que existen en espectrofotometría de absorción atómica se eliminan en esta técnica debido a la temperatura de excitación tan alta de la muestra. Por esto esta técnica debe ser particularmente útil en la determinación de elementos refractarios como el aluminio y la sílice. El problema principal en la determinación de aluminio por esta técnica es la emisión intensa y extensa del calcio, la cual incrementa la señal de fondo del aluminio y puede aumentar el límite de detección de este elemento. La solución a este problema se complica, ya que el efecto del calcio varía con su concentración. Sin embargo, la sensibilidad de la espectroscopia por emisión con plasma es, en diversos casos, comparable con la del horno de grafito, por lo que puede ser una excelente alternativa para aquellos laboratorios que poseen la instrumentación apropiada. La mayor limitante de esta técnica para ser utilizada por los laboratorios es el alto costo del instrumento y el costo de mantenimiento (11,37). Se han hecho análisis de sangre, heces, suero/plasma, dientes, orina y tejidos (11).

IV. PARTE EXPERIMENTAL

La parte experimental se realizó en dos etapas. En la primera se trabajó con el espectrofotómetro de absorción atómica con flama y en la segunda con el horno de grafito sin automuestreador.

El trabajo se realizó en dos etapas debido a que cuando se empezó el trabajo se contaba únicamente con el espectrofotómetro de absorción atómica con flama. Se tenía el antecedente de que se habían analizado muestras de líquido cefalorraquídeo con flama (27,38) y se procedió a desarrollar la metodología en este equipo.

Para la segunda etapa hubo la necesidad de implementar el equipo de absorción atómica con la instalación eléctrica adecuada, el regulador de voltaje, la instalación y tanques de gases con sus manómetros respectivos y la instalación del mismo horno de grafito. Con las condiciones e instalaciones necesarias para trabajar con el horno de grafito, se implementó la metodología en el mismo equipo, pero con horno de grafito; se inició con el tubo de grafito pirorrecubierto y posteriormente con el tubo de grafito pirorrecubierto con plataforma de L'vov. Finalmente se trabajaron las muestras de líquido cefalorraquídeo con la metodología desarrollada en el horno de grafito con el tubo de grafito pirorrecubierto con plataforma de L'vov utilizando solución modificadora de matriz y sin automuestreador.

PRIMERA ETAPA

a)Equipo

Se utilizó un espectrofotometro de absorción atómica Perkin Elmer 2380 para hacer la determinación de aluminio en 20 muestras de líquido cefalorraquídeo por flama. Las condiciones del aparato en las cuales se hicieron todas las lecturas fueron las siguientes:

- Longitud de onda: 309.3 nm
- Ancho de banda: 0.7
- Lámpara: lámpara de aluminio de cátodo hueco
- Gases: acetileno-óxido nitroso
- Expansión de escala: 10

b)Soluciones y reactivos

-Solución Titrisol de Al^{3+} de 1000 ppm de Merck

En un matríz volumétrico de 1000 ml se disolvió el contenido de una ampollita Titrisol de aluminio y se llevó al aforo con agua destilada desionizada.

-Solución de K^+ de 10,000 ppm

Se pesaron 19.0718 g de KCl de Merck y se disolvieron en agua destilada desionizada. Esta solución se pasó a un matríz aforado de 1000 ml y se aforó con agua destilada desionizada.

-Solución para calibrar el aparato

Se preparó una solución de 50 ppm de Al^{3+} y 2000 ppm de K^+

-Solución de Al^{3+} de 10 ppm

Se preparó una solución de 10 ppm de Al^{3+} a partir de la solución de 1000 ppm de Al^{3+}

-Blanco

Se preparó una solución de 2000 ppm de K^+

-Solución de HNO_3 al 10%

Se prepararon 5 litros de ácido nítrico al 10% y se pusieron en un recipiente de plástico para la limpieza del material.

-Agua destilada desionizada.

Todos los reactivos fueron calidad Reactivo Analítico.

c)Material

-Matraces volumétricos de 5, 10, 25, 50 y 1000 ml

-Pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 5 y 10 ml

- Vasos de precipitados de 50, 100 y 250 ml
- Probeta de 50 ml
- Piseta
- Tubos de ensayo
- Frascos de polietileno

Dado que la limpieza del material juega un papel muy importante en la determinación del aluminio en el líquido cefalorraquídeo, todo el material que se utilizó se dejó previamente 48 horas en ácido nítrico al 10% y después se enjuagó varias veces con agua destilada desionizada y se dejó secar a temperatura ambiente (40). Una vez preparadas las soluciones, reactivos y muestras se vaciaron inmediatamente a recipientes de polietileno previamente tratados con la técnica de limpieza anteriormente descrita.

d) Muestras

Se recolectaron muestras de líquido cefalorraquídeo en tubos de ensayo y se congelaron a -10°C . Con estas muestras se montó la técnica. El resto de las muestras para el análisis se recolectaron, con las precauciones necesarias para evitar la contaminación de las mismas, en frasquitos de polietileno nuevos y se congelaron a -10°C . Previamente se dejaron estos frasquitos nuevos en una solución de ácido nítrico al 10 % durante 72 horas, se enjuagaron muy bien con agua destilada desionizada y se dejaron secar a temperatura ambiente (40).

e) Técnica

La técnica empleada en la determinación del aluminio en las muestras del líquido cefalorraquídeo es la espectrofotometría de absorción atómica. La espectrofotometría de absorción atómica es una técnica de gran versatilidad, pues se pueden determinar unos 70 elementos en una gran variedad de muestras. También tiene una buena sensibilidad con un límite de detección bajo y es de alta precisión debido a la eficacia y reproducibilidad en la fase de atomización. Se pueden determinar concentraciones de un elemento en el intervalo de partes por millón a partes por billón (nota: en este trabajo, partes por billón, ppb, se refiere a $\mu\text{g/L}$). Los análisis se realizan rápida y cómodamente y se pueden utilizar pequeñas cantidades de muestra, lo que hace que sea una técnica de bajo costo. Por todas estas razones la espectrofotometría de absorción atómica es una técnica apropiada para determinaciones de rutina de trazas de elementos en un equipo con el que cuenta la mayoría de los laboratorios actualmente.

La espectrofotometría de absorción atómica comprende tres técnicas basadas en la medida de la absorción, emisión o fluorescencia de la radiación electromagnética. La técnica de emisión mide la radiación emitida por un átomo cuando éste es excitado por una radiación de longitud de onda adecuada y regresa a su estado de baja energía o estado fundamental. El tiempo de vida de una especie excitada es muy pequeño y la pérdida de la energía de excitación puede ser en forma de calor o en forma de radiación fluorescente o fosforescente.

La técnica de absorción atómica mide la radiación absorbida por un átomo cuando éste absorbe la energía del fotón necesaria para pasar de su estado fundamental a uno de sus niveles energéticos excitados. Ya que la diferencia de energía entre el estado fundamental y sus niveles energéticos excitados es característica para cada elemento, la longitud de onda de la fuente de energía corresponde al elemento. En espectrofotometría de absorción atómica se utilizan las lámparas de cátodo hueco como fuente de energía luminosa. Ellas emiten luz de la longitud de onda específica de cada elemento. Por ello la concentración de los átomos de un elemento analizado se puede calcular con base en la cantidad de luz que se ha absorbido.

Cuando un haz de luz de intensidad " I_0 " incide en un medio de longitud " l " que contiene átomos de concentración " c ", parte del haz de luz va a ser absorbido y la intensidad se va a reducir a " I ". Ver figura #3.

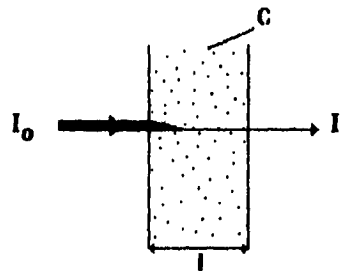


Figura #3

La ecuación de la relación entre " I " e " I_0 " sería:

$$I = I_0 \cdot e^{-klc}$$

pasando a \log_{10}

$$-\log \frac{I}{I_0} = klc \quad \dots(1)$$

donde

$$-\log \frac{I}{I_0} = \text{absorbancia}$$

k = constante proporcional

l = longitud de la celda (cm)

c = concentración

La ecuación (1) es llamada la ley de Lambert-Beer. La ley de Lambert-Beer dice que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de los átomos.

Por lo general se mantiene la relación lineal entre la absorbancia y la concentración. Sin embargo, existen desviaciones a esta relación lineal que en ocasiones representan limitaciones a la ley de Beer. La ley de Beer se aplica a soluciones en las cuales las

interacciones dependientes de la concentración de las moléculas o iones absorbentes son mínimas, (por lo general a concentraciones menores de 0.01M). También surgen desviaciones debidas a que la absorptividad molar de una sustancia depende del índice de refracción de la solución, que a su vez depende de la concentración del analito, cuando las concentraciones son superiores a 0.01M. Estos cambios en el índice de refracción dan lugar a variaciones en la absorptividad molar del analito dependientes de la concentración, y por lo tanto, a desviaciones de la ley de Beer.

Otro tipo de desviaciones aparentes de la ley de Beer se encuentran cuando las especies absorbentes experimentan asociación, disociación o reacción con el disolvente, originando productos con características absorbentes distintas del analito. Finalmente pueden surgir desviaciones a la ley de Beer por la falta de cromaticidad de la fuente luminosa. Sin embargo, en la práctica sólo aparecen desviaciones significativas cuando la banda de la radiación utilizada corresponde a una región del espectro en la que se producen grandes cambios en la absorbancia en función de la longitud de onda (41,42).

En la espectrofotometría de absorción atómica con flama, la atomización y absorción ocurre en la flama producida en un quemador. Este es el método más usado.

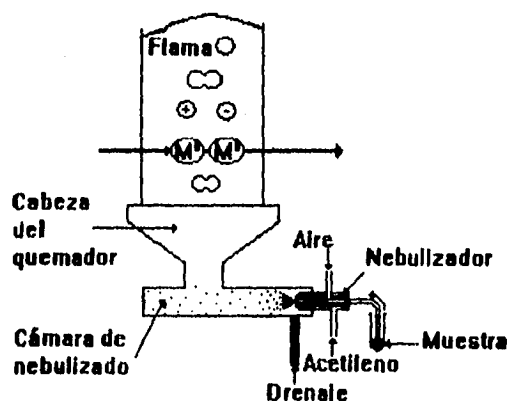


Figura #4 Atomización en la flama

Observando la figura #4 se ve al nebulizador, que es un pequeño accesorio que introduce la muestra líquida en la flama a una velocidad estable y reproducible. Generalmente se utilizan nebulizadores neumáticos y la disolución es introducida a una velocidad entre 1 y 4 ml/min. La disolución llega a la cámara de nebulizado donde golpea con un obstáculo, el "spoiler" o la esfera de impacto, y las gotas más grandes son fragmentadas en partículas más pequeñas. De estas gotitas las más grandes se drenan y sólo las más pequeñas se mezclan con el combustible y el oxidante. Después de que la muestra y los gases se han mezclado en la cámara de nebulizado, llegan a la cabeza del quemador donde se queman, favoreciéndose la combustión por el aire de los alrededores. En la cabeza del quemador se encuentra la flama

donde la muestra pasa del estado líquido al estado gaseoso y se disocian los compuestos moleculares del elemento analizado, en átomos en estado basal. Aquí se lleva a cabo la absorción atómica al pasar el haz de luz por esta parte de la flama.

En espectrofotometría de absorción atómica se utilizan varios tipos de flama, pero dos son los más comunes. La flama de aire-acetileno es la más usada. Tiene una temperatura de aproximadamente 2300°C y con ella se pueden analizar 30 elementos. La otra flama es la de acetileno-óxido nítrico, cuya temperatura es aproximadamente de 2900°C (42). Esta flama se utiliza para determinar elementos refractarios como el Al, V, Ti, etc., ya que estos elementos forman moléculas muy estables que difícilmente se rompen a temperaturas más bajas.

f) Método

El método que se utilizó en este trabajo es el método de las adiciones estándar. Es un método muy útil que permite trabajar ya sea con concentraciones muy bajas y/o trabajar en presencia de una interferencia sin eliminarla y realizar una determinación exacta. Se prepara una curva de calibración en presencia de la interferencia.

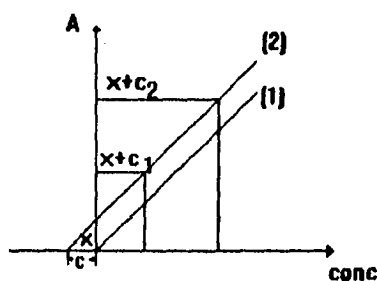


Figura #5 Adiciones estándar

En la figura #5 la línea que pasa a través del origen [1], representa una línea de calibración típica para un juego de soluciones patrón. La absorbancia cero está definida para un blanco y como la concentración del elemento aumenta, se observa un incremento lineal en la absorbancia. En el método de las adiciones estándar se toman ahí cuotas iguales de una muestra, por ejemplo, tres porciones iguales. No se añade nada a la primera porción y a las porciones 2 y 3 se añaden diferentes cantidades conocidas del estándar. Finalmente se diluyen todas las porciones a un mismo volumen, de tal forma que las concentraciones finales de los constituyentes de la muestra original serán las mismas en cada caso. Sólo la cantidad del analito añadido diferirá por una cantidad conocida. Al graficar absorbancia VS concentración se obtiene una recta paralela [2] a la curva de calibración de los estándares. Prolongando la escala de concentración sobre la abscisa hasta después del cero y extrapolando la línea de calibración hasta que intersecte el eje de las concentraciones, se determina la concentración para la muestra sin adición.

g) Procedimiento

Se variaron las condiciones de trabajo para obtener el máximo de respuesta, para lo cual se tomó en cuenta el tipo de flama, la presión y flujo de los gases (para tenerlos en la relación estequiométrica adecuada), la longitud de onda, el ajuste del nebulizador, la alineación de la lámpara y de la cabeza del quemador. Con las condiciones óptimas encontradas se desarrolló todo el trabajo práctico.

El aparato se calibró con una solución de 50 ppm de Al^{3+} y 2000 ppm de K^+ , utilizando como blanco una solución de 2000 ppm de K^+ .

Primero se efectuó el estudio de linealidad en un intervalo de 1 a 50 ppm de Al^{3+} . En matraces aforados de 25 ml se pusieron 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40 y 50 ppm de Al^{3+} y en todos 2000 ppm de K^+ y se aforaron con agua destilada desionizada. Todas las disoluciones se prepararon y leyeron por triplicado y los resultados obtenidos se encuentran en la gráfica #1. Las disoluciones anteriores también se leyeron con expansión de escala de 10, los resultados se encuentran en la gráfica #2.

Para determinar el intervalo de confianza (43), se prepararon 32 disoluciones de 1 ppm de aluminio, todas en iguales condiciones. Para ello se pusieron en matraces aforados de 10 ml 1 ppm de Al^{3+} y 2000 ppm de K^+ y se aforaron con agua destilada desionizada. Se obtuvieron los valores de absorbancia por triplicado de cada una de las disoluciones con y sin expansión de escala de 10. Lo mismo se hizo para 2 y 3 ppm de Al^{3+} . Con estos resultados se obtuvieron las gráficas #3, #4 y #5 respectivamente.

Para determinar el límite de detección y el límite de cuantificación (44,45), se prepararon tres curvas de calibración de 1, 2, 3 y 4 ppm de aluminio, cada una por triplicado y un blanco. En matraces aforados de 10 ml se pusieron 0, 1, 2, 3 y 4 ppm de aluminio y en todos ellos 2000 ppm de potasio y se aforaron con agua destilada desionizada. El blanco se leyó 24 veces y las tres curvas se leyeron tres veces cada una, ajustando previamente el equipo a cero con el blanco. Con los resultados obtenidos se hicieron los cálculos correspondientes.

Para ver si no había efecto de matriz se hizo lo siguiente: En matraces aforados de 5 ml se pusieron en cada uno 2000 ppm de K^+ y 0.5 ml de líquido cefalorraquídeo y en uno 1 ppm, en otro 2 ppm y en el tercero 3 ppm de Al^{3+} y todos se aforaron con agua destilada desionizada. En otros matraces aforados de 5 ml se pusieron 1, 2 y 3 ppm de Al^{3+} y en todos 2000 ppm de K^+ y se aforaron con agua destilada desionizada. Las 6 disoluciones se prepararon por triplicado y se leyeron tres veces con expansión de escala de 10. Los resultados se encuentran en la gráfica #6.

Krishnan, Gillespie y Crapper trabajaron en un espectrofotómetro de absorción atómica con flama con líquido cefalorraquídeo y adiciones estándar (38). Ellos hicieron adiciones estándar a la muestra del orden de 0.5, 1.0 y 2.0 ppm de Al^{3+} y obtuvieron una

recuperación de 0.51, 1.02 y 2.0 ppm respectivamente. Con este antecedente, sabiendo que no había efecto de matriz y suponiendo que la concentración de aluminio en las muestras sería muy pequeña se trabajó con adiciones estándar para tener mayor certeza en los resultados.

Finalmente se descongelaron las muestras de líquido cefalorraquídeo y se prepararon 20 de ellas con adiciones de 1 y 2 ppm de Al^{3+} . En matraces aforados de 5 ml se pusieron en cada uno 0.5 ml de muestra y 2000 ppm de K^+ , en el primer matraz 0 ppm, en el segundo 1 ppm y en el tercero 2 ppm de Al^{3+} . Las disoluciones se prepararon por duplicado debido a que se tenía poca cantidad de muestra. y cada una se leyó tres veces con expansión de escala de 10. Se graficaron los valores de absorbancia vs concentración, se hicieron los cálculos de las concentraciones correspondientes y los resultados se encuentran en el cuadro #4.

SEGUNDA ETAPA

a) Equipo

Se utilizó un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer 2380 con horno de grafito HGA 400 sin automuestreador y un registrador Perkin Elmer R-100 para la determinación de aluminio en líquido cefalorraquídeo. Las condiciones del equipo en las cuales se hicieron las determinaciones fueron las siguientes:

Espectrofotómetro de absorción atómica:

- longitud de onda: 309.3 nm
- ancho de banda: 0.7 (bajo)
- lámpara: lámpara de aluminio de cátodo hueco
- corrector de señal de fondo: lámpara de deuterio
- modo: AA-BG
- tiempo de integración: 4 seg
- modo de integración: altura de pico

Horno de grafito:

- tubo de grafito pirorecubierto con plataforma de L'vov
- gas: argón con un flujo de 50 ml/min, excepto en el atomizado
- programa:
 - secado: 250°C, 1 seg de rampa, 45 seg
 - calcinado: 1500°C, 1 seg de rampa, 45 seg
 - atomizado: 2500°C, 0 seg de rampa, 4 seg, sin flujo de argón
 - limpieza: 2700°C, 1 seg de rampa, 3 seg
 - enfriamiento: 20°C, 10 seg de rampa, 5 seg
- volumen de muestra inyectado: 25 µl

Registrador:

- 60 mm/min
- 20 mV

b) Soluciones y reactivos

- Solución titrisol de Al^{3+} de 1000ppm
 - Solución de Al^{3+} de 10 ppm
 - Solución de Al^{3+} de 0.2 ppm
 - Modificador de matriz: 1ml de Tritón X-100 con 0.7 g de $Mg(NO_3)_2$ disueltos en agua destilada desionizada y aforado a 1000 ml.
 - Agua destilada desionizada
 - Solución de ácido nítrico al 10% para la limpieza del material
- Todos los reactivos fueron calidad Reactivo Analítico.

c)Material

- matraces volumétricos de 10, 500 y 1000 ml
- microtubos de polietileno de 1.5 ml
- micropipeta Eppendorf de 25 μ l
- micropipeta Gilson de 0 a 1000 μ l
- puntas para micropipetas
- frascos de polietileno

La limpieza del material se realizó como se indica en la primera etapa.

d)Muestras

Se recolectaron muestras de liquido cefalorraquídeo en frascos de polietileno, previamente limpiados como se indicó en la primera parte y se congelaron a -10°C .

e)Técnica

La tecnología moderna de la espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito data de 1980 en adelante y se ha convertido en una de las técnicas más ampliamente usadas para determinar trazas de metales en diversos materiales.

En 1956 el método de absorción atómica de Walsh, utilizaba la flama para proveer un estado estable de los átomos en fase de vapor. La absorbancia podía ser medida de manera precisa con la tecnología existente en ese tiempo. Pocos años después L'vov propuso el concepto analítico del horno de grafito. El método de L'vov, según él mismo, iba a permitir realizar análisis por absorción atómica muy sensibles y libres de interferencias. Su idea consistía en usar una pequeña cantidad de muestra y atomizarla completamente en un horno montado en el paso del haz de luz de un espectrofotómetro. La señal integrada de absorción atómica iba a ser proporcional a la cantidad de metal en la muestra. El primer trabajo apareció en 1959 y la técnica se volvió comercial hasta 1969, cuando Massmann adaptó el horno a los equipos de absorción atómica comerciales. Sin embargo esta técnica presentaba muchos problemas y los resultados obtenidos eran poco satisfactorios. En 1978, L'vov trabajó con el plomo y demostró porqué en los equipos comerciales existentes se obtenían escasos resultados analíticos. El recomendó, que los equipos analíticos deberían ser cuidadosamente diseñados para cubrir los requerimientos para el horno de grafito de temperatura estable con plataforma de L'vov, STPF (Stabilized Temperature Platform Furnace). STPF es el nombre que se le da al horno de grafito de un espectrofotómetro de absorción atómica, cuando reúne lo más posible los requerimientos teóricos establecidos por L'vov. Conforme ha pasado el tiempo se ha desarrollado la tecnología necesaria para construir los equipos que reúnen las condiciones para realizar un análisis libre de interferencias.

Ya que esta técnica se basa en una serie de características instrumentales que dependen una de otra, es importante reunir los siguientes requerimientos:

a) Calentamiento rápido del horno de grafito a temperaturas altas.- Se utiliza el calentamiento rápido del horno de grafito, porque se necesitan alcanzar las condiciones de equilibrio antes de que el analito sea atomizado. El calentamiento rápido se realiza en un promedio de 2000°C/seg, lo que garantiza que el tubo se calienta a la temperatura seleccionada en el menor tiempo posible.

b) Un procesador electrónico rápido.- Un equipo con horno de grafito requiere de un procesador electrónico rápido, porque todo ocurre en tiempo mínimo y se tiene que seguir con precisión la señal del analito. Además debe reunir los suficientes datos para obtener detalladamente el perfil del pico de absorbancia.

c) Integración de la absorbancia.- En un sistema que está en equilibrio térmico, la integración de la absorbancia puede eliminar las variaciones en la cuantificación debida a las variaciones en el intervalo de atomización debidas a las diferentes propiedades de los distintos compuestos del mismo elemento.

d) Uso de tubo pirorecubierto con plataforma de L'vov.- L'vov propuso que la atomización de la muestra no se hiciera en la pared del tubo, sino en una pequeña plataforma insertada dentro de un tubo de grafito pirorecubierto. Dicha plataforma está hecha de grafito pirolítico sólido. El calentamiento ocurre predominantemente por la radiación de las paredes calientes del tubo. Esto detiene la evaporación de la muestra hasta que las paredes del tubo y el gas dentro de éste, alcanzan el equilibrio térmico, como se ve en la figura #6.

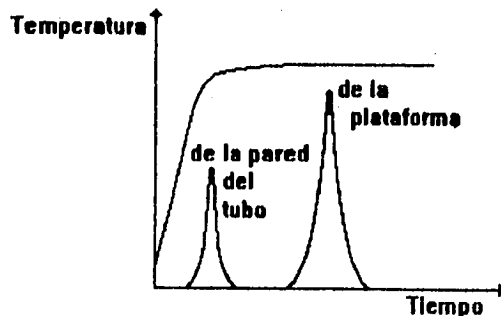


Figura #6
Picos de atomización de la pared del tubo y
de la plataforma de L'vov

e) Que no haya flujo de gas durante el proceso de atomización.- En el concepto STPF la interrupción del flujo de gas a través del tubo es muy importante para tener una temperatura estable durante la atomización. Una corriente de gas a través del tubo puede disminuir la temperatura del gas, al desplazar el gas caliente por gas frío, lo cual provocaría una disminución en la sensibilidad.

f) Uso del modificador de matriz.- Se agregan modificadores de matriz para estabilizar al analito a temperaturas más altas. Esto conduce a varias ventajas importantes. Se puede calcinar la muestra a temperaturas más altas y reducir la magnitud de la señal de fondo. Pero

lo más importante es que se puede estabilizar al analito en la plataforma de L'vov mientras se alcanza el equilibrio de las condiciones STPF. Además los modificadores de matriz pueden reaccionar con ésta para convertirla en una forma química más volátil, y de esta manera, eliminarla más fácilmente. En algunas ocasiones los modificadores de matriz contribuyen a tener un blanco muy alto, pero en la mayoría de los casos funciona bien.

g) Uso de corrector de señal de fondo.- El corrector de señal de fondo resta las señales de absorción no atómicas de la señal de absorbancia total, para dar una señal correcta. Ver figura #7.

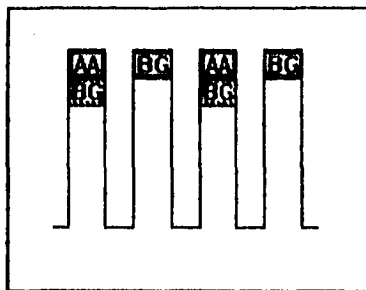


Figura #7
Corrector de señal de fondo

El corrector de señal de fondo es una de las partes importantes de las condiciones STPF y se utiliza de rutina. Existen dos tipos de ellos, el corrector de señal de fondo de emisión continua y el de efecto Zeeman.

Es imposible probar que no existen problemas si se reúnen todas las condiciones propuestas por L'vov. Sin embargo, el uso del horno de grafito se ha ido incrementando notoriamente en el análisis de trazas de elementos, ya que sus límites de detección son muy pequeños. Muchos analistas ponen mucha atención en que las condiciones de higiene de los laboratorios sean las adecuadas para poder determinar concentraciones tan pequeñas con el horno de grafito. Teniendo el mismo cuidado y facilidades, los resultados obtenidos en la determinación de trazas de metales en muestras bioquímicas con el horno de grafito, son comparables en exactitud, con los obtenidos con IDMS (Isotope Dilution Mass Spectrometry) espectrometría de masas con dilución de isótopos y con NAA (Neutron Activation Analysis) análisis por activación neutrónica (46,47,48).

f) Método

El método que se utilizó se seleccionó con base en lo siguiente:

1) En el caso en el que se trabaja con curva de calibración para determinar el aluminio en líquido cefalorraquídeo, ésta se prepara utilizando muestras de líquido cefalorraquídeo como disolvente, en las cuales se ha determinado previamente que la concentración de este metal es menor a 2 ppb (10,18), de tal manera que se tenga la misma matriz. Para este trabajo no era factible obtener una cantidad suficiente de líquido cefalorraquídeo y que además la concentración de dicho líquido fuera menor a 2 ppb de aluminio, para estar preparando curvas de calibración para leer las muestras.

2) Por otra parte se trabajó con una curva estándar y una muestra con adiciones para ver si había efecto de matriz y si lo hubo.

Por lo anteriormente expuesto se decidió utilizar el método de las adiciones estándar. Este método ya se explicó anteriormente.

g) Procedimiento

Primero se desarrolló la metodología para determinar aluminio en líquido cefalorraquídeo con tubo pirorrecubierto, ya que no se contaba con el tubo pirorrecubierto con plataforma de L'vov.

Se tomó como base el siguiente programa (49,50):

Secado: 120°C, 10 seg de rampa, 10 seg

Calcinado (1): 700°C, 10 seg de rampa, 10 seg

Calcinado (2): 1500°C, 15 seg de rampa, 10 seg

Atomizado: 2700°C, 0 seg de rampa, 5 seg

-Modo de integración: altura de pico

-Adición de modificador de matriz: 0.7 g Mg(NO₃)₂ + 1 ml de Tritón X-100/litro

-Gas: argón

-Corrector de señal de fondo: lámpara de deuterio

-Lámpara: lámpara de aluminio de cátodo hueco

-Longitud de onda: 309.3 nm

-Volumen inyectado: 25 µl

Este programa fue modificado para obtener las condiciones óptimas de trabajo del equipo en el laboratorio.

Para obtener la temperatura de atomización, se preparó por triplicado un blanco, una solución de aluminio de 10 ppb y una muestra. Se leyeron tres veces estas soluciones cambiando en el programa la temperatura de atomización de 2600°C a 2800°C. La respuesta óptima se dió a 2700°C.

Para encontrar el volumen óptimo de la solución modificadora de matriz se preparó 4 veces por triplicado, un blanco, una disolución de 10 ppb de aluminio y una muestra. A estas

disoluciones se les agregaron 3, 4, 5 o 6 ml de la solución modificadora de matriz y se aforaron a 10 ml con agua destilada desionizada. La mejor respuesta se obtuvo con las disoluciones que contenían 3 ml de la solución modificadora de matriz.

El siguiente parámetro que se determinó fue el flujo óptimo de gas. Para ello se prepararon disoluciones de 50 y 60 ppb de aluminio y se leyeron tres veces cada una variando el flujo de argón a 50, 100, 150, 200, 250 y 300 ml/min. Los resultados se encuentran en la gráfica #7. Se eligió el flujo de 50 ml/min.

El estudio de linealidad se llevó a cabo con disoluciones triplicadas de 10, 50, 150, 200, 250, y 300 ppb de aluminio con modificador de matriz. Los resultados se encuentran en la gráfica #8. Con base en los resultados obtenidos se decidió determinar la linealidad con más puntos a concentraciones bajas. Para ello se prepararon por triplicado disoluciones de 5, 10, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 ppb de aluminio con modificador de matriz. Los resultados se encuentran en la gráfica #9. Como se puede observar en los resultados el intervalo lineal es muy pequeño.

Tomando en cuenta los resultados de linealidad, se utilizó el método de las adiciones estándar. Se hicieron dos pruebas, adicionando concentraciones "altas" de aluminio (25 y 50 ppb) y concentraciones "bajas" de aluminio (2.5, 5 y 7.5 ppb). Se prepararon por triplicado las siguientes soluciones de aluminio con modificador de matriz: 25 ppb, 50 ppb, muestra + 25 ppb y muestra + 50 ppb para la primera parte y 2.5 ppb, 5 ppb, 7.5 ppb muestra + 2.5 ppb, muestra + 5 ppb y muestra + 7.5 ppb para la segunda parte. Los resultados se encuentran en la gráfica #10 y #11 respectivamente. Observando ambas gráficas se deduce que hay interferencia de matriz.

Para determinar el intervalo de confianza se prepararon 32 disoluciones de 10 ppb de aluminio con modificador de matriz, todas en iguales condiciones. Se obtuvieron los resultados correspondientes y se graficaron. La gráfica es la #12. Con estos resultados se calculó el intervalo de confianza.

A pesar de que se mejoraron las condiciones de trabajo, los resultados analíticos fueron muy pobres, por lo que no se leyeron muestras de líquido cefalorraquídeo en estas condiciones. Se procedió a conseguir el tubo pirrecubierto con plataforma de L'vov.

Como ya se mencionó anteriormente la plataforma de L'vov ofrece las siguientes ventajas:

- reduce las interferencias de señal de fondo
- se tienen condiciones más estables de los gases
- se mejoran las señales de absorbancia
- la atomización ocurre en un ambiente de temperatura más estable
- el intervalo del tiempo de atomización es más largo.

Teniendo esto presente y habiendo conseguido el tubo pirrecubierto con plataforma de L'vov, se buscaron nuevamente las condiciones de trabajo.

El programa base del que se partió fue el siguiente (49,50):

- Secado: 250°C, 1 seg de rampa, 45 seg
- Calcinado: 1500°C, 1 seg de rampa, 45 seg
- Atomizado: 2500°C, 0 seg de rampa, 6 seg
- Limpieza: 2700°C, 1 seg de rampa, 3 seg
- Enfriamiento: 20°C, 10 seg de rampa, 5 seg
- Modo de integración: área bajo la curva
- Adición de modificador de matriz: 0.7 g de $Mg(NO_3)_2$ + 1 ml de Tritón X-100/litro
- Gas: argón
- Corrector de señal de fondo: lámpara de deuterio
- Lámpara: lámpara de aluminio de cátodo hueco
- Longitud de onda: 309,3 nm
- Volúmen inyectado: 25 μ l

Lo primero que se hizo, fue variar la temperatura de atomización. Se preparó por triplicado un blanco, disoluciones de 20 y de 40 ppb de aluminio y una muestra. Se leyeron tres veces estas soluciones con un cambio en la temperatura de atomización de 2400° a 2600°C. La respuesta óptima se obtuvo con la temperatura de 2500°C. Los resultados se encuentran en la gráfica #13.

El siguiente parámetro que se determinó fue el volumen de la solución modificadora de matriz. Para ello se prepararon disoluciones de 20 ppb de aluminio a las cuales se les añadió 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 y 400 μ l de la solución modificadora de matriz y se completó con agua destilada desionizada a un volumen de 500 μ l. Los resultados se encuentran en la gráfica #14. El volumen óptimo de la solución modificadora de matriz fue de 50 μ l.

Después se prepararon, por triplicado, disoluciones de aluminio de 10 y 20 ppb con modificador de matriz. Se leyeron tres veces cada una, variando el flujo de argón a 50, 100, 150, 200, 250 y 300 ml/min. Los resultados se encuentran en la gráfica #15.

Se prepararon por triplicado disoluciones de aluminio de 10 y 20 ppb con modificador de matriz. La lectura de esas soluciones se hizo con un cambio en el tiempo de integración durante la atomización a 4, 5 y 6 segundos. La mejor respuesta se obtuvo a los 4 segundos.

Para saber si se iba a trabajar con altura de pico ó con área bajo la curva, se prepararon disoluciones de aluminio de 20, 40 y 60 ppb con modificador de matriz. Las disoluciones fueron leídas en los dos modos de integración antes mencionados. Los resultados se encuentran en la gráfica #16. Se decidió trabajar con altura de pico.

Finalmente el programa de trabajo quedó de la siguiente manera:

- Secado: 250°C, 1 seg de rampa, 45 seg
- Calcinado: 1500°C, 1 seg de rampa, 45 seg
- Atomizado: 2500°C, 0 seg de rampa, 4 seg, sin flujo de gas
- Limpieza: 2700°C, 1 seg de rampa, 3 seg

Enfriamiento: 20°C, 10 seg de rampa, 5 seg
-Modo de integración: altura de pico
-Gas: argón, 50 ml/min
-Adición de la solución modificadora de matriz: 50 μ l/500 μ l
-Corrector de señal de fondo: lámpara de deuterio
-Lámpara: lámpara de aluminio de cátodo hueco
-Longitud de onda: 309.3 nm
-Volumen inyectado: 25 μ l
-Registrador: 20 mV y 60 mm/min
Con este programa y estas condiciones se desarrolló el resto del trabajo.

Para determinar el intervalo lineal, se prepararon disoluciones de aluminio de 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 y 600 ppb con modificador de matriz, todas ellas por triplicado. Los resultados se encuentran en la gráfica #17. Se quiso conocer la linealidad con más puntos en un intervalo de 0 a 100 ppb. Para ello se prepararon disoluciones de aluminio de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 ppb con modificador de matriz también por triplicado. Los resultados se encuentran en la gráfica #18.

Para establecer si había interferencia de matriz se preparó una curva estándar y una curva con adición de estándar. Para la primera se prepararon por triplicado y con modificador de matriz, un blanco, soluciones de 10 y 20 ppb de aluminio y una muestra. Para la segunda, se prepararon por triplicado y con modificador de matriz, una muestra y la misma muestra con 10 y 20 ppb de aluminio. Se leyeron todas las disoluciones tres veces y los resultados se encuentran en la gráfica #19. Se observa en dicha gráfica que las pendientes de las curvas son diferentes, por lo que se concluyó que si hay interferencia de matriz.

Para determinar el intervalo de confianza, se prepararon un blanco y 30 disoluciones de 10 ppb con modificador de matriz, todas en iguales condiciones y se leyeron tres veces. Con los resultados se calculó el intervalo de confianza y se hizo la gráfica #20.

Finalmente se prepararon 5 curvas de calibración de 5, 10, 15 y 20 ppb de aluminio, un blanco y todas las disoluciones con modificador de matriz. Primero se leyó el blanco 22 veces y luego se leyó tres veces cada curva ajustando a cero con el blanco. Con los resultados obtenidos se calculó el límite de detección y el límite de cuantificación.

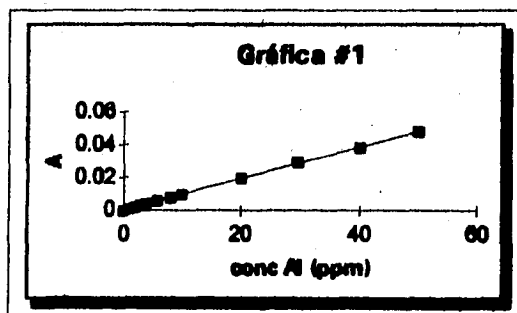
Ya que el intervalo lineal es pequeño, hay interferencia de matriz y no se tiene una cantidad suficiente de líquido cefalorraquídeo de una concentración menor a 2 ppb de aluminio, para preparar con él las curvas estándar necesarias para poder leer en ellas todas las muestras, se decidió utilizar el método de las adiciones estándar para determinar la concentración de aluminio en líquido cefalorraquídeo. Las adiciones que se hicieron fueron de 20 y 40 ppb de aluminio, con modificador de matriz, para estar en el intervalo lineal. Cada muestra de líquido cefalorraquídeo se leyó sola para ver si era necesario hacer una dilución de la misma. En algunos casos sí fue necesario hacer la dilución. Todas las muestras se leyeron con el programa y las condiciones establecidas prácticamente; los resultados se encuentran en

el cuadro #5. Los resultados que se encuentran en el cuadro #5 se agruparon en 7 intervalos de concentración de aluminio, los cuales se encuentran en la gráfica #21.

V. RESULTADOS

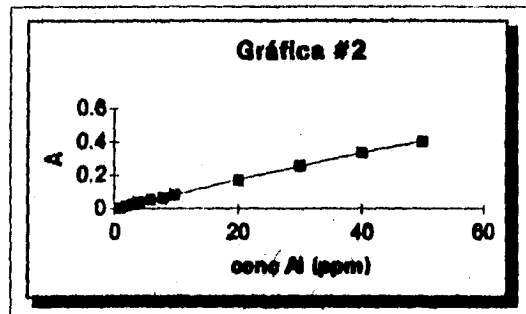
A continuación se presentan los resultados obtenidos por espectrofotometría de absorción atómica con flama.

En la gráfica #1 se encuentran los resultados del estudio de linealidad. Como se puede observar en esta gráfica, la linealidad es bastante buena en este intervalo de concentración. El coeficiente de correlación de la recta obtenida $y = 0.001 x + 0.002$ es de 0,9999.



LINEALIDAD

En la gráfica #2 se encuentran los resultados de las soluciones con las cuales se obtuvo la gráfica anterior, solamente que fueron leídas con expansión de escala de 10. En esta gráfica se observa que a bajas concentraciones, el ruido del equipo es más notorio, lo cual es lógico debido a la expansión de escala. Sin embargo la linealidad sigue siendo buena, ya que se obtiene un coeficiente de correlación para dicha recta, $y = 0.0001 x + 0.003$, de 0,999.



LINEALIDAD CON EXPANSION DE ESCALA DE 10

En las gráficas #3, #4 y #5 se presentan los resultados de las 32 soluciones de 1 ppm, de 2 ppm y de 3 ppm leídas todas sin y con expansión de escala de 10. Se calculó el intervalo de confianza para cada concentración.

Se considera intervalo de confianza al intervalo dentro del cual se puede suponer de manera razonable que se encuentra el valor verdadero con una cierta probabilidad. El tamaño del intervalo de confianza dependerá de la certeza que se quiera tener de que se incluya el valor verdadero y se calcula (43):

$$\mu = \bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{n}}$$

El intervalo de confianza para 1 ppm de aluminio al 95% es:

Sin expansión de escala

$$n = 96$$

$$\bar{x} = 0.0029$$

$$s = 0.0004$$

$$\mu = 0.0029 \pm 0.0001$$

El intervalo de confianza al 95% para los valores de absorbancia es $0.0028 < \mu < 0.0030$, lo que corresponde a una concentración de 1 ± 0.03 ppm.

Con expansión de escala de 10

$$n = 96$$

$$\bar{x} = 0.025$$

$$s = 0.004$$

$$\mu = 0.025 \pm 0.001$$

El intervalo de confianza al 95% para los valores de absorbancia es $0.024 < \mu < 0.026$, lo que corresponde a una concentración de 1 ± 0.04 ppm.

El intervalo de confianza para 2 ppm de aluminio al 95% es:

Sin expansión de escala

$$n = 96$$

$$\bar{x} = 0.0033$$

$$s = 0.0006$$

$$\mu = 0.0033 \pm 0.0001$$

El intervalo de confianza al 95% para los valores de absorbancia es $0.0032 < \mu < 0.0034$, lo que corresponde a una concentración de 2 ± 0.06 ppm.

Con expansión de escala de 10

$$n = 96$$

$$\bar{x} = 0.038$$

$$s = 0.003$$

$$\mu = 0.038 \pm 0.001$$

El intervalo de confianza al 95% para los valores de absorbancia es $0.037 < \mu < 0.039$, lo que corresponde a una concentración de 2 ± 0.05 ppm.

El intervalo de confianza para 3 ppm de aluminio al 95% es:

Sin expansión de escala

$$n = 96$$

$$\bar{x} = 0.0090$$

$$s = 0.0008$$

$$\mu = 0.0090 \pm 0.0002$$

El intervalo de confianza al 95% para los valores de absorbancia es $0.0088 < \mu < 0.0092$, lo que corresponde a una concentración de 3 ± 0.07 ppm.

Con expansión de escala de 10

$$n = 96$$

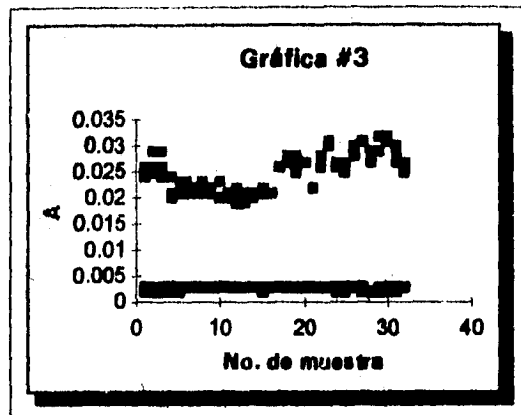
$$\bar{x} = 0.066$$

$$s = 0.004$$

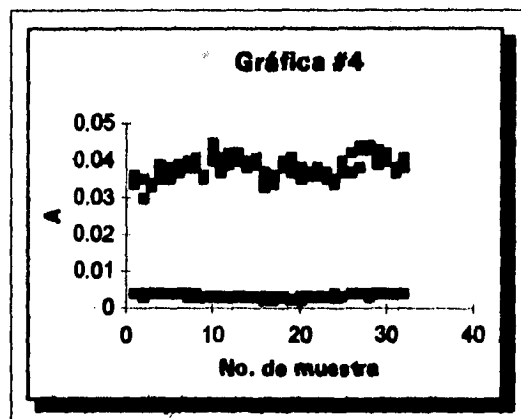
$$\mu = 0.066 \pm 0.001$$

El intervalo de confianza al 95% para los valores de absorbancia es $0.065 < \mu < 0.067$, lo que corresponde a una concentración de 3 ± 0.04 ppm.

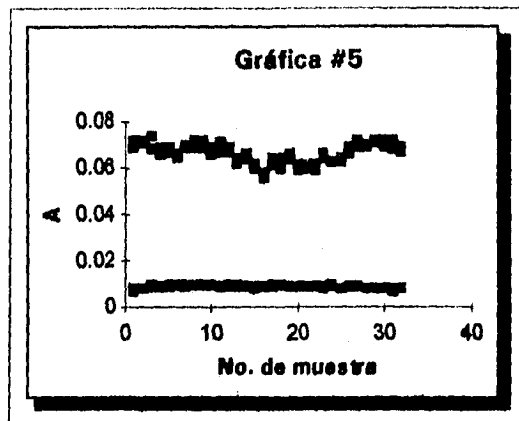
Como se puede observar en los resultados anteriores los intervalos de confianza son muy pequeños. Sin embargo, la mayoría de los resultados obtenidos para 1, 2 y 3 ppm sin expansión de escala caen en el intervalo de confianza, lo que no ocurre con los resultados obtenidos con expansión de escala de 10. Esto se puede observar en las gráficas #3, #4 y #5.



**CONFIABILIDAD SIN Y CON EXPANSION
DE ESCALA DE 10
conc = 1ppm**



**CONFIABILIDAD SIN Y CON EXPANSION
DE ESCALA DE 10
conc = 2ppm**



CONFIABILIDAD SIN Y CON EXPANSION
DE ESCALA DE 10
conc = 3 ppm

Para determinar el límite de detección y el límite de cuantificación se prepararon 3 curvas de calibración y un blanco. Con los resultados obtenidos se calculó lo siguiente:

a) Límite de detección.

Por límite de detección (L.D.) se considera la concentración mínima que se puede tomar como válida. Se calcula de la siguiente manera (43,44,45):

$$L.D. = \frac{3s_b - b}{m}$$

donde

L.D. = límite de detección

s_b = desviación estándar del blanco

b = ordenada al origen de la curva de calibración

m = pendiente de la curva de calibración

Si b = 0

$$L.D. = \frac{3s_b}{m}$$

Las ecuaciones de las curvas de calibración fueron:

Curva (1) $y = 0.0010 x$

Curva (2) $y = 0.0014 x$

Curva (3) $y = 0.0017 x + 0.0004$

Promedio de las tres curvas

$$y = 0.0014x + 0.0001$$

Para el blanco

$$n = 24$$

$$\bar{x}_B = 0.00008$$

$$s_B = 0.00027$$

De la curva promedio

$$b = 0.0001$$

$$m = 0.0014$$

Se substituyen los valores correspondientes

$$L.D. = 0.52 \text{ ppm}$$

El límite de detección es 0.52 ppm de aluminio.

b) Límite de cuantificación.

El límite de cuantificación (L.Q.) es la concentración mínima que se puede reportar con la confianza estadística de que el resultado es verdadero (43,44,45). Se calcula:

$$L.Q. = \frac{10s_B - b}{m}$$

Substituyendo los valores anteriores se obtiene

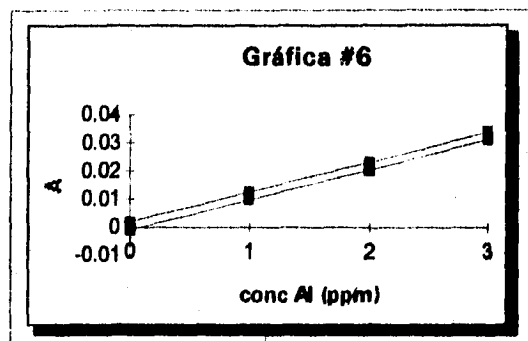
$$L.Q. = 1.86 \text{ ppm}$$

El límite de cuantificación es 1.86 ppm de aluminio.

En la gráfica #6 se encuentran los resultados obtenidos de una curva de calibración de 1, 2 y 3 ppm de aluminio y la curva de una muestra con adición de 1 y 2 ppm de aluminio. Como se puede observar ambas rectas son paralelas; la pendiente de la primera curva es 0.107 y de la segunda es 0.106. Estos valores indican que no hay interferencia de matriz.

(1) Curva estándar $y = 0.107x - 0.001$

(2) Muestra con adiciones $y = 0.106x + 0.002$



EFFECTO DE MATRIZ CON EXPANSION DE ESCALA DE 10

Finalmente se descongelaron las muestras de liquido cefalorraquideo y se trabajaron como se indic6 en el procedimiento. Las soluciones se leyeron con expansion de escala para obtener los valores de absorbancia. Con los resultados se hicieron los cálculos correspondientes y se obtuvo la concentración de aluminio en cada muestra, las cuales se muestran en el cuadro #4.

CUADRO #4
CONCENTRACION DE ALUMINIO EN
LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO

No. de Muestra	Concentración de Aluminio
1	0.5 ppm
2	0.2 ppm
3	N.D.
4	N.D.
5	0.4 ppm
6	0.6 ppm
7	N.D.
8	N.D.
9	N.D.
10	N.D.
11	N.D.
12	N.D.
13	N.D.
14	N.D.
15	0.6 ppm
16	2.7 ppm
17	3.4 ppm
18	N.D.
19	N.D.
20	1.2 ppm

SEGUNDA ETAPA

Los resultados que se presentan a continuación fueron obtenidos por espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito, tubo de grafito pirorrecubierto y sin automuestreador.

El promedio de las lecturas de altura de pico para una solución de 10 ppb de aluminio y una muestra leídas a diferentes temperaturas de atomización fueron las siguientes:

TEMPERATURA	SOLUCION	ALTURA DE PICO mm
2600°C	Muestra	23.3
2600°C	10 ppb	9.2
2700°C	Muestra	25.3
2700°C	10 ppb	12.2
2800°C	Muestra	6.0
2800°C	10 ppb	4.8

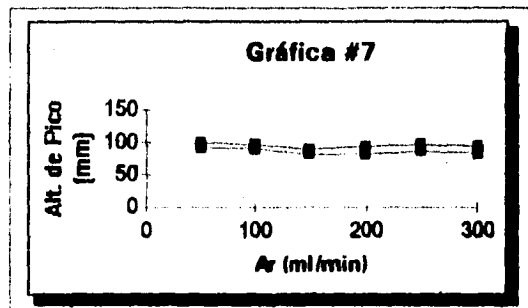
Analizando los resultados anteriores se establece que la temperatura de atomización óptima es 2700°C.

Los resultados de altura de pico para una solución de 10 ppb de aluminio y una muestra con 3, 4, 5 y 6 ml de la solución modificador de matriz, aforadas todas a 10 ml con agua destilada desionizada, fueron las siguientes:

VOL. DE SOLN. MODIFICADORA DE MATRIZ EN 10 ml	SOLUCION	PROMEDIO DE LA ALTURA DE PICO (mm)
3 ml	Muestra	43.5
3 ml	10 ppb	16.7
4 ml	Muestra	25.3
4 ml	10 ppb	12.2
5 ml	Muestra	17.3
5 ml	10 ppb	11.2
6 ml	Muestra	19.2
6 ml	10 ppb	11.9

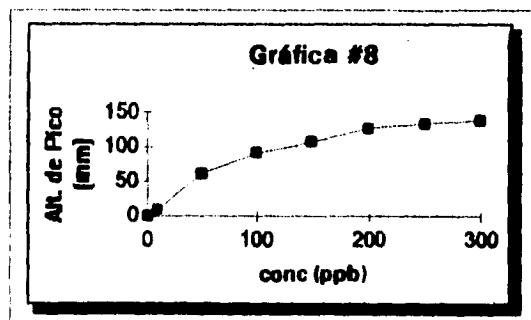
En los resultados anteriores se puede observar que la mejor respuesta se obtiene para las soluciones que tienen 3 ml de la solución modificadora de matriz.

En la gráfica #7 se encuentra el promedio de los resultados de altura de pico obtenidos de las soluciones de 50 y 60 ppb de aluminio leídas variando el flujo de argón. Como podrá observarse las lecturas más altas para ambas soluciones se obtuvieron con un flujo de 50 ml/min de argón.



FLUJO DE ARGON
(Tubo Pirorrecubierto)

En la gráfica #8 se presenta el promedio de los resultados de altura de pico para las disoluciones de 10, 50, 100, 150, 200, 250 y 300 ppb de aluminio para ver la linealidad. Como se puede observar el rango lineal es muy pequeño, hasta 50 ppb de aluminio.



LINEALIDAD DEL ALUMINIO
(Tubo Pirorrecubierto)
0 - 300 ppb

Tomando en cuenta los resultados anteriores, se hizo otra curva de linealidad con más puntos a concentraciones bajas. El promedio de los resultados de altura de pico para dicha curva se encuentran en la gráfica #9. Como se nota, el intervalo lineal es nuevamente de 5 a

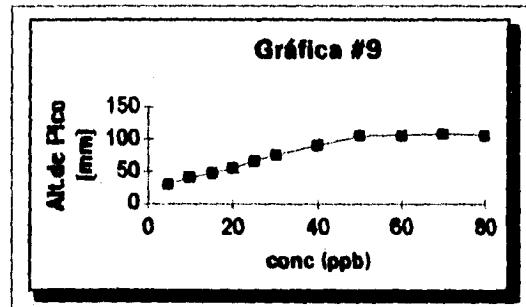
50 ppb de aluminio, lo que coincide con la gráfica anterior. Con los resultados de 5 a 50 ppb de aluminio para calcular la recta con regresión lineal se obtiene:

$$y = 1.67 x + 23.2$$

$$r = 0.998$$

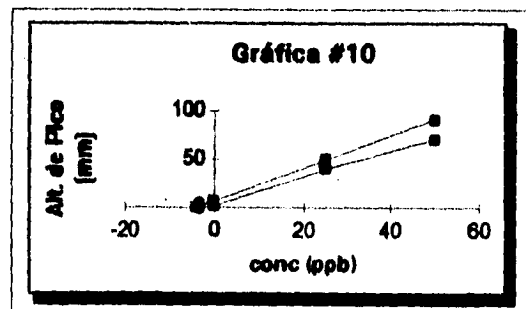
$$m = 1.67$$

Se puede decir que el intervalo lineal del aluminio utilizando el tubo pirorrecubierto es de 5 a 50 ppb de dicho elemento.



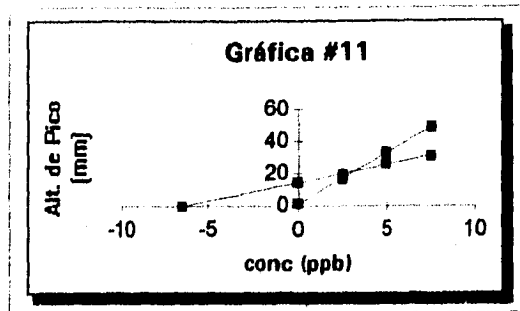
LINEALIDAD DEL ALUMINIO
(Tubo Pirorrecubierto)
0 - 80 ppb

Ya que el intervalo lineal del aluminio en estas condiciones es pequeño, se hicieron dos curvas estándar y dos curvas de muestra de líquido cefalorraquídeo con adición de estándar, a diferentes concentraciones. El promedio de los resultados de altura de pico se encuentran en las gráficas #10 y #11.



INTERFERENCIA DE MATRIZ
(Tubo Pirorrecubierto)

- (1) Muestra con adiciones $y = 1.7 x + 6.8$
- (2) Curva estándar $y = 1.4 x + 1.4$



INTERFERENCIA DE MATRIZ
(Tubo Pírorrecubierto)

- (1) Muestra con adiciones $y = 2.2x + 14.5$
(2) Curva estándar $y = 6.3x + 1.5$

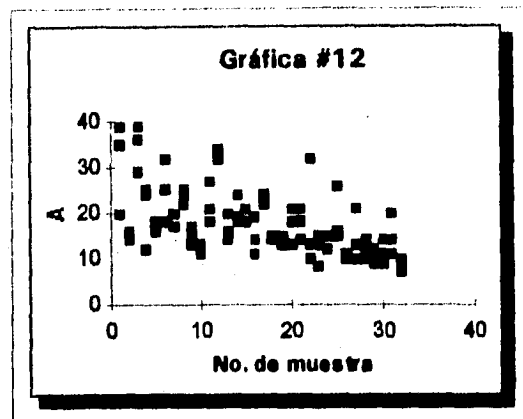
Como se puede observar en ambas gráficas hay interferencia de matriz, ya que las pendientes de las rectas son diferentes:

- Gráfica #10 (1) Muestra con adiciones de 25 y 50 ppb de aluminio $m = 1.7$ $r = 0.9999$
(2) Curva estándar de 25 y 50 ppb de aluminio $m = 1.4$ $r = 0.997$
Gráfica #11 (1) Muestra con adiciones de 2.5, 5 y 7.5 ppb de aluminio $m = 2.2$ $r = 0.999$
(2) Curva estándar de 2.5, 5 y 7.5 ppb de aluminio $m = 6.3$ $r = 0.990$

La diferencia en las pendientes es mayor en el caso de las adiciones de 2.5, 5 y 7.5 ppb de aluminio. Teniendo en cuenta que la concentración de aluminio es de 6.4 ppb en la muestra, las adiciones correctas son éstas. Esta diferencia nos indica que sí hay interferencia de matriz. En el caso de las adiciones de 25 y 50 ppb de aluminio, la diferencia en las pendientes es pequeña, debido a que las adiciones son muy grandes con respecto a la concentración del aluminio en la muestra de líquido cefalorraquídeo, que es de 4 ppb. La muestra utilizada en cada caso no es la misma. (Nota: las concentraciones de aluminio en las muestras son las obtenidas por extrapolación, aparte se hicieron los cálculos necesarios para conocer la concentración en la muestra sin dilución).

De las dos gráficas podemos concluir que es necesario trabajar con el método de adición de estándar.

Finalmente se prepararon 32 disoluciones de 10 ppb de aluminio y cada disolución se leyó tres veces. Los resultados de altura de pico se encuentran en la gráfica #12.



CONFIABILIDAD
(Tubo Pirorrecubierto)
 conc = 10 ppb

Utilizando estos resultados se hicieron los siguientes cálculos:

$$n = 96$$

$$\bar{x} = 18,54$$

$$s = 9,51$$

$$\mu = \bar{x} \pm \frac{fs}{\sqrt{n}}$$

Sustituyendo valores

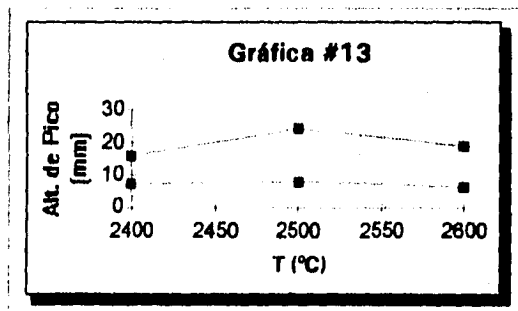
$$\mu = 18,54 \pm 1,90$$

El intervalo de confianza al 95% para los valores de altura de pico para 10 ppb es $16,64 < \mu < 20,44$, lo que corresponde a una concentración de $10 \pm 1,0$ ppb.

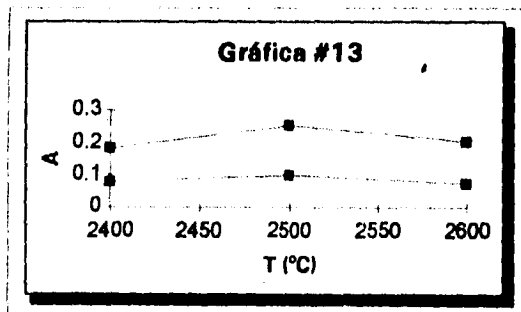
Observando la gráfica y con base en los resultados anteriores se puede notar que si se utiliza el tubo de grafito pirorrecubierto hay mucha variación en las lecturas a esta concentración, por lo que sería conveniente hacer las determinaciones de aluminio en líquido cefalorraquídeo en el tubo de grafito pirorrecubierto con plataforma de L'vov.

Los resultados que se presentan de aquí en adelante se obtuvieron por espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito y tubo pirorrecubierto con plataforma de L'vov sin automuestreador.

Utilizando el programa base, el primer parámetro que se optimizó fue la temperatura de atomización. El promedio de los resultados obtenidos para las disoluciones de 20 y 40 ppb de aluminio leídas a diferentes temperaturas, tanto en absorbancia como en milímetros, se encuentran en las gráficas #13.



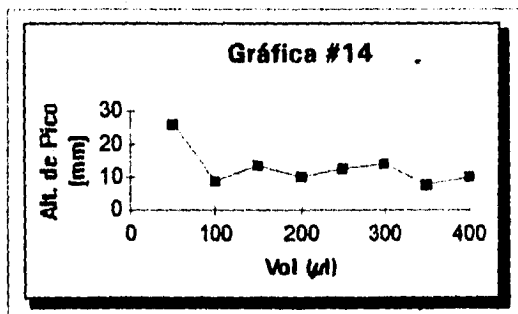
TEMPERATURA DE ATOMIZACION
(Tubo Pirorrecubierto con Plat. de L'vov)



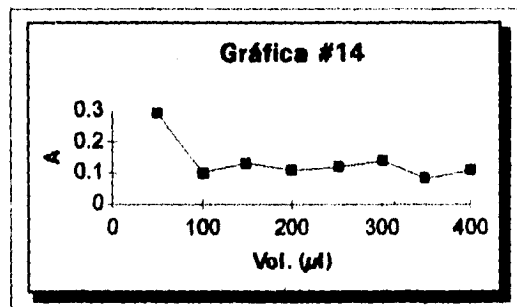
TEMPERATURA DE ATOMIZACION
(Tubo Pirorrecubierto con Plat. de L'vov)

Como se observa en estas gráficas, la temperatura de atomización óptima es 2500° C para ambas soluciones, tanto en los resultados de absorbancia como en los de altura de pico (mm).

El siguiente parámetro que se determinó fue el volumen de la solución modificadora de matriz. El promedio de los resultados obtenidos para una solución de 20 ppb de aluminio con diferentes volúmenes de la solución modificadora de matriz aforadas todas a 500 μ l se encuentran en las gráficas #14.



VOLUMEN DE LA SOLUCION MODIFICADORA DE MATRIZ (Tubo Pirorrecubierto con Plat. de L'vov)

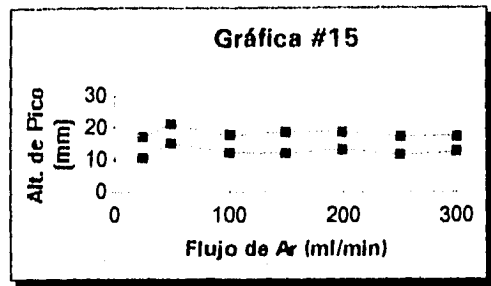


VOLUMEN DE LA SOLUCION MODIFICADORA DE MATRIZ (Tubo Pirorrecubierto con Plat. de L'vov)

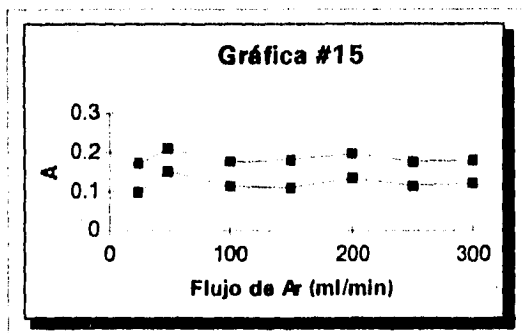
Como se observa en las gráficas, el valor más alto de absorbancia y de altura de pico se obtiene cuando se agregan 50 μ l de la solución de Tritón X-100 + $Mg(NO_3)_2$ a la solución de 20 ppb de aluminio aforada a 500 μ l. La relación queda:

$$\text{Vol. de la soln. modificadora de matriz} : \text{Vol. final} = 1 : 10$$

En las gráficas #15 se encuentran los promedios de los resultados obtenidos de las soluciones de 10 y 20 ppb de aluminio variando el flujo de argón.



FLUJO DE ARGÓN
(Tubo Pirorrecubierto con Plat. de L'vov)



FLUJO DE ARGÓN
(Tubo Pirorrecubierto con Plat. de L'vov)

Como se observa, la respuesta óptima se obtiene con un flujo de argón de 50 ml/min.

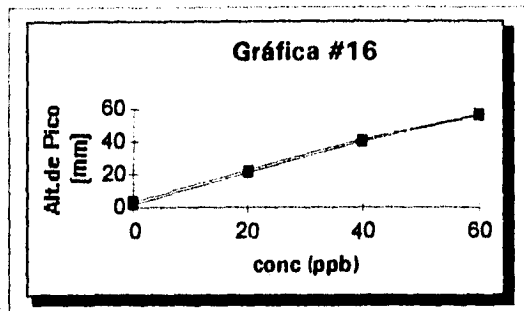
A continuación se presentan los promedios de los resultados de absorbancia y de altura de pico que se obtuvieron al leer las soluciones de 10 y 20 ppb de aluminio cambiando el tiempo de integración durante la atomización:

	10 ppb	10 ppb	20 ppb	20 ppb
Tiempo de integración	Absorbancia	Altura de pico (mm)	Absorbancia	Altura de pico (mm)
4 s	0.157	16	0.219	22
5 s	0.101	10.3	0.169	16.8
6s	0.125	12.2	0.181	17.8

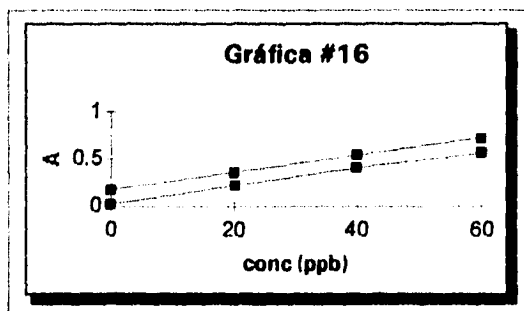
Como puede observarse la mejor respuesta se obtiene para un tiempo de integración de 4 s durante la atomización para ambas concentraciones.

El siguiente parámetro que se determinó fue el modo de integración, altura de pico ó área bajo la curva. El promedio de los resultados obtenidos de las soluciones de 20, 40, y 60

ppb de aluminio leídas en altura de pico y en área bajo la curva se encuentran en las gráficas #16.



MODO DE INTEGRACION:
ALURA DE PICO (PK HT); AREA BAJO LA CURVA (PK AREA)
(Tubo Pirorrecubierto con Plat. de L'vov)
(1) PK AREA $y = 0.95 x + 2.1$ $r = 0.988$
(2) PK HT $y = 0.95 x + 3.7$ $r = 0.982$

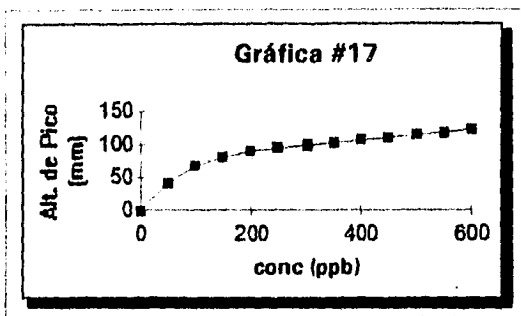


MODO DE INTREGRACION:
ALTURA DE PICO (PK HT); AREA BAJO LA CURVA (PK AREA)
(Tubo Pirorrecubierto con Plat. de L'vov)
(1) PK AREA $y = 0.009 x + 0.03$ $r = 0.985$
(2) PK HT $y = 0.009 x + 0.18$ $r = 0.996$

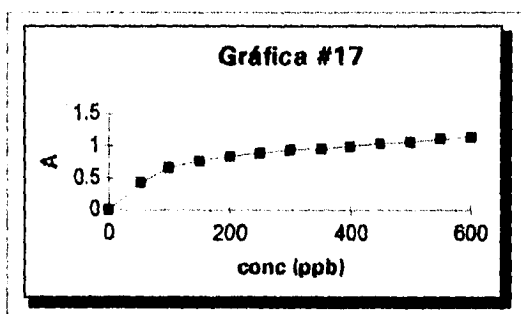
Como se puede observar los valores más altos, tanto en absorbancia como en altura de pico en mm, son los que se obtuvieron con el modo de integración "altura de pico", por lo cual se utilizó este modo de integración en el resto del trabajo.

Una vez establecidas las condiciones óptimas de trabajo en el equipo con el tubo pirorrecubierto con plataforma de L'vov y sin automuestreador se determinó el rango lineal del aluminio. Para ello se prepararon soluciones de aluminio de 50 a 600 ppb con modificador

de matriz. El promedio de los resultados obtenidos para estas soluciones se encuentra en las gráficas #17.



LINEALIDAD DEL ALUMINIO
(Tubo Pírorrecubierto con Plat. de L'vov)
0 - 600 ppb



LINEALIDAD DEL ALUMINIO
(Tubo Pírorrecubierto con Plat. de L'vov)
0 - 600 ppb

En estas gráficas se observa que en el intervalo de 200 a 600 ppb de aluminio hay linealidad.

En altura de pico (mm) de 200 a 600 ppb

$$y = 0.08x + 74.46$$

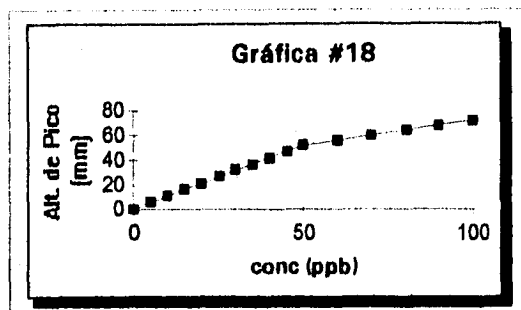
$$r = 0.998$$

En absorbancia de 200 a 600 ppb

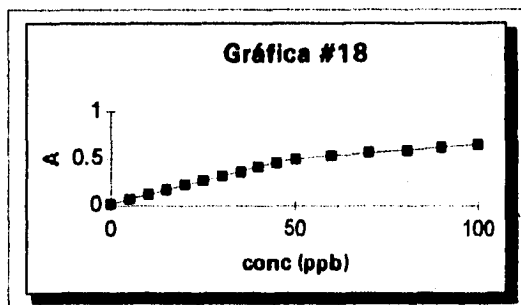
$$y = 0.007x + 0.71$$

$$r = 0.997$$

Para determinar el intervalo lineal a bajas concentraciones se prepararon soluciones de 5 a 100 ppb de aluminio con modificador de matriz. El promedio de las lecturas obtenidas para estas soluciones se encuentra en las gráficas #18.



LINEALIDAD DEL ALUMINIO
(Tubo Pirorecubierto con Plat. de L'vov)
0 - 100 ppb



LINEALIDAD DEL ALUMINIO
(Tubo Pirorecubierto con Plat. de L'vov)
0 - 100 ppb

Como se puede observar hay dos intervalos lineales, uno de 0 a 50 ppb de aluminio y el otro de 50 a 100 ppb. En ambos intervalos la linealidad es buena, aún a bajas concentraciones.

En altura de pico

De 0 a 50 ppb $y = 1.03 x + 1.05$ $r = 0.998$

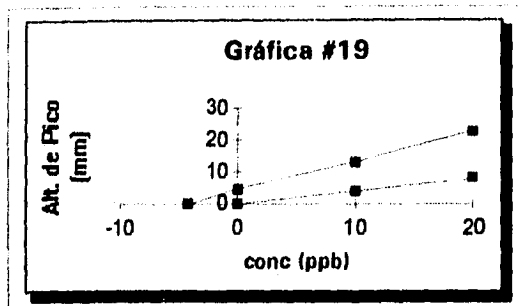
De 50 a 100 ppb $y = 0.41 x + 31.1$ $r = 0.999$

En absorbancia

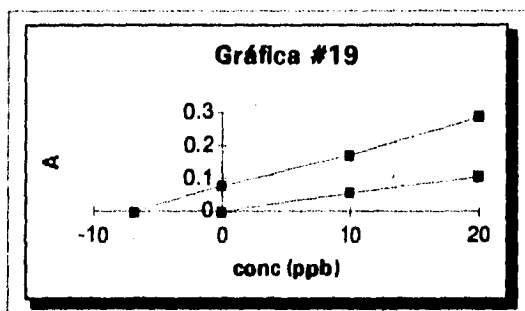
De 0 a 50 ppb $y = 0.010 x + 0.02$ $r = 0.998$

De 50 a 100 ppb $y = 0.003 x + 0.35$ $r = 0.997$

El siguiente paso fue determinar si había interferencia de matriz o no. Se preparó una curva estándar y una muestra con adición de estándar. El promedio de los resultados obtenidos en ambos casos se observa en las gráficas #19.



INTERFERENCIA DE MATRIZ
 (Tubo Pirorrecubierto con Plat. de L'vov)
 (1) Curva estándar
 (2) Muestra con adición de estándar



INTERFERENCIA DE MATRIZ
 (Tubo Pirorrecubierto con Plat. de L'vov)
 (1) Curva estándar
 (2) Muestra con adición de estándar

Las ecuaciones de las rectas que se encuentran en estas gráficas son las siguientes:

En altura de pico (mm)

(1) Curva estándar

$$y = 0.39x + 0.017$$

$$r = 0.9999$$

Para la muestra A = 4.7 corresponde

$$x = 11.86 \text{ ppb}$$

(2) Muestra con adiciones

$$y = 0.96x + 3.98$$

$$r = 0.992$$

Concentración muestra $x = 4.0 \text{ ppb}$

En absorbancia

(1) Curva estándar

$$y = 0.005x + 0.0008$$

$$r = 0.999$$

Para la muestra A = 0.078 corresponde

$$x = 14.4 \text{ ppb}$$

(2) Muestra con adiciones

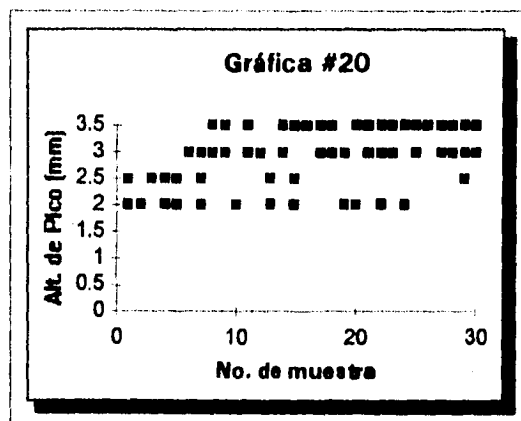
$$y = 0.011x + 0.071$$

$$r = 0.994$$

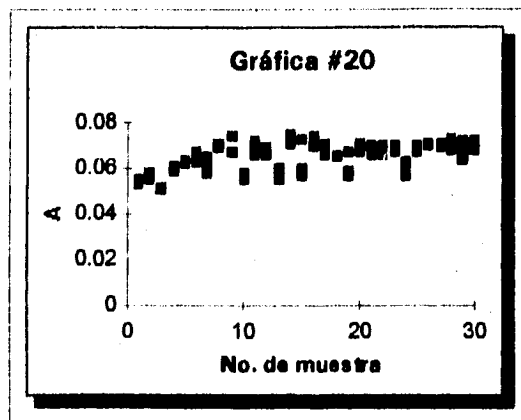
Concentración muestra $x = 6.5$ ppb

En los valores de altura de pico y en los valores de absorbancia, las pendientes son diferentes, lo cual indica que si hay interferencia de matriz. Esto también se aprecia al calcular la concentración de aluminio en la muestra. En el caso de extrapolar el valor de altura de pico de la muestra $A = 4.7$ en la curva estándar, se obtiene una concentración de aluminio de 11.86 ppb, valor que es mayor al obtenido con la curva de muestra con adición de estándar que es de 4.0 ppb. En el caso de extrapolar el valor de absorbancia de la muestra $A = 0.078$ en la curva estándar correspondiente se obtiene una concentración de aluminio de 14.4 ppb, valor que también es mayor al obtenido con la curva de muestra con adiciones que es de 6.5 ppb. (Nota: aparte se hicieron los cálculos correspondientes considerando la dilución, para conocer la concentración del aluminio en la muestra original). Analizando estos resultados, se decidió trabajar con el método de adición de estándar.

Posteriormente se prepararon 30 disoluciones de 10 ppb de aluminio con modificador de matriz. Cada disolución se leyó tres veces. Los resultados de absorbancia y de altura de pico se encuentran en las gráficas #20.



CONFIABILIDAD
(Tubo Pirorrecubierto con Plat. de L'vov)
conc = 10 ppb



CONFIABILIDAD
 (Tubo Pirorrecubierto con Plat. de L'vov)
 conc = 10 ppb

Utilizando los resultados de las gráficas se hicieron los siguientes cálculos:

Altura de pico
 concentración: 10 ppb de aluminio
 n = 90
 $\bar{x} = 2.950$
 s = 0.767

$$\mu = \bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{n}}$$

$$\mu = 2.95 \pm 0.16$$

El intervalo de confianza al 95% para los valores de altura de pico para 10 ppb es $2.79 < \mu < 3.11$, lo que corresponde a una concentración de 10 ± 0.5 ppb.

Absorbancia
 concentración: 10 ppb
 n = 90
 $\bar{x} = 0.066$
 s = 0.007
 $\mu = 0.066 \pm 0.002$

El intervalo de confianza al 95% para los valores de absorbancia para 10 ppb es $0.064 < \mu < 0.068$, lo que corresponde a una concentración de 10 ± 0.3 ppb.

En las gráficas hay variación en los resultados, pero no tanto como en el caso del tubo pirorrecubierto sin plataforma de L'vov. Estas variaciones son provocadas por el ruido de fondo del equipo, ya que la concentración de 10 ppb de aluminio se encuentra cerca del límite de detección.

Para determinar el límite de detección y el límite de cuantificación, se prepararon cinco curvas de 5, 10, 15 y 20 ppb de aluminio con su blanco y se leyeron. Con los resultados obtenidos se hicieron los siguientes cálculos:

Con los resultados del blanco:

Absorbancia	Altura de pico
n = 22	n = 22
$\bar{x}_B = 0.007$	$\bar{x}_B = 1.02$
$s_B = 0.019$	$s_B = 2.578$

\bar{x}_B = promedio de las lecturas del blanco

s_B = desviación estándar de las lecturas del blanco

Las ecuaciones de las curvas de calibración que se obtuvieron son:

Absorbancia

Curva (1) $y = 0.0106 x + 0.007$

Curva (2) $y = 0.0113 x + 0.009$

Curva (3) $y = 0.0105 x + 0.007$

Curva (4) $y = 0.0107 x + 0.011$

Curva (5) $y = 0.0114 x + 0.009$

Promedio de las cinco ecuaciones: $y = 0.0109 x + 0.009$

Altura de pico

Curva (1) $y = 1.13 x + 1.55$

Curva (2) $y = 1.18 x + 1.92$

Curva (3) $y = 1.13 x + 1.47$

Curva (4) $y = 1.12 x + 1.98$

Curva (5) $y = 1.22 x + 1.70$

Promedio de las cinco ecuaciones: $y = 1.16 x + 1.72$

a) Límite de detección

$$L.D. = \frac{3s_b - b}{m}$$

Sustituyendo los valores correspondientes

Absorbancia L.D. = 4.468 ppb

Altura de pico L.D. = 5.184 ppb

El límite de detección, tanto en absorbancia como en altura de pico, es suficientemente pequeño, para lograr determinar aluminio en líquido cefalorraquídeo.

b) Límite de cuantificación

$$L.Q. = \frac{10s_B - b}{m}$$

Sustituyendo los valores correspondientes

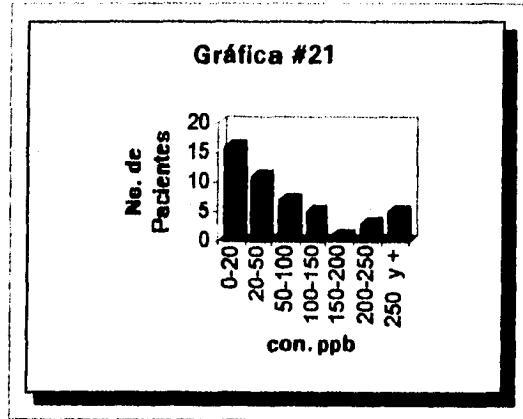
Absorbancia L.Q. = 16.734 ppb
Altura de pico L.Q. = 20.741 ppb

Finalmente se descongelaron las muestras de líquido cefalorraquídeo. Se leyeron una vez para ver en cada caso si era necesario hacer dilución, se les adicionaron los estándares y el modificador de matriz. Estas muestras se trabajaron en las condiciones ya mencionadas y con los resultados obtenidos se hicieron los cálculos correspondientes y los resultados finales se encuentran en el cuadro #5.

CUADRO #5
CONCENTRACION DE ALUMINIO
EN LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO

MUESTRA	CONCENTRACION DE ALUMINIO (µg/l)
1	268.86
2	218.21
3	103.00
4	48.08
5	54.75
6	17.70
7	75.78
8	679.97
9	11.75
10	30.75
11	10.91
12	1440.33
13	150.30
14	18.28
15	78.3
16	14.29
17	88.69
18	10.89
19	953.76
20	68.55
21	2138.93
22	49.83
23	68.25
24	16.48
25	13.25
26	118.28
27	157.25
28	29.58
29	40.43
30	34.19
31	13.67
32	16.58
33	19.61
34	27.41
35	14.42
36	125.67
37	38.40
38	37.23
39	41.06
40	216.30
41	206.41
42	100.85
43	8.31
44	11.11
45	17.88
46	36.55
47	18.52
48	131.25

Agrupando los resultados anteriores en los siguientes intervalos de concentración: de 0 a 20, de 20 a 50, de 50 a 100, de 100 a 150, de 150 a 200, de 200 a 250 y de 250 ppb y de 250 ppb de aluminio en adelante, se obtiene la gráfica #21.



VI. DISCUSION Y CONCLUSIONES

Con base en este trabajo, se puede comprobar que la espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito, es una técnica adecuada para la determinación de aluminio en muestras biológicas, específicamente en líquido cefalorraquídeo.

En el caso de trabajar con la técnica de espectrofotometría de absorción atómica con flama, se puede observar que es una técnica rápida, selectiva y confiable. Tiene un intervalo lineal de 0 a 50 ppm de aluminio con una muy buena correlación, lo que permite determinar aluminio en muestras biológicas como tejidos, corazón, leche y otras, cuya concentración se encuentra en este intervalo.

No hubo interferencia de matriz en la determinación del metal por flama en muestras de líquido cefalorraquídeo, lo cual permite suponer que en otro tipo de muestras biológicas, en las cuales sea necesario hacer una digestión previa a la determinación del elemento, tampoco habrá problemas en dicha determinación. Se puede decir que esta técnica es la apropiada para determinar aluminio de una manera rápida y confiable en muestras biológicas que tengan una concentración de $\mu\text{g/ml}$ del metal.

En el caso de que la muestra biológica tenga una concentración pequeña de aluminio, del orden de $\mu\text{g/L}$, es necesario utilizar la técnica de espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito y tubo pirorrecubierto con plataforma de L'vov y solución modificadora de matriz.

Si se comparan los resultados obtenidos con el tubo pirorrecubierto sin plataforma de L'vov con los del tubo pirorrecubierto con plataforma de L'vov se observa lo siguiente:

- 1) La temperatura de atomización es más baja (2500°C) utilizando el tubo con plataforma de L'vov, que la temperatura de atomización (2700°C) utilizando el tubo sin plataforma.
- 2) El volumen de la solución modificadora de matriz utilizado es menor en el caso del tubo con plataforma (1:10) que el utilizado en el caso del tubo sin plataforma (3:10).
- 3) El intervalo lineal es el mismo en ambos casos, de 0 a 50 ppb de aluminio. Sin embargo la recta obtenida con el tubo con plataforma es mejor ($y = 1.03x + 1.05$; $r = 0.998$) que la obtenida con el tubo sin plataforma ($y = 1.67x + 23.22$; $r = 0.998$). Hay una gran diferencia en la ordenada al origen entre ambas rectas, lo que implica tener una gran incertidumbre en los resultados al trabajar en la parte baja de la curva obtenida utilizando el tubo sin plataforma de L'vov.
- 4) El intervalo de confianza es más pequeño ($\mu = 2.95 \pm 0.16$) utilizando el tubo con plataforma, que el intervalo de confianza ($\mu = 18.54 \pm 1.9$) utilizando el tubo sin plataforma de L'vov.

De lo anterior se observa que los resultados obtenidos con el tubo con plataforma son mejores que los obtenidos sin la plataforma de L'vov. Esto se debe a que con la plataforma se alcanzan condiciones más estables, sobre todo durante el paso de atomización, lo que aumenta de esta manera la sensibilidad de la determinación.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Cuando se trabaja con horno de grafito con tubo pirorrecubierto con plataforma de L'vov, se obtiene una buena linealidad para el aluminio, pero por intervalos de concentración. El primer intervalo es de 0 a 50 ppb, el segundo de 50 a 100 ppb, el tercero de 100 a 150 ppb, el cuarto de 150 a 200 ppb y el quinto de 200 a 600 ppb de aluminio. Debido a estos intervalos de linealidad, dependiendo de la concentración de aluminio en la muestra biológica que se va a trabajar, se tiene que utilizar un intervalo de concentración con suficientes puntos para tener el intervalo lineal correcto. En el caso del líquido cefalorraquídeo, se puede utilizar el intervalo de 0 a 50 ppb, diluyendo las muestras cuando sea necesario, siempre y cuando se cuente con un líquido cefalorraquídeo con una concentración menor a 2 ppb de aluminio, para que sobre él se prepare la curva de calibración, ya que como se demostró hay interferencia de matriz.

En el trabajo que se hizo con tubo pirorrecubierto con plataforma de L'vov se presentaron los resultados obtenidos en absorbancia y en altura de pico. Como se puede observar, en general los resultados son muy precisos, esto es, que el pico que se graficaba en el registrador, correspondía a una absorbancia determinada, existiendo una buena relación entre ellos. Sin embargo, los resultados obtenidos con absorbancia son más confiables, ya que ahí no se tiene el error que se introduce al medir el pico graficado con una regla milimétrica. Por más exacto que se quiera medir, siempre hay un error de apreciación. El límite de detección que se obtiene es más pequeño cuando se utilizan los resultados obtenidos en absorbancia, que el que se obtiene cuando se utilizan los resultados obtenidos en altura de pico. Sin embargo, la concentración de aluminio de ambos límites es menor a la concentración de aluminio en líquido cefalorraquídeo reportada en individuos normales.

En general todos los resultados obtenidos con el tubo pirorrecubierto con plataforma de L'vov son bastante buenos considerando que se trabajó sin automuestreador. El límite de detección obtenido es lo suficientemente pequeño, para poder determinar aluminio en líquido cefalorraquídeo en las condiciones de trabajo establecidas en el laboratorio. Se puede decir que la metodología encontrada es confiable para la determinación de aluminio, a nivel de trazas, en estas muestras.

Analizando el cuadro #5, se puede observar que existe una gran variación en los resultados obtenidos. Esta variación se debe a que las muestras pueden provenir tanto de casos normales como de pacientes con problemas del sistema nervioso. Sin embargo, al analizar la gráfica #21, se encuentra que la tercera parte de las muestras coinciden con el intervalo de las concentraciones de aluminio reportadas como de individuos normales por Tslev y Pegon, y el resto de ellas provienen de personas neurológicamente enfermas. Sería necesario conocer la historia clínica de cada uno de los pacientes para poder establecer alguna asociación entre la concentración de aluminio y la enfermedad neurológica, así mismo se podría estudiar un grupo específico de pacientes con un solo tipo de afección nerviosa, para ver si existe una relación constante.

VII. REFERENCIAS

- 1)Tsalev DL (Ed.) Atomic Absorption Spectrometry In Occupational and Environmental Health Practice. CRC Press, Boca Ration, 1985; Vol. I, Chaps. 1, 2. 81-84, 64-65.
- 2)Esiri, M.M., Williams, R. J. D. Comments on an olfactory source for an environmental influence and possible involvement of aluminum in the development of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*. 1986; 7: 582-583.
- 3)Schiffman, S.S. The nose as a part of entry for aluminosilicates and other pollutants: possible role in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*. 1986; 7: 576-578.
- 4)Wills, M.R and Savory J. Chemical toxicology and clinical chemistry of metals IUPAC, Virginia, 1983; 303-315.
- 5)D'Haese, P. C. et al. Measurement of aluminum in serum, blood, urine and tissues of chronic hemodialyzed patients by use of electrothermal atomic absorption spectrometry. *Clin. Chem*. 1985; 31: 24-29.
- 6)Krishnan, S.S., Mc Lachlan D. R. et al. Aluminum toxicity in humans. Essential and toxic trace elements in human health and disease. Liss, Toronto, 1988; 645-659.
- 7)Rahman, H., Channon, S. M., et al. Aluminum in the dialysis fluid. *Clin. Nephrol*. 1985; 24: 78-83.
- 8)Mc. Elnay JC, D'Arcy PF. Aluminum content of infusion and irrigation fluids. *Int. J. Pharm*. 1986; 33: 261-263.
- 9)Katzman, R. Medical progress. Alzheimer's disease. *The N. Eng. J. Med*. 1986; 314: 964-972.
- 10)Pegon, Y. Dosage de L'aluminium dans les liquides biologiques par absorption atomique sans flamme. *Anal. Chim. Acta*. 1978; 101: 385-391.
- 11)Tsalev DL (Ed) Atomic Absorption Spectrometry in Occupational and Environmental Health Practice. CRC Press, Boca Raton, 1985; Vol II, Chap. 1, 1-5.
- 12)Van der Voet, G. B. and de Wolff, F. A. Intestinal absorption of aluminum in rats: effect of intraluminal pH and aluminum concentration. *J. Appl. Toxicol*. 1986; 61: 37-41.
- 13)Roberts, E. Alzheimer's disease may begin in the nose and may be caused by aluminosilicates. *Neurobiol. Aging*. 1986; 7: 561-567.
- 14)Alfrey, A. C. Systemic toxicity of aluminum in man. *Neurobiol. Aging*. 1986; 7: 543-545.

- 15) Webery, R., Berstad, A. Gastrointestinal absorption of aluminum from single doses of aluminum containing antacids in man. *Eur. J. Chem. Invest.* 1986; 15: 428-432.
- 16) Andress, D.L. et al. Early deposition of aluminum in bone in diabetic patients on hemodialysis. *The N. Eng. J. Med.* 1987; 316: 292-296.
- 17) Markesberg, W. R. et al. Brain trace element concentrations in aging. *Neurobiol. Aging.* 1984; 5: 19-28.
- 18) Carlisle, E. M. A silicon aluminum relationship in aged brain. *Neurobiol. Aging.* 1986; 7: 545-546.
- 19) Mc Lachlan, C., Krishnan, S. S., Quittkat, S., De Boni, V. Brain aluminum in Alzheimer's disease: influence of sample size and case selection. *Neurotoxicol.* 1980; 1: 25-32.
- 20) Liss, L., Thornton, D. The rationale for aluminum absorption control in early stages of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* 1986; 7: 552-554.
- 21) Mc Lachlan, C. Aluminum and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* 1986; 7: 525-532.
- 22) Baker, H., Margolis, F. L. Deafferentation-induced alterations in olfactory bulb as a model for the etiology of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* 1986; 7: 586-589.
- 23) Kazeni, H. and Johnson, D., Regulation of cerebrospinal fluid acid-base balance. *Physiol. Rev.* 1986; 66: 953-1032.
- 24) Fishman R.A. Cerebrospinal fluid in diseases of nervous system. Saunders, Philadelphia, 1980; Chaps. 2,3. 6-62.
- 25) Traub, R. et al. Brain destruction alone does not elevate brain aluminum. *Neurol.* 1981; 31: 986-990.
- 26) Mc Dermott, J. L. et al. Brain aluminum in aging and Alzheimer disease. *Neurol.* 1979; 29: 809-814.
- 27) Crapper, D. R., Krishnan, S. S., Dalton, A. J. Brain aluminum distribution in Alzheimer's disease and experimental neurofibrillary degeneration. *Science.* 1973; 180: 511-513.
- 28) Krishnan, S. S., et al. Aluminum toxicity to the brain. *The Scie. of the Total Environ.* 1988; 71: 59-64.
- 29) Mayor, G. H. Aluminum and Alzheimer's disease: new directions. *Neurobiol. Aging.* 1986; 7: 542-543.

- 30) Wisniewski, H. M. et al. No evidence for aluminum in etiology and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*. 1986; 7: 532-535.
- 31) Ghetti, B. and Bugiani, O. Aluminum's disease and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*. 1986; 7: 536-537.
- 32) Khachaturian, Z. Aluminum toxicity among others views on the etiology of Alzheimer disease. *Neurobiol. Aging*. 1986; 7: 537-539.
- 33) Pettergrew, J. W. Aluminum and Alzheimer's disease: an evolving understanding. *Neurobiol. Aging*. 1986; 7: 539-540.
- 34) Jope, R. S. Aluminum toxicity: transport and sites of action. *Neurobiol. Aging*. 1986; 7: 541-542.
- 35) Perl, D. P. and Arnold, R. Alzheimer's disease: X-ray spectrometric evidence of aluminum accumulation in neurofibrillary tangle-bearing neurons. *Science*. 1980; 208: 297-299.
- 36) King, S. W., Wills, M. R. and Savory, J. Electrothermal atomic absorption spectrometric determination of aluminum in blood serum. *Anal. Chim. Acta*. 1981; 128: 221-224.
- 37) Savory, J. and Wills, M. R. Analytical methods for aluminum measurement. *Kidn. Interna*. 1986; 29: 24-27.
- 38) Krishnan, S. S., Gillespie, K. A. and Crapper, D. R. Determination of aluminum in biological material by atomic absorption spectrometry. *Anal. Chem*. 1972, 44: 1469-70.
- 39) Gitelman, H. J. and Alderman, F. R. Electrothermal determination of aluminum in biological samples by atomic absorption spectroscopy. *Kid. Interna*. 1986; 29: 28-31.
- 40) Laxen, D. and Harrison, R. M. Cleaning methods for polythene containers prior to the determination of trace metals in freshwater samples. *Anal. Chem*. 1981; 53: 345-350.
- 41) Skoog, D. y West, D. *Química Analítica*. Mc Graw-Hill, México, 4ª Ed, 1990; 448-450.
- 42) *Analytical Methods for Atomic Absorption Spectrophotometry*. Perkin Elmer, Connecticut; 1982; 1-18.
- 43) Miller, J. C. y Miller, J. N. *Estadística Para Química Analítica*. Addison-Wesley Iberoamerican, S.A., USA, 1993; 1-37.
- 44) Long, G. L. and Winefordner, J. D. Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. *Anal. Chem*. 1983; 55: 710A-720A.
- 45) Keith, L.H. et al. Principles of environmental analysis. *Anal. Chem*. 1983; 55: 2210-2218.

- 46)Slavin, W. Graphite furnace AAS for biological materials. *The Scie. of the Total Environ.* 1988; 71: 17-35.
- 47)Slavin, W. and Carnrick, G. R. The stabilized temperature platform furnace. *At. Spectrosc.* 1987; 5: 137-145.
- 48)Techniques in Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry. The Perkin Elmer Corporation. 1985; 2-27.
- 49)Leung, F.Y. and Henderson, A. R. Improved determination of aluminum in serum and urine with use of a stabilized temperature platform furnace. *Clin. Chem.* 1982; 28: 2139-2143.
- 50)Leung, F. Y. and Henderson, A. R. Determination of aluminum in serum and urine using matrix modification and the L'vov platform. *At. Spectrosc.* 1983; 4: 1-4.