



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**PRUEBAS DE DESEMPEÑO PARA LA CUANTIFICACIÓN
DE CROMO EN SEMEN Y SUERO POR ESPECTROFOTOMETRÍA
DE ABSORCIÓN ATÓMICA ELECTROTÉRMICA CON CORRECTOR
ZEEMAN (ZGFAA)**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A

FERNANDO QUINTO VILCHIS

**DIRECTOR DE TESIS: M. en C. A. LOURDES CASTILLO GRANADA
ASESOR: DRA. PATRICIA ROSAS SAUCEDO**

JURADO:

M. en C. GLORIA VELÁSQUEZ VAQUERO	PRESIDENTE
M. en C. A. LOURDES CASTILLO GRANADA	VOCAL
DRA. PATRICIA ROSAS SAUCEDO	SECRETARIO
MTRA. MA. ISABEL GARDUÑO POZADAS	SUPLENTE
Q.F.B. TERESA BENÍTEZ ESCAMILLA	SUPLENTE



MÉXICO, D.F.

JUNIO DE 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Tesis presentada por: Fernando Quinto Vilchis

Director de tesis: M. en C. A. Lourdes Castillo Granada

Asesor: Dra. Patricia Rosas Saucedo

Lugar de desarrollo:

Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza UMIEZ.

Laboratorio de Química Forense de la Coordinación General de Servicios Periciales del Distrito Federal.

Durante la realización de esta tesis se conto con el apoyo de la Procuraduría General de Justicia del Distrito Federal, facilitando el acceso a sus instalaciones, uso de instrumentos, equipos y materiales necesarios para la realización de la misma, como parte del convenio

UNAM-PGJ 22701-1478-17-X-08

Así mismo se conto con el apoyo del Instituto Valenciano de Infertilidad en la toma de muestras biológicas, como parte del convenio

UNAM-IVI 21453-230-25-II-08

RECONOCIMIENTOS

Al Químico Noé Tapia Albino, Subdirector de Laboratorios de la Coordinación General de Servicios Periciales de la Procuraduría General de Justicia del D.F., por las facilidades otorgadas para la realización de las determinaciones analíticas, así como la confianza para el acceso a las instalaciones.

A la M. en C. Ma. Dolores Gálvez Mendoza, Perito Supervisor Responsable del Laboratorio Química Forense de la Coordinación General de Servicios Periciales de la Procuraduría General de Justicia del D.F., por la amabilidad y confianza mostradas durante el desarrollo del presente trabajo.

“Un poco de ciencia aleja de Dios, pero mucha ciencia devuelve a él”

Louis Pasteur

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Por permitir mi existencia y estar a mi lado en todo momento.

A mi Madre Ma. Guadalupe

Te doy las gracias por haberme dado la vida y estar siempre al pendiente de mí desde ese momento.

Por todos esos prestamos a mí cuenta sin fondos, con los cuales sustente mis estudios, logrando así una profesión.

Gracias por preocuparte por mí cuando me quedaba hasta tarde haciendo una tarea, por si había comido algo en el día, si me sentía mejor cuando enfermaba, en fin gracias por ser el ángel que ha cuidado de mí siempre.

Pienso que nunca podre pagarte todo lo que haz hecho por mí, espero estés orgullosa de mí, como lo estoy yo por ser tu hijo.

Si cometo errores en mi vida será culpa mía, pero si consigo alcanzar una meta será gracias a ti.

A mi hermano Ricardo

Que aunque al parecer nunca estaremos de acuerdo en nada y peharemos por siempre, eres una parte muy importante de mi vida.

A Ana Ma. Enciso

Por ser mi amiga y compañera, estando a mi lado en los momentos felices y en especial en los tristes, siempre tratando de hacerme sonreír, inventando cientos posibilidades de cómo podrían mejorar las cosas, para hacerme sentir mejor. En fin te agradezco por haberte embarcado en un viaje, sin una ruta segura ni un final conocido a mi lado, de esto ya hace más de 2 años de travesía, la cual espero nunca termine, en ese transcurso hemos aprendido mucho, también reído y desgraciadamente llorado, pero al final de todo, me he convertido en una mejor persona gracias a ti.

Gracias amor por ser el perfecto catalizador de mi felicidad y una de las ilusiones más grandes de mi vida.

A mis amigos

Omar Alejandro G. , Erendira Lizu C., Fernando Cuando, Alejandro Espinoza R., Alma Gonzales L.

Por compartir infinidad de momentos conmigo, estando siempre para apoyarme en momentos difíciles no importando que ellos tuvieran sus propios problemas, se que a pesar de la distancia y del tiempo siempre estarán a mi lado, finalmente gracias por entrar en mi vida y convertirse poco a poco en mis hermanos.

A la Maestra Lourdes Castillo

En primer lugar me gustaría agradecerle por confiar en mí, por ser mi mejor compañera de laboratorio, por tomarse el tiempo de corregir mis errores y tratar de transmitirme una pequeña parte de su conocimiento.

Pero sobre todo le agradezco el ser mi amiga y preocuparse no solo de mi desarrollo profesional, sino también personal. Siempre tendrá un lugar muy especial en mi vida.

Espero poder contar siempre con su amistad, siempre tendrá mi agradecimiento, admiración y respeto.

Y seamos sinceros a pesar de todo lo desesperante que puedo ser, me va a extrañar.

A mis sinodales

Por otorgarme el honor de aceptar este trabajo, empleando parte de su tiempo y sus conocimientos en su revisión, enriqueciendo así su contenido.

Gracias por ayudarme a iniciar y concluir mi formación como Q.F.B.

"Tu espíritu es el plumero de cualquier tela de araña. Detrás de cada línea de llegada, hay una de partida. Detrás de cada logro, hay otro desafío. Mientras estés vivo, siéntete vivo. Si extrañas lo que hacías vuelve a hacerlo. No vivas de fotos amarillas... Sigue aunque todos esperen que abandones. No dejes que se oxide el hierro que hay en ti. Haz que en vez de lástima, te tengan respeto. Cuando por los años no puedas correr, trota. Cuando no puedas trotar, camina. Cuando no puedas caminar, usa el bastón. ¡Pero nunca te detengas!"

Madre Teresa de Calcuta.

INDICE

CONTENIDO	Página
I. INTRODUCCIÓN	9
II. MARCO TEÓRICO	11
1. CROMO	11
1.1. Estado de oxidación	12
2. TRANSPORTE DE CROMO	14
3. BIOQUÍMICA DEL CROMO	16
4. INFERTILIDAD MASCULINA	19
5. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	22
6. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y FERTILIDAD HUMANA	23
7. CROMO COMO SUPLEMENTO ALIMENTICIO	27
8. CUANTIFICACIÓN DE CROMO	30
9. ESPECTROSCOPIA ATÓMICA	34
9.1. Absorción Atómica	34
9.1.1. Instrumentación	35
9.1.2. Fuente de radiación	35
9.1.3. Lámpara de descarga sin electrodos (EDL)	36
9.1.4. Sistema de atomización	36
9.2. Atomización Electrotérmica	36
9.2.1. Plataforma de L'Vov	38
9.2.2. Atomizador Transversal de Grafito con plataforma de L'Vov	39
9.2.3. Tubo de grafito transversal	40
9.2.4. Corrector de fondo Zeeman para GFAA	41
9.2.5. Interferencias en Absorción Atómica Electrotérmica	43
9.2.6. Interferencia espectral	44
9.2.7. Interferencia por matriz	44
9.3. Modificadores de matriz	45
9.4. Optimización del programa para el horno de grafito	46
9.4.1. Secado	46
9.4.2. Pirolisis o calcinación	47
9.4.3. Atomización	48
9.4.4. Limpieza	49
10. PRUEBAS DE DESEMPEÑO EN MÉTODOS ANALÍTICOS	50
11. PARÁMETROS DE LA VALIDACIÓN	51
12. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN	52

III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	54
IV.	OBJETIVOS	55
	1. Objetivo general	55
	2. Objetivos particulares	55
V.	HIPÓTESIS	56
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS	57
	1. Selección de individuos	57
	2. Toma de muestras de semen	57
	3. Especificaciones del método analítico	57
	3.1. Condiciones instrumentales	57
	3.2. Reactivos	58
	3.3. Especificaciones de análisis	58
	3.4. Validación del método analítico	58
	3.4.1. Precisión del sistema	58
	3.4.2. Linealidad del sistema	58
	3.4.3. Exactitud del método analítico	59
	3.4.4. Linealidad del método analítico	59
	3.4.5. Limite de detección	59
	3.4.6. Limite de cuantificación	60
	3.4.7. Precisión intermedia o reproducibilidad	60
	4. Análisis estadístico	60
VII.	RESULTADOS	61
	1. Programa de calentamiento	61
	2. Contenido de cromo en muestras de semen	64
	3. Validación del método analítico	71
	3.1. Precisión del sistema	71
	3.2. Linealidad del sistema	72
	3.3. Limite de detección y cuantificación	74
	3.4. Parámetros de validación para el método en suero	75
	3.5. Parámetros de validación para el método en semen	78
	3.6. Precisión intermedia o reproducibilidad	80
VIII.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	82
IX.	CONCLUSIONES	89
X.	PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES	90
XI.	REFERENCIAS	91
XII.	ANEXOS	98
	1. Interferencias espectrales de algunos elementos	98
	2. Cálculos realizados para los parámetros de la validación	100
	3. Formulas empleadas para la validación	104

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Mecanismo propuesto para el transporte de cromo.	15
Figura 2. Mecanismo propuesto para el transporte de cromo y mecanismo de acción de la cromodulina.	17
Figura 3. Relación existente entre la producción de radicales libres y los sistemas depuradores de estos, como papel fundamental en la producción de estrés oxidativo.	24
Figura 4. Estructura química del picolinato de cromo [Cr (C ₆ H ₄ NO ₂) ₃].	29
Figura 5. Emisión de energía desde una lámpara de cátodo hueco (HCL).	35
Figura 6. Estructura interna de un Horno de Grafito Longitudinal (a).Tubo de Grafito Longitudinal (b).	37
Figura 7. Grafica que muestra la diferencia de calentamiento que existe entre la plataforma de L'Vov y las paredes del tubo	38
Figura 8. Distribución de la temperatura a lo largo de un tubo de grafito (a) tubo longitudinal, (b) tubo transversal.	39
Figura 9. Diagrama de un horno de THGA en el cual se muestra el calentamiento transversal del tubo, mostrando la distribución de la temperatura a lo largo de la longitud del tubo.	40
Figura 10. Efecto de corrección de fondo mediante el uso de corrector Zeeman.	42
Figura 11. Etapas del programa de calentamiento para la cuantificación de cromo en semen y suero por horno de grafito.	62
Figura 12. Corrección de fondo utilizando el efecto Zeeman.	63
Figura 13. Gráfica de dispersión para los valores individuales en las diferentes fechas de ingesta de 200 µg del suplemento	66
Figura 14. Comparación de los testigos con los valores poblacionales de concentración de cromo para ambos grupos de estudio en las diferentes fechas de análisis.	68
Figura 15. Diagrama de barras para los valores poblacionales de los tres periodos de estudio (antes, durante y después del tratamiento), donde se observan los errores típicos para cada periodo.	69
Figura 16. Diagrama de caja y bigote donde se observa la tendencia y distribución de los datos para los valores testigo vs tratamiento con picolinato de cromo.	70
Figura 17. Gráfico para la linealidad del sistema.	73
Figura 18. Gráfico para la linealidad del método para suero.	77
Figura 19. Gráfico correspondiente para la linealidad del método para semen.	80

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Valores de cromo descritos en la literatura a lo largo del tiempo.	32
Tabla 2. Condiciones experimentales para la cuantificación de cromo en horno de grafito.	61
Tabla 3. Valores de concentración de Cr ($\mu\text{g/L}$) obtenidos en el semen de cada voluntario en las diferentes fechas del estudio	65
Tabla 4. Valores de concentración ($m \pm e.e.m$) poblacional de cromo en el semen de testigos y voluntarios sometidos a la ingesta de 200 $\mu\text{g/día}$ /21 días de picolinato de cromo y L-carnitina.	67
Tabla 5. Datos de absorbancia obtenidos para la precisión del sistema.	71
Tabla 6. Datos de absorbancia obtenidos para la linealidad del sistema.	72
Tabla 7. Valores de los blancos utilizados para el cálculo de limite de detección y cuantificación.	74
Tabla 8. Valores obtenidos para la exactitud del método en, la que se observan los porcentajes de recobro obtenidos.	75
Tabla 9. Resultados de la linealidad del método para suero donde se observan, los porcentajes de recobro obtenidos para las determinaciones.	76
	78
Tabla 10. Valores de concentración y % de recobro obtenidos para la exactitud del método.	
Tabla 11. Resultados obtenidos en la las determinaciones para la linealidad del método.	79
Tabla 12. Valores obtenidos para reproducibilidad para 2 analistas en 2 días diferentes ($\mu\text{g/L}$)	80
Tabla 13. Resultados obtenidos para la validación del método analítico.	81

I. INTRODUCCIÓN

En años recientes se ha dado gran importancia a los efectos de los contaminantes en los ecosistemas y su relación con la salud del hombre. El tema de la contaminación se ha convertido en un problema vital para la humanidad debido a la gravedad en sus efectos por causar importantes trastornos ambientales y daños a la salud.

El cromo es un elemento de transición que puede existir en diferentes estados de oxidación, los más comunes son (III) y (VI). El Cr(III) es la forma más estable en los sistemas biológicos, mientras que el Cr(VI) es un poderoso oxidante que proviene de fuentes industriales, cuando se consume en pequeñas cantidades es reducido su forma trivalente, esto en el medio ácido del jugo gástrico (1).

El cromo (III) es un mineral considerado como nutriente traza indispensable en humanos y en animales, con efectos reguladores en el metabolismo de los carbohidratos y lípidos a nivel molecular aumentando el efecto de la señal de insulina, amplificando sus efectos. Dentro de los suplementos alimenticios para humanos destaca el uso del picolinato de cromo, al que se le han atribuido propiedades en la reducción de la masa grasa y aumento de la masa corporal, así como en el control de peso entre otros (2,3,4). Esto ha motivado su uso entre los deportistas, se reporta que en el año 2000, en Estados Unidos se gastaron aproximadamente 500 millones de dólares en este tipo de productos. Sin embargo, su eficacia no ha sido plenamente comprobada siendo motivo de un intenso debate en la década actual (5).

Dada la problemática social en la que cada vez se está más expuesto ya sea por la exposición a actividades profesionales, industriales, ambientales, terapéuticas y estéticas, se considera que el cromo puede ser una de las causas de la disminución de la calidad del esperma humano con efectos nocivos sobre la fertilidad masculina (6).

En 1992, el British Medical Journal, publicó un artículo perturbador, un grupo de investigadores daneses, dirigidos por la doctora Carlsen, aseguraban que en los últimos 50 años el recuento de espermatozoides en humanos se había reducido a la mitad, pasando de 113 a 66 millones por centímetro cúbico. Los resultados se basaban en estudio de datos provenientes de 60 publicaciones científicas y que correspondía al análisis del semen de aproximadamente 15 mil hombres (7).

La toxicidad reproductiva por cromo había sido subestimada, en 1993 el informe del investigador Bonde *et al*, menciona que la exposición a niveles bajos de Cr(VI)

no representa un riesgo que afecte a la espermatogénesis en soldadores de acero inoxidable. Sin embargo, una serie de investigaciones de laboratorio utilizando animales, han señalado la toxicidad testicular del Cr(VI), de igual manera informes recientes correlacionan la exposición ocupacional crónica de este metal con la calidad anormal del esperma en hombres (8).

El análisis del cromo en los sistemas biológicos es un desafío analítico debido a los bajos niveles del catión (0.01 a 0.5 µg/L) y a la posible contaminación de las muestras. En el presente trabajo se desarrolló el método analítico y las pruebas de desempeño para la cuantificación de cromo en muestras de suero y líquido seminal, en un grupo de hombres sanos a los que se les suministró picolinato de cromo como complemento alimenticio. La cuantificación de cromo se realizó mediante la técnica de Espectroscopia de Absorción Atómica Multielemento con horno de grafito transversal y corrector de fondo Zeeman.

Todo esto responde a la inminente necesidad de determinar la respuesta del organismo al ser expuesto a cromo y así poder determinar sus efectos tóxicos sobre la calidad del semen humano, aunado a que la población en general y en mayor medida los atletas, cada vez consumen una mayor cantidad de suplementos alimenticios a base de cromo principalmente en su forma de picolinato de cromo como una alternativa para disminuir su masa corporal sin conocer los posibles riesgos de su uso.

II. MARCO TEÓRICO

1. CROMO

El cromo es un elemento natural, con número atómico 24, masa atómica relativa 51,996, además de ser considerado un elemento pirolítico por su alto punto de ebullición. El cromo forma compuestos en diferentes estados de oxidación, los más comunes son cromo (0), cromo (III) y cromo (VI). El cromo (III) es un elemento esencial, el cromo (VI) y el cromo (0) se producen generalmente en procesos industriales. El cromo metálico (cromo 0), se utiliza para la fabricación de acero, mientras que el cromo (VI) y cromo (III) se utilizan para el cromado de metales, elaboración de tintes, pigmentos, curtido de pieles y madera, entre otros (6,9).

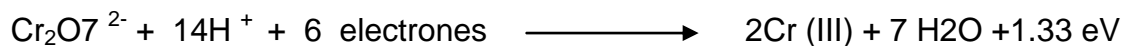
El cromo es uno de los metales más utilizados industrialmente. Se estima que varios millones de trabajadores en todo el mundo, están expuestos a compuestos de cromo. Por otra parte, es uno de los principales contaminantes en distintos lugares del mundo, sin embargo, sigue habiendo muchas preguntas sin respuesta sobre efectos nocivos en la salud humana (10).

Los estudios epidemiológicos realizados en 2004 por Danadevi *et al*, mostraron incidencia de cáncer de pulmón en trabajadores expuestos en la producción de pigmentos a base de cromatos y dicromatos (Cr(VI)), existen pruebas de un riesgo similar con las aleaciones de cromo. Estos hallazgos son la base de la decisión de la Agencia Internacional para la Investigación de Cáncer (IARC) para clasificar compuestos de cromo hexavalente, como agentes cancerígenos en humanos (11).

En varios estudios en ratas macho expuestas a cromo y a otros metales, se encontró que éste causa un decremento del conteo espermático, así como en la movilidad del esperma, relacionando de esta forma la ingesta de cromo con alteraciones en la calidad del esperma originando un incremento en los problemas de infertilidad (12,13,14).

1.1. Estado de oxidación

Es de gran importancia conocer que los estados de oxidación más usuales para este elemento; 3^+ y 6^+ tienen propiedades químicas y biológicas diferentes. La relación entre los estados hexavalente y trivalente del cromo son descritos por la siguiente ecuación:



El cromo (III) es soluble en soluciones ácidas, formando fácilmente complejos hexaédricos con ligandos apropiados, tales como oxalato y los iones sulfato (7,13).

En el estado de oxidación 6^+ , el cromo forma cromatos y dicromatos, que tienen un alto potencial oxidante. La diferencia de potencial eléctrico entre Cr(VI) y Cr(III) refleja el fuerte potencial de oxidación del cromo hexavalente y la energía (1,33eV), que se requiere para oxidar el cromo trivalente a su forma hexavalente (4,8).

En contraste, la reducción del Cr(VI) se produce espontáneamente en el organismo a menos que se presente en una forma insoluble, por ejemplo, en la sangre el Cr(VI), una vez que ha penetrado la membrana de los glóbulos rojos es rápidamente reducido a Cr(III) y se convierte en un constituyente celular que no puede abandonar fácilmente al eritrocito (6).

La forma trivalente de cromo, es la forma predominante del metal en los sistemas biológicos, parece jugar un papel nutricional en el organismo además de ser menos tóxico que la forma hexavalente, al parecer debido a su escasa permeabilidad en la membrana. Sin embargo estudios *in vitro* del cromo (III), han dado resultados positivos en mutagenicidad, tal vez implicado en el mecanismo epigenético de la carcinogénesis, aunque no existen suficientes estudios epidemiológicos en trabajadores expuestos a cromo (VI) (15).

El Cr(VI) es mucho más tóxico que el Cr(III), ya que atraviesa fácilmente la membrana celular y en última instancia se reduce a Cr(III). Para la forma hexavalente en una prueba realizada con dicromato de sodio, éste fue transportado a través de las membranas celulares de mamíferos por sistemas de transporte como carboxilato, sulfato y fosfato (6,14).

La reducción intracelular de Cr(VI) implica la generación de especies de vida corta, de cromo tetravalente y pentavalente con afinidades para constituyentes celulares que puede diferir de Cr(III), por lo tanto, la reducción de Cr(VI) se considera como un proceso de desintoxicación (8).

La unión inicial a macromoléculas celulares puede incluir a la forma pentavalente del cromo, una vez absorbida y retenida en tejidos biológicos, se produce Cr(III). El glutatión y cisteína parecen ser los cofactores más importantes para la reducción intracelular de la forma hexavalente (6).

2. TRANSPORTE DE CROMO

Los mecanismos de absorción y el transporte de cromo son aún inciertos, la administración *in vivo* de iones cromo a mamíferos, de manera oral o mediante inyección intravenosa, provoca su aparición en el organismo, de igual manera esto ocurre con el transporte de hierro por la proteína transferrina. Esta proteína tiene un peso molecular de 80.000 Da, está presente en el suero sanguíneo, se une a dos equivalentes de hierro férrico en pH neutro y ligeramente básico, esta unión se mantiene solamente en un 30% con hierro en promedio del total de la proteína, quedando libre aproximadamente el 70%, en consecuencia se ha propuesto como potencial transportador de otros iones metálicos entre los que se incluye al Cr(III) (5,16,17).

Estudios *in vitro* con la adición de cromo a sangre o plasma sanguíneo resultan en la unión de transferrina con Cr(III), aunque, bajo esas condiciones, la albumina y algunos productos de degradación también se enlazan al cromo. La transferencia de cromo por la transferrina a apo-cromodulina ha sido mostrada *in vivo*. Reportes recientes sobre los efectos de la insulina en el transporte de hierro y la relación entre hemocromatosis, sobrecarga de hierro hepático y diabetes sugieren que la transferrina puede ser el mayor transportador fisiológico de cromo (5,16,17).

Incrementos en la insulina resultan en la estimulación del movimiento de la transferrina hacia las vesículas de la membrana plasmática. Los receptores en la superficie de la célula pueden quedar saturados por el metal, esto al enlazarse a transferrina, que posteriormente se someten a endocitosis con acompañamiento en la liberación de metales y la acidificación del pH, por la nueva formación de vesículas. Basándose en estos datos se ha propuesto un mecanismo para el transporte de cromo (Figura 1). El aumento en la concentración insulina debería traducirse en un aumento de transporte de transferrina, incluida la parte que contiene el cromo enlazado, culminando en el transporte de cromo sanguíneo hacia las células insulino sensitivas y finalmente a cromodulina. En adultos diabéticos en los que la concentración de cromo en sangre se reduce, aumenta la pérdida de cromo en la orina (5,16,17,18).

Esto puede ser relacionado con los pacientes con inexplicable sobrecarga de hierro hepático (caracterizado por una asociación con la diabetes).

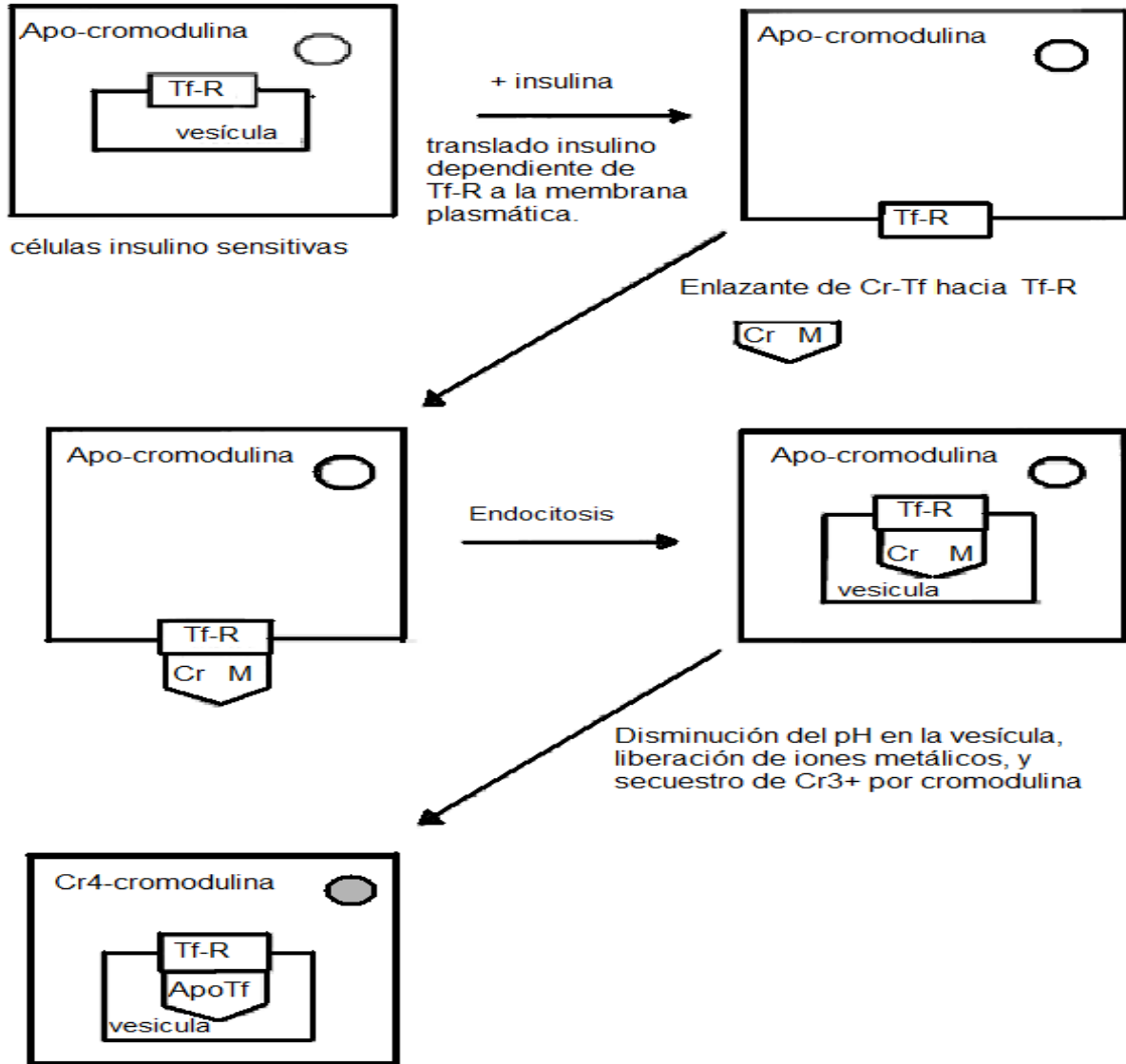


Figura 1. Mecanismo propuesto para el transporte de cromo (5).

En los últimos cinco años se ha producido un interés sobresaliente por comprender la función potencial para cromo trivalente en el metabolismo de los carbohidratos y lípidos a nivel molecular en mamíferos. En contraste, los 35 años de estudio previo, a partir del esclarecimiento de una función esencial del cromo (III) en mamíferos, ha dado como resultado numerosos estudios de la fisiología de la deficiencia de cromo y los efectos de la suplementación del metal, pero no sobre la estructura y modo de acción de la forma activa del metal (5,16,17).

3. BIOQUÍMICA DEL CROMO

Un avance en el establecimiento del mecanismo de acción del cromo a nivel molecular aparece a partir de la década de los 80's cuando los investigadores Wada y Yamamoto, informaron sobre el aislamiento y la caracterización de un único oligopeptido cromo fijador denominado como Sustancia cromo enlazante de Bajo Peso Molecular (Low-Molecular-Weight-Chromium-Binding-Substance LMWCr) en sus siglas en inglés o cromodulina (5,16,18,19,20).

El oligopeptido posee un peso molecular de 1500 Da y se compone de sólo cuatro tipos de aminoácidos residuales, glicina, cisteína, glutamato y aspartato. A pesar de su pequeño peso molecular, enlaza a cuatro equivalentes de iones de cromo, aparentemente en un acomodo tetra nuclear. Hasta la fecha, el oligopeptido ha sido aislado y purificado del hígado de conejo, riñón de porcino, hígado de bovino, calostro, hígado de perro y también ha sido aislado de hígado de rata y ratón. Por lo tanto, la cromodulina aparece ampliamente distribuida en los mamíferos (5,18,19).

El atributo más novedoso de la cromodulina es la capacidad para potenciar los efectos de la insulina sobre la conversión de la glucosa en dióxido de carbono o lípidos aislados de los adipocitos. Esta estimulación de la actividad de la insulina se produce sin modificar la concentración de la insulina necesaria para la actividad media máxima, lo que sugiere que la cromodulina desempeña un papel intrínseco en los adipocitos. La estimulación es directamente dependiente del contenido de cromo en la cromodulina. Ningún otro complejo que contenga especies de cromo potencia la acción de la insulina de esta manera (5,18,19).

Estudios combinados de dosis-respuesta de la insulina, con una dieta de suplementos de cromo sobre el transporte de glucosa en adipocitos de rata, sugieren que el papel para el cromo como cromodulina está implicado en la transducción de señales. En los últimos cinco años, exámenes sistemáticos de la activación o inhibición de la actividad de la fosfatasa y quinasa, en adipocitos de rata, por cromodulina pone de manifiesto dos efectos, en primer lugar una pequeña activación de la membrana fosfotirosina fosfatasa y, más significativamente una estimulación insulino sensitiva de la actividad de los receptores de insulina tirosina quinasa. El sitio de activación parece estar localizado en o cerca del sitio activo de la quinasa, además la adición de la cromodulina a un fragmento de la subunidad β del receptor de insulina que contiene el sitio activo (pero esto no requiere insulina para ser activada) resulta en una estimulación similar de la actividad de la quinasa (5,17,18,19).

Otros metales de transición que son asociados comúnmente con sistemas biológicos son ineficaces en la restauración de la capacidad de apocromodulina para estimular la actividad de la quinasa, indicando que la restauración es específica para cromo. Recientemente, estos resultados, junto con los estudios de homeostasis de cromo en la glucosa y la respuesta de insulina, se han incorporado a una propuesta, de la modalidad de la acción de la cromodulina como parte de un sistema de auto amplificación para la señalización de insulina (Figura 2).

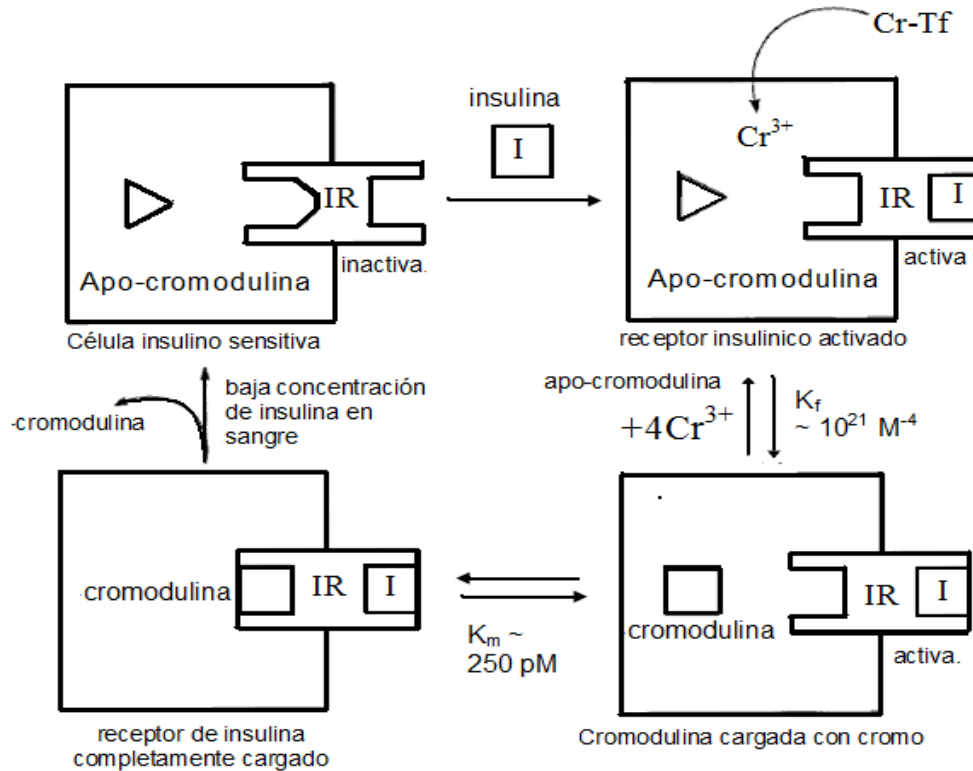


Figura 2. Mecanismo propuesto para el transporte de cromo y mecanismo de acción de la cromodulina (5).

En respuesta al incremento de la concentración de glucosa en sangre, la insulina se libera rápidamente en el torrente sanguíneo. La insulina se une a una subunidad alfa externa de la proteína transmembranal del receptor a insulina, provocando un cambio en la conformación del receptor. La cromodulina se almacena en su apo-forma en el citosol y el núcleo de las células sensibles a la insulina. Los aumentos en las concentraciones de insulina plasmática han dado como resultado el transporte de cromo de la sangre a las células insulino-dependientes. Esta transferencia es probablemente mediada por la proteína transportadora de metales: transferrina (5,16,17).

La apo-cromodulina posee una alta constante de enlace a iones de cromo ($K 10^{21}$) de tal manera que debe secuestrar al cromo en respuesta a este flujo de iones. La recién generada holocromodulina (es decir, CR4-cromodulina) puede obligar a la insulina a estimular los receptores de insulina, ayudando a mantener su conformación activa y logrando la amplificación su señales de insulina. Una vez que la concentración de la insulina disminuye y la señalización de sus receptores termina, la cromodulina es eliminada de las células (5,18,19).

4. INFERTILIDAD MASCULINA

Existe preocupación por la creciente prevalencia de anomalías en el proceso reproductivo en varones. Esto puede ser causado por diversos factores como podrían ser el aumento de estrés, el estilo de vida y las alteraciones endocrinas originadas por productos químicos en el medio ambiente. En algunos casos las actividades profesionales pueden suponer constante exposición a agentes tóxicos y pueden tener un efecto perjudicial sobre la reproducción humana (21).

Se ha denominado para fines estadísticos como factor masculino anormal cualquier causa o causas de esterilidad que radiquen en el hombre; su incidencia es de alrededor del 20 al 30% como factor único y 20 % más formando casos de patología múltiple simultánea, por lo que, en un 50% de los casos, el hombre es parcialmente responsable de la esterilidad en la pareja (22).

En años recientes, se ha presentado un aumento progresivo en el deterioro de la calidad del esperma en seres humanos. En 1995 Auger *et al*, en un estudio realizado en París durante los últimos 20 años, encontraron una disminución en la concentración y la movilidad del esperma, así como disminución del porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales en hombres fértiles. Se establece que la concentración de esperma decrece un 2.1 por ciento por año, de 89×10^6 por mililitro en 1973 a 60×10^6 por mililitro en 1992 durante el mismo periodo además el porcentaje de movilidad y de espermatozoides normales decrece de 0.6 por ciento y 0.5 por ciento por año respectivamente (23).

Al respecto, diversos estudios se han apoyado principalmente en el análisis básico de semen aprobado por la Organización Mundial de la Salud, donde los parámetros que se evalúan son: aspecto, volumen, viscosidad, pH, concentración, vitalidad, movilidad, morfología espermática, tiempo de licuefacción, aglutinación y la presencia de elementos celulares (24,25).

Análisis epidemiológicos en seres humanos expuestos a cromatos (Cr(VI)), así como estudios en animales y en cultivos celulares, han mostrado que la exposición a compuestos de cromo, está fuertemente correlacionada con daño en el ADN en las células somáticas, acompañado de elevación de las tasas de cáncer en seres humanos, estos estudios indican que Cr(VI), Cr(V), y Cr(IV) son fuertes inductores de efectos genotóxicos, mientras que el cromo trivalente parece ser sustancialmente más inocuo (23).

En 2003 Danadevi *et al*, monitorearon la calidad del semen de 57 trabajadores expuestos a níquel y a cromo en la industria de la soldadura, así como en 57 individuos no expuestos. Se cuantificó el níquel y cromo, el análisis de semen se realizó de acuerdo al método de la OMS. La concentración de cromo en sangre para trabajadores expuestos fue de $131.0 \pm 52.6 \mu\text{g/L}$, mientras que la concentración en el grupo testigo fue de $17.4 \pm 8.9 \mu\text{g/L}$. La concentración de espermatozoides presenta una correlación negativa con la concentración de concentración de cromo en sangre. Se encontraron diversas características anormales en el semen de los trabajadores expuestos, la concentración de espermatozoides en trabajadores expuestos fue de 14.5 ± 24.0 millones/mL, en tanto en el grupo control fue de 62.8 ± 43.7 millones/mL. La movilidad disminuyó en los trabajadores expuestos en comparación con los testigo (26).

En 2003 Hepburn *et al*, realizaron un estudio en *D. melanogaster* para probar *in vivo* los posibles efectos nocivos del picolinato de cromo, una población de estas moscas fueron expuestas a una concentración de $260 \mu\text{g}$ de Cr(III) por kilogramo de comida, se evaluaron los efectos del $\text{Cr}(\text{Pic})_3$ en el desarrollo de la mosca durante las diferentes etapas de su ciclo de vida y los posibles efectos en las generaciones sucesivas, en los resultados se observó una disminución en la formación, desarrollo y eclosión de las pupas, además el suplemento aumentó la tasa de aparición de mutaciones letales dominantes y esterilidad femenina (27).

Del mismo modo en 2003 Mukhopadhy exploró el potencial tóxico de un afluyente de la industria de galvanizado de cromo en *D. melanogaster*, cultivadas con alimentación mixta que incluía $10 \mu\text{g/mL}$ de chapado de cromo proveniente de los afluentes. Se examinó el patrón de aparición de moscas adultas y su desempeño reproductivo a fin de determinar si el afluyente afectaba su desarrollo. Los resultados mostraron que los afluentes son altamente tóxicos para el desarrollo de este organismo, en general, se presentó una reducción importante de la fecundidad y el desempeño reproductivo de las moscas adultas (28).

La absorción de Cr(VI) por el testículo y su posterior reducción a cromo trivalente son conocidos, en el 2005 Aruldas *et al*, describen en la literatura, la acumulación de células germinales uní y multinucleadas en el lumen del epidídimo de monos tratados durante seis meses con agua que contenía Cr(VI), causando una obstrucción ductal, lo cual se atribuye a la interrupción de la espermatogénesis y al daño en la histoarquitectura testicular. En un intento por comprender el mecanismo subyacente a la toxicidad testicular de cromo, también se estudió la situación de antioxidantes y pro-oxidantes en los testículos de estos animales, observando una disminución en la concentración de Vitamina A, C y E (13).

Así mismo, en 2005 Kumar *et al*, describen la exposición a cromo hexavalente (Cr(VI)), como una causa de carcinoma pulmonar, dermatitis, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad y gastrotoxicidad en humanos y animales de laboratorio. El estudio sugiere un riesgo creciente para los testículos en ratas expuestas a cromo hexavalente durante su fase de desarrollo prepuberal y a su vez, puede alterar la fisiología testicular normal en la edad adulta. Del mismo modo otros estudios llevados a cabo en ratas mostraron que el cromo provoca atrofia testicular y reduce el recuento de espermatozoides y la movilidad del mismo (29).

Se conoce la participación de los metales pesados en el estrés oxidativo celular, el mantener un equilibrio crítico entre pro-oxidantes y antioxidantes es una característica fisiológica de la célula, para conservar su supervivencia. La producción de radicales libres y especies reactivas del oxígeno (ROS Reactive Species Oxygen), han reportado efectos negativos en la movilidad y viabilidad espermática (6,13,27).

En el pH fisiológico, el Cr(VI) existe como oxianión cromato, que puede atravesar las membranas celulares a través de la superficie del sistema de transporte de aniones. Una vez captado, el Cr(VI) es reducido rápidamente a estados inferiores de oxidación (Cr(V), (IV), (III)) por los diferentes agentes reductores intracelulares. Durante la reducción intracelular del cromo VI son producidas una amplia variedad de especies reactivas de oxígeno (ROS). Como resultado de ello, el estrés oxidativo puede ser generado en diversos sistemas, reflejando la participación de la peroxidación lipídica y/o una reducción en la actividad de enzimas antioxidantes, tales como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y a su vez heme oxigenasa (5,10,16).

5. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

El estrés oxidativo ha provocado gran interés en los investigadores debido a que se ha encontrado su relación con diferentes estados patológicos. En la actualidad existe controversia si es la causa o consecuencia de diferentes enfermedades, y si la terapia con compuestos que presenten actividad antioxidante pudiera prevenir su progresión (29).

Se conoce como estrés oxidativo al desbalance del estado redox de la célula es decir, ésta se encuentra expuesta a un ambiente prooxidante y los mecanismos de defensa antioxidante son sobrepasados de forma que afectan el balance redox. Los ROS son agentes oxidantes altamente reactivos y forman parte de una clase de moléculas conocidas como radicales libres (RL). Un RL es cualquier molécula que contiene uno o más electrones desapareados, tienen una vida media en el rango de nanosegundos a milisegundos, son generados fisiológicamente por la transferencia de un electrón durante el metabolismo celular por ejemplo: en los procesos que generan energía en la mitocondria, donde estas reacciones solamente toman lugar en compartimientos especiales, o en el proceso oxidativo de los leucocitos polimorfo nucleares durante el mecanismo de defensa fisiológica (22,31,32).

Bajo ciertas condiciones, el oxígeno inerte puede inicialmente reaccionar con moléculas orgánicas a través de procesos bioquímicos originando a la formación de ROS, entre ellos los radicales libres, los cuales son especies altamente reactivas, entre las que se encuentran: el superóxido (O^*) radical hidroxilo (*OH) y el óxido nítrico, son altamente reactivos y reaccionan con moléculas en su entorno más directo. Se producen durante el metabolismo celular normal y en algunas ocasiones, como respuesta a la exposición a radiaciones ionizantes, rayos ultravioleta, contaminación ambiental, humo del cigarrillo, hipoxia, exceso de ejercicio, reacción inflamatoria, e isquemia. Los ROS, reaccionan muy rápidamente con la mayoría de los compuestos orgánicos y comienzan una serie de reacciones en cadena que modifican la estructura de algunas moléculas biológicas, particularmente de aquellas que poseen un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (33,34).

Cada RL formado en el organismo puede iniciar una serie de reacciones en cadena que continúan hasta que estos radicales son eliminados. Existen otras moléculas que no son radicales libres como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) pero que actúan fisiológicamente como tal, tienen una vida media más larga, pasan a través de la membrana y no están cargadas eléctricamente, el sistema antioxidante protege a los tejidos de los efectos de los RL (31,34,35,36).

6. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y FERTILIDAD HUMANA

Los ROS son radicales libres que juegan un papel significativo en muchos de los procesos fisiológicos del esperma entre los cuales destacan la capacitación espermática la hiperactivación y la fusión del esperma con el ovocito sin embargo algunos disparan muchos procesos patológicos en el sistema reproductivo masculino, donde estos procesos están estrechamente implicados en cáncer de vejiga y próstata, y por lo tanto en la fertilidad masculina (31,35,37).

Muchos estudios en el área de la infertilidad masculina se han centrado en el estrés oxidativo relacionándolo con los mecanismos de daños espermáticos. En 2004, Sikka menciona que el estudio de ciertos antioxidantes podrían ayudar a comprender mejor los mecanismos de acción de estrés oxidativo sobre la infertilidad (32).

El testículo, epidídimo, espermatozoides y el plasma seminal contienen enzimas antioxidantes, que protegen al semen de los efectos nocivos de ROS. Se ha registrado aumento en la concentración de ROS y antioxidantes subnormales en el plasma seminal de hombres estériles. Con base en esto se presume que la exposición crónica a cromo puede perturbar la espermatogénesis y la histoarquitectura testicular mediante la inducción de estrés oxidativo (13).

Los espermatozoides humanos son capaces de la generación controlada de ROS en bajas cantidades, desempeñan un papel importante en la inducción de capacitación espermática, la reacción acrosomal y la adquisición de la capacidad fertilizante del esperma (38).

Normalmente existe un equilibrio entre la generación de radicales libres y los sistemas de depuración (Figura 3). Sin embargo, la alta generación de ROS por espermatozoides inmaduros y anormales, la contaminación de los leucocitos, espermatozoides tratados (por ejemplo, el exceso de centrifugación, la criopreservación/descongelación), acompañado de una baja concentración de antioxidantes y depuradores en suero, semen, y/o esperma de tratamiento inducen un estado de estrés oxidativo (29,33,34).

Una alta concentración de ROS (ponen en peligro la motilidad espermática, la viabilidad, y función de la membrana mediante una interacción con los lípidos, proteínas, y ADN nuclear y mitocondrial (39).

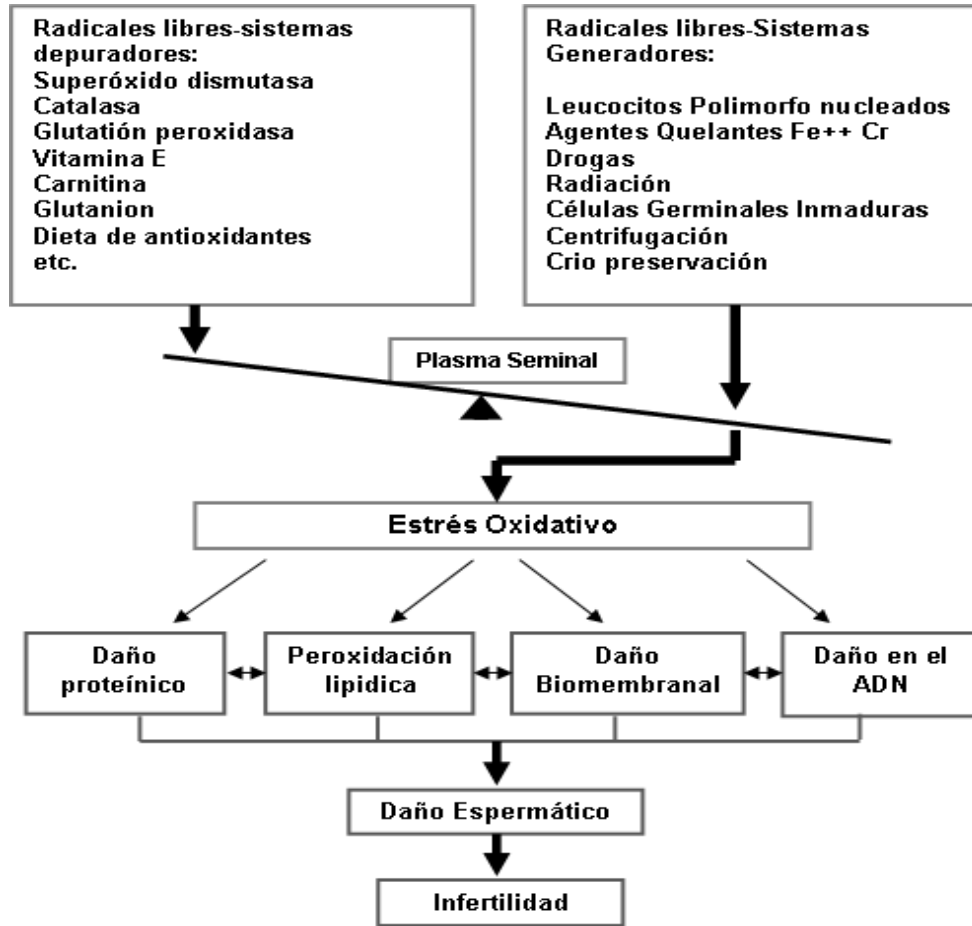


Figura 3. Relación existente entre la producción de radicales libres y los sistemas depuradores, como papel fundamental en la producción de estrés oxidativo (32).

La posible explicación de este proceso dañino se basa en el hecho de que las membranas de los espermatozoides de los mamíferos son ricas en ácidos grasos polisaturados, que los hacen muy flexibles pero al mismo tiempo muy susceptibles a la reacción de los radicales libres en los dobles enlaces de las cadenas, induciendo daño peroxidativo, la flexibilidad de la membrana es necesaria para apoyar su fusión en diferentes eventos asociados con una variedad de episodios secretorios (29,32,34).

En 2005, Aruldas *et al*, mencionan que después de suministrar a un grupo de monos, agua contaminada con Cr(VI), se presenta una intoxicación por cromo la cual afecta a las células germinales, causando una interrupción en la espermatogénesis, la acumulación de espermatozoides liberados prematuramente, la aparición de espermatozoides y células gigantes uní y multi nucleadas en el lumen de los tubos seminíferos, esto en una gran extensión del compartimiento adluminal, sin afectar los de los compartimentos basales y la parte basal de las

células de Sertoli, ofreciendo la posibilidad de recuperación de la espermatogénesis. La reversibilidad de los cambios histopatológicos cromosomales inducidos en los túbulos seminíferos es claramente distinta a la histología testicular normal. En monos pertenecientes a grupos expuestos nuevamente (retratamiento), se observó la aparición de normozoospermia alrededor del sexto mes del período de retiro lo cual comprueba la recuperación de la espermatogénesis normal en estos animales (13,36).

En resumen las principales implicaciones de ROS en la función espermática son las siguientes:

- El exceso de generación de ROS en el semen, principalmente por los neutrófilos así como anomalías en los espermatozoides puede ser una causa de infertilidad.
- Las altas concentraciones de peróxido de hidrógeno inducen la peroxidación lipídica, originando muerte celular.
- Un aumento en la producción de ROS por espermatozoides se asocia con una disminución potencial de membrana mitocondrial (MMP). Pacientes con los parámetros anormales de semen presentan significativamente una disminución de MMP.
- Hombres no fértiles tienen un decremento en las variables espermáticas inducidas por una alta concentración de ROS. Existe una relación positiva entre el aumento de los daños causados por ROS en el esperma y una alta concentración de citocromo, que indica apoptosis en los pacientes con infertilidad por factor masculino.
- El exceso de radicales libres con frecuencia implica la generación de un error en la espermiogénesis, resultando en la liberación de espermatozoides con presencia de anomalías de retención citoplasmática, del epitelio germinal.
- Las consecuencias del estrés oxidativo incluyen una pérdida de la movilidad, potencial para la fertilización y la inducción de daño del ADN en el núcleo de los espermatozoides.

- Originan una disminución importante en la flexibilidad de la membrana plasmática del espermatozoide debido a la peroxidación de los ácidos grasos no saturados presentes en la membrana, teniendo como consecuencia perdida en la función de los espermatozoides.

- El H_2O_2 afecta directamente las funciones críticas de los espermatozoides en el proceso de fecundación. Bajas concentraciones mantienen la capacitación espermática, mientras que las altas concentraciones tienen efectos nocivos, según lo determinado en los puntos finales del proceso de capacitación. Estos efectos probablemente dependen de las alteraciones en la membrana plasmática y la homeostasis intracelular por el proceso oxidativo (13,34,39,40).

7. CROMO COMO SUPLEMENTO ALIMENTICIO

En 1988, Solórzano del Río, menciona que estudios realizados en la década de los 50's describen al cromo, como un nutriente esencial para los seres humanos, que se puede ingerir de manera segura como complemento y que no tiene efectos tóxicos a dosis altas ni por largo tiempo (41).

El Nacional Research Council ha afirmado que el cromo dietético (Cr(III)) no es tóxico y que cantidades de 200 µg diarios se consideran seguras. Sin embargo, se ha mostrado en animales de laboratorio que la administración prolongada o excesiva de suplementos de cromo, en la forma de picolinato de cromo, provoca la acumulación del metal en el organismo alcanzando concentraciones que pueden lesionar a los cromosomas (posible efecto cancerígeno) (42).

El interés en el cromo como una mejora nutricional para el metabolismo de la glucosa se remontan a la década de los 50's, cuando se sugirió que la levadura de cerveza contenía un factor de tolerancia a la glucosa (GTF) que evitó la diabetes en animales de laboratorio. Este factor finalmente fue sugerido como una forma biológicamente activa de cromo que podría disminuir de manera importante la concentración de glucosa en plasma en ratones diabéticos (30,43).

La administración de cromo en pacientes con diabetes se incrementó en los 70's, donde se observó, que éste era realmente un nutriente esencial requerido para el metabolismo normal de carbohidratos, estos estudios además, implicaron fuertemente al cromo como un cofactor en la acción de la insulina. El cromo trivalente se encuentra en una amplia gama de alimentos, incluidos las yemas de huevo, granos enteros, leguminosas verdes, brócoli, carne, levadura de cerveza, algunas marcas de vino y cerveza. De igual manera está presente en muchos multivitamínicos/minerales, en algunos casos específicos como picolinato de cromo (Cr(Pic)₃) (30,43).

En 1999 Greenway *et al.* y en 2006 González *et al.*, presentaron estudios que revelaron que los posibles efectos benéficos derivados de la alteración de la tasa de internalización de la insulina y mejora, por tanto, de la acción de la enzima, que se traduce en un incremento en la masa magra, una disminución de la masa grasa y el peso corporal inducidos por el uso de picolinato de cromo son mínimos o nulos e incluso se han detectado posibles repercusiones negativas como consecuencia de la acumulación de cromo en distintos órganos como hígado y riñón, sugiriendo la posibilidad de mutagénesis y carcinogénesis (21,44).

Las recomendaciones sobre requerimientos de vitaminas y minerales elaboradas por el Comité de Alimentos y Nutrición, del Consejo de Investigación Nacional de la Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos, proporcionan un estándar para evaluar la ingesta dietética de una persona desde la infancia hasta la edad adulta, esto incluye la Ingesta Diaria Segura y Adecuada de Vitaminas y Minerales (ESADDI, por sus siglas en inglés), recomendando para el cromo de 50 a 200 $\mu\text{g}/\text{día}$ (45).

Teóricamente, los suplementos que contienen picolinato de cromo, benefician a los deportistas de alto rendimiento, ya que mejoran la sensibilidad a la insulina y el metabolismo de los hidratos de carbono durante el ejercicio. Asimismo, se le atribuyen beneficios ocasionados por el aumento anabolizante de la insulina, lo que origina un aumento en la capacitación de los aminoácidos por el músculo e incremento en la masa muscular y reducción de la grasa corporal. Dado el potencial de aplicación comercial de esta teórica posibilidad para los deportistas y la población en general, la mayoría de las investigaciones realizadas hasta la fecha se han centrado en el efecto de los suplementos de cromo sobre la composición del organismo, utilizando en la mayoría de los estudios picolinato de cromo (42).

La ingesta de suplementos con picolinato de cromo no es recomendada para personas con trastornos del comportamiento, ya que el propio picolinato puede provocar efectos adversos al actuar sobre diferentes neurotransmisores en el sistema nervioso central (42).

Aún se especula como es que el cromo trabaja en la estimulación de la actividad de la insulina, de lo que resultaría en una mejora corporal en el metabolismo de la glucosa, el metabolismo exacto en la actividad de la insulina es poco claro. Se ha sugerido que el cromo trabaja en el incremento en la sensibilidad de los receptores de insulina (46).

La forma más popular de cromo en suplementos dietéticos, es el picolinato de cromo ($\text{Cr}(\text{Pic})_3$) (Figura 4), es un compuesto con peso molecular de 418,30 es notablemente estable en jugo gástrico sintético y permanece intacto durante varias horas aunque su vida media es menor de 24 horas (47,48).

El complejo de picolinato de cromo parece pasar libremente a través del yeyuno, probablemente migra y es incorporado a las células en su forma original. Los ligandos del picolinato cambian el potencial redox del cromocentro del complejo para que pueda ser reducido por los agentes reductores biológicos como es el caso del ascorbato y los tioles. El complejo de cromo resultante puede interactuar con oxígeno, generando radicales hidroxilo. En estudios *in vitro* se usan

concentraciones de $(Cr(Pic)_3)$, que se estima corresponden a la cantidad presente en las células de los individuos que han ingerido el suplemento durante largos periodos de tiempo, con lo cual se determina de igual modo las concentraciones celulares típicas de ascorbato, con lo cual se podría comprobar que el rompimiento de la molécula de ADN resulta de la generación de radicales hidroxilo (5,16,49).

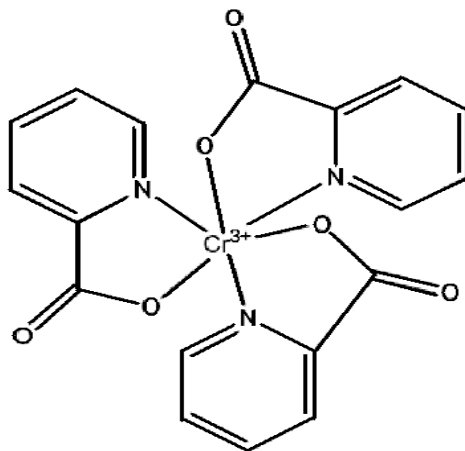


Figura 4. Estructura química del picolinato de cromo $[Cr(C_6H_4NO_2)_3]$ (50,51).

Según los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la obesidad y el sobrepeso han alcanzado caracteres de epidemia mundial, más de mil millones de personas adultas tienen sobrepeso y de ellas al menos 300 millones son obesos. La obesidad aumenta significativamente el riesgo de desarrollo de la diabetes tipo 2, hipertensión, y enfermedades cardiovasculares. Varios estudios han evaluado los efectos de la suplementación con cromo y sus posibles efectos en el peso corporal en los individuos sanos que padecen diabetes. Un estudio realizado en pacientes con diabetes a los cuales se les suministró picolinato de cromo, no indicó efectos significativos sobre el peso corporal, mientras que otro en sujetos ancianos con intolerancia a la glucosa mostró reducciones significativas en el Índice de Masa Corporal (IMC) (18).

Recientes meta análisis sugieren que el picolinato de cromo posee un efecto positivo en la pérdida de peso, al observarse un efecto pequeño pero estadísticamente significativo de entre 0,08 a 0,2 kilos por semana. Para muchos autores, el uso de este producto es seguro, aunque para otros su eficacia es similar a la de un placebo. Se debe de tener en cuenta, que la ingestión de este tipo de sustancia podría conllevar a la producción de radicales libres, así mismo la ingestión de más de 1000 microgramos diarios de picolinato de cromo puede producir fallo renal (52).

8. CUANTIFICACIÓN DEL CROMO

La cuantificación del cromo total en fluidos y tejidos biológicos (sangre, componentes sanguíneos, hueso, y orina entre otros), es de suma importancia. La determinación analítica exacta y precisa de cromo total en materiales biológicos es extremadamente difícil de lograr debido a la baja concentración de este elemento ($<5 \mu\text{g/L}$) y a la matriz compleja que acompaña al cromo tanto en sangre como en orina (53).

La función esencial de cromo para el mantenimiento de la tolerancia a la glucosa normal en ratas fue postulada desde 1959, donde se hizo necesario cuantificar la concentración de cromo en orina, los métodos colorimétricos existentes no eran lo suficientemente sensibles para poder cuantificar los valores de concentración bajos de este elemento en los fluidos biológicos. En ese entonces la espectroscopia de absorción atómica se introdujo en los laboratorios como una técnica analítica para la cuantificación de elementos metálicos, sin diferenciar estado de oxidación, en sus inicios el método con llama empezó a sustituir los antiguos métodos analíticos gravimétricos y calorimétricos. Sin embargo el límite de detección y cuantificación (mg/mL , ppm) no eran los adecuados para los valores de concentración de cromo presente tanto en orina como en sangre ($\mu\text{g/L}$, ppb). Con la llegada de los espectrofotómetros de absorción atómica que utilizan como sistema de introducción de la muestra el tubo de grafito con calentamiento electrotérmico (horno de grafito), fue posible la cuantificación de metales en el rango de $\mu\text{g/L}$ (ppb), posterior a los primeros hornos de grafito se diseñaron importantes modificaciones, teniendo como objetivo obtener valores de cuantificación y detección cada vez más pequeños. Actualmente con el uso de correctores de fondo eficientes, modificadores de matriz y lámparas de mayor intensidad se ha llegado a límites de cuantificación menores a $1 \mu\text{g/L}$.

Para la cuantificación de cromo se describe en la literatura rangos variables dependiendo del procedimiento analítico empleado llegando a una estabilización de los valores entre 1 a $10 \mu\text{g/L}$, estos valores han sido confirmados por métodos alternos como la espectrometría de masas) (53).

Estas concentraciones tan bajas exigen en el proceso analítico, un estricto control de la contaminación de la muestra desde la toma hasta el procesamiento y obtención de la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro. Se requieren reactivos libres de metales (ultrapuros), habitaciones ultra limpias, control de la calidad de las sustancias de referencia así como la limpieza de los materiales de uso común. Con estas precauciones, el análisis de cromo en los materiales

biológicos es ahora una rutina en algunos laboratorios especializados. Los valores analíticos para la concentración de cromo en fluidos biológicos descritos en la literatura antes de 1980 deben ser tomados con ciertas precauciones, los comunicados más recientes solo se deben aceptar si van acompañados con los datos que garanticen un buen control de calidad a través del uso de sustancias de referencia certificadas y la validación del proceso analítico (53).

Se ha señalado en la literatura que la determinación de cromo por horno de grafito puede ser susceptible a la atenuación de interferencias espectrales mediante el uso de corrector de fondo, sobre todo cuando se desea analizar matrices complejas (49).

La determinación del cromo por Absorción Atómica por horno de grafito demanda ciertas exigencias y precauciones en cada paso del análisis, debido principalmente a que el cromo es un metal ubicuo en el ambiente, y por tanto la contaminación por el mismo surge fácilmente. En este sentido, cabe señalar que el cromo se utiliza en la sociedad industrial moderna para la fabricación de acero inoxidable, el cromado y la producción de pigmentos, por lo tanto, la contaminación por el uso de aguja de acero inoxidable de una jeringa, o de tapones de goma con color de los tubos de vidrio utilizados para la colecta de sangre, deberían ser considerados (54), algunos autores recomiendan que no debe usarse una aguja de acero inoxidable en la toma de muestras por punción, de este modo se hace obligatorio el uso de una cánula de polipropeno además el lavado de los tubos de plástico que van a ser utilizados para colocar la muestra de sangre deben ser lavados con ácido (HNO_3 al 5% en agua desionizada) (18,55). En consecuencia, debe tenerse el mayor cuidado para desarrollar una metodología precisa, exacta, y libre de interferencias para el análisis de cromo proporcionando así una completa confianza analítica, en la obtención de datos en estudios clínicos de este metal (54,56).

El cromo es un elemento refractario (mp $\sim 1857 \pm 20$ °C, bp, 2672 °C). Dos ideas principales pueden extraerse de este hecho, en primer lugar, el uso de isoformas para la estabilización del cromo en el análisis térmico en horno de grafito resultan ser innecesarias. En segundo lugar, la pirolisis a altas temperaturas ($> \sim 1500$ °C) se puede aplicar a un horno para la eliminación eficaz de la matriz, sin la pérdida significativa de cromo en la volatilización. Como consecuencia, los efectos de interferencia de fondo, producidas en el horno por matrices complejas, se disminuyen con el desarrollo de un programa óptimo de temperatura (3,51,54).

La Absorción Atómica en horno de grafito con corrección de fondo se utiliza en muestras biológicas para las mediciones de elementos metálicos a bajas concentraciones (ppb), teniendo como principal objetivo la eliminación de la

interferencia por matriz. La corrección de fondo Zeeman resulta ser muy apropiada, siendo así este método el ideal para la cuantificación de cromo en los eritrocitos y demás componentes sanguíneos (56).

El principal problema analítico en la determinación de cromo (metal traza), en fluidos biológicos, además de la baja concentración presente ($\mu\text{g/L}$), es la matriz compleja, por ejemplo para la cuantificación de cromo se prefiere el suero por presentar una matriz menos compleja que la sangre total. Hay pruebas que sugieren, sin embargo, que el cromo, por ejemplo, se acumula en los glóbulos rojos, aumentando así la necesidad de métodos confiables de análisis en sangre total (56,57).

Las concentraciones reportadas para valores basales de cromo son muy diversas y dependen principalmente de la matriz, técnica analítica usada tal y como se muestra en la Tabla 1, donde se describen los valores reportados por los investigadores a lo largo del tiempo.

Tabla 1. Valores de cromo descritos en la literatura a lo largo del tiempo.

Año	Concentración de Cr ($\mu\text{g/L}$)	Matriz biológica	Método analítico	Referencia
1971	28	plasma sanguíneo	A.A con llama	Schroeder <i>et al</i> (58).
1978	0.14	Suero	A.A con horno de grafito	Frederick J. Kayne <i>et al</i> (56).
1988	0.19	Suero	A.A	Venkatesh Iyengar <i>et al</i> (59).
1999	5.90 ± 6.01 3.66 ± 2.27	sangre total orina	A.A con llama	Heon KIMI <i>et al</i> (35).
2001	0.5 - 0.15	plasma sanguíneo	A.A	J. O Flaterty, <i>et al</i> (60).
2001	0.22	sangre total	Espectroscopia Inductiva Acoplada a Plasma	C. Patrick Case <i>et al</i> (57).
2002	0.416	Suero	A.A con horno de grafito	Berta Rolla Nunes <i>et al</i> (61).
2005	22.8 ± 17.7	sangre total	A.A	Sunil Kumar <i>et al</i> (29).

A.A. Absorción Atómica

Así mismo se ha hecho evidente la necesidad del uso de tritón X-100, el cual se añade a la sangre para reducir la viscosidad de la muestra. Resulta evidente que la forma endógena de los metales en la sangre se comporta de manera diferente a los estándares, tanto acuosos como los adicionados con estándar, tratando así de disminuir dichas diferencias (55).

9. ESPECTROSCOPIA ATÓMICA

Dentro de las técnicas analíticas modernas de Espectroscopia Atómica para la cuantificación de elementos metálicos traza, destacan:

- Espectroscopia de Absorción Atómica (AA) de flama y horno de grafito.
- Espectroscopia de Emisión Atómica en plasma acoplado inductivamente (ICP-AES; Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy).

Espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS; Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) (62).

El límite de cuantificación puede ir desde partes por millón (ppm; mg/L, $\mu\text{g/mL}$) o partes por billón (ppb, $\mu\text{g/L}$, ng/mL), las técnicas de espectroscopia atómica son altamente específicas y casi libres de interferencia (63).

9.1. Absorción Atómica

Con la técnica de Espectrofotometría de Absorción Atómica es posible la determinación cuantitativa de 64 elementos metálicos presentes en una gran variedad de muestras. Este proceso que ocurre cuando un átomo en estado basal, libre y neutro absorbe energía a una determinada longitud de onda, lo que origina que un electrón sea transferido a otro orbital originando un estado excitado. El electrón promovido retorna espontáneamente a su orbital original con emisión de energía, lo que constituye la Espectrofotometría de Emisión Atómica, útil para cuantificar los elementos alcalinos (62).

El átomo de cualquier elemento está formado por un núcleo rodeado por electrones en un número determinado por su número atómico, estos electrones se encuentran distribuidos en los orbitales atómicos de acuerdo a la configuración electrónica, ($1s^2$, $2s^2$, $2p^6$, etc.). La energía más baja corresponde a la configuración electrónica más estable, en la cual los electrones están en los orbitales que les corresponde y se conoce como "estado basal", cuando el átomo absorbe energía, un electrón de algún orbital puede ser promovido a un orbital más alejado del núcleo y pasar al "estado excitado", este estado es de alta energía, es inestable y el electrón retorna espontáneamente a su orbital original o "estado basal", con emisión de energía. Se hace notar que la energía absorbida involucra la espectroscopia de absorción y el paso de decaimiento o retorno al estado basal involucra la Espectroscopia de Emisión (64,65).

9.1.1. Instrumentación

Los instrumentos de absorción atómica constan de:

- Fuente de radiación
- Sistema de atomización
- Monocromador
- Detector
- Componentes electrónicos para procesar la señal de datos
- Visualización de datos (sistema de computo)

9.1.2. Fuente de radiación

La fuente de radiación más común es la lámpara de cátodo hueco (HCL), y en menor proporción lámpara de descarga sin electrodos (EDL). Las lámparas son específicas para cada elemento, el cátodo esta fabricado del elemento para el que esta construida la lámpara. En general, cada elemento se cuantifica con su lámpara específica para este (63).

La lámpara de cátodo hueco consiste en un ánodo de tungsteno y un cátodo hueco fabricado con el metal del analito, todo el sistema esta dentro de un tubo de vidrio sellado, contiene gas inerte, usualmente argón, a una presión de 1-5 torr (63).

La aplicación de la corriente eléctrica modulada causa la ionización del argón, los cationes de argón llegan al cátodo con la energía necesaria para desalojar algunos átomos del metal y así producir una nube atómica, a esto se le llama sputtering (desalojo), los átomos del metal desalojados se excitan y emiten energía a sus longitudes de onda característica (Figura 5) (63).

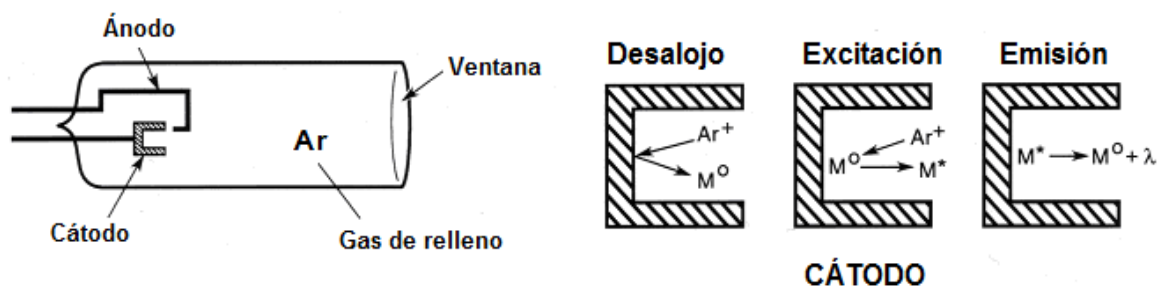


Figura 5. Emisión de energía desde una lámpara de cátodo hueco (HCL) (63).

9.1.3. Lámpara de descarga sin electrodos (EDL)

Este tipo de lámpara consiste de un pequeño bulbo de cuarzo sellado que contiene una pequeña cantidad del elemento para el cual está fabricada la lámpara, este bulbo se encuentra lleno de gas inerte a baja presión entre 0.1 a 5 Torr y rodeado por un cilindro de cerámica y éste a su vez, rodeado por una bobina de radiofrecuencia, cuando se le aplica energía a la bobina, los átomos dentro del bulbo se vaporizan y excitan, cuando retornan al estado basal emiten el espectro característico (63).

9.1.4. Sistema de atomización

Este sistema tienen dos objetivos, uno de ellos es convertir las muestras poli-atómicas en átomos libres en su estado basal y el otro es mantener la concentración de átomos constante, el tiempo suficiente para detectar y registrar el valor de la radiación absorbida por estos átomos (66).

9.2. Atomización Electrotérmica

Los atomizadores electrotérmicos que aparecieron por primera vez en el comercio aproximadamente en 1970, proporcionaban generalmente una alta sensibilidad, siendo posible cuantificar concentraciones en el orden de los ppb ($\mu\text{g/L}$), en este sistema la muestra completa se atomiza en un periodo corto, el tiempo de permanencia de los átomos en el camino óptico es de un segundo o más (66).

La precisión relativa de los métodos electrotérmicos por lo común se ubica en el intervalo de 5-10% en comparación con el 1% o menos que se puede esperar de la atomización de llama o plasma. En los atomizadores de tipo electrotérmico usualmente de 10 a 30 microlitros de la muestra se depositan dentro del tubo de grafito con un automuestreador (66).

Con la absorción atómica por horno de grafito (GFAA), la llama se sustituye por una corriente eléctrica alta, que al ser aplicada al tubo de grafito, y este al ser un material no conductor se eleva su temperatura permitiendo la implementación de diferentes pasos en el análisis del analito.

- Deshidratación o Secado
- Calcinación (Mineralización)
- Atomización

Durante el primero la muestra se evapora a temperatura relativamente baja 110°C , seguido de un aumento en la temperatura de entre $300\text{-}1200^{\circ}\text{C}$, en este proceso la materia orgánica es convertida en cenizas. Después de este paso la temperatura se incrementa con rapidez entre $2000\text{-}3000^{\circ}\text{C}$, lo que provoca que la muestra se vaporice y atomice, formando átomos libres y neutros dicha atomización ocurre en milisegundos a segundos (67).

Los átomos libres y neutros así formados, efectúan el proceso de absorción de energía desde la radiación que proviene de la lámpara de cátodo hueco y que pasa a lo largo del tubo (Figura 6). Como resultado de ello, la sensibilidad y los límites de detección son significativamente mayores (63).

El rendimiento óptimo del GFAA requiere de un sistema óptico que debe proporcionar un máximo rendimiento de salida de luz, las superficies interiores incandescentes deben contar con un sistema de calentamiento y enfriamiento eficientes (66,67).

El instrumento electrónico debe ser capaz de responder con precisión a las señales generadas por el horno, las cuales son rápidas y transitorias y ser capaz de corregir las menores variaciones en la señal de la línea basal. Además debe ser diseñado para proporcionar condiciones óptimas de análisis. La muestra debe ser atomizada en forma controlada para que producir un proceso térmicamente estable y así evitar posibles interferencias y errores analíticos (66,67).

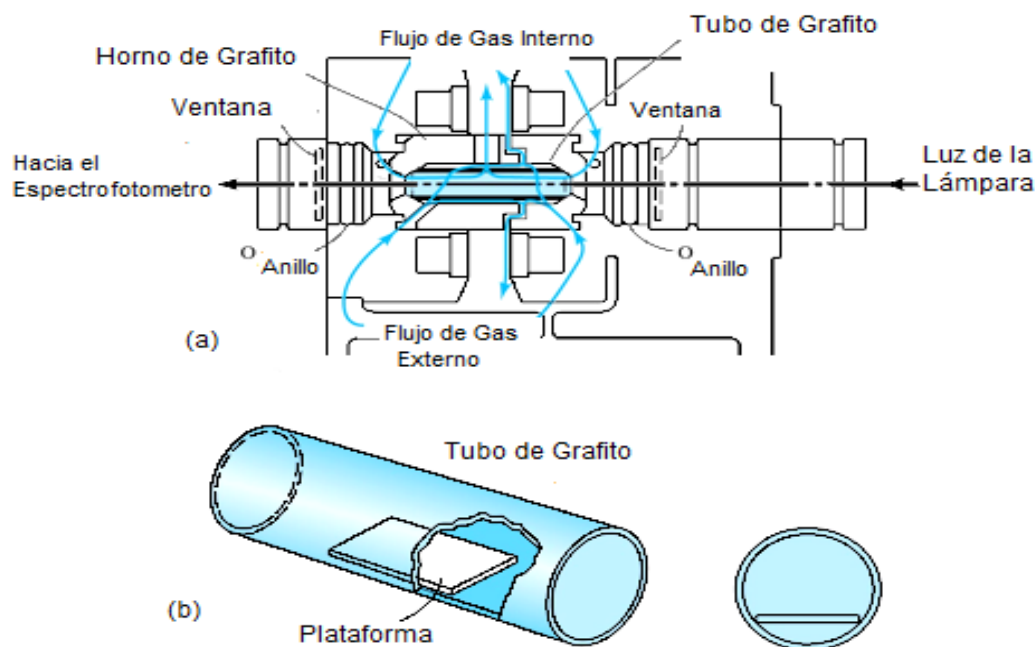


Figura 6. Estructura interna de un Horno de Grafito Longitudinal (a). Tubo de Grafito Longitudinal (b) (68).

9.2.1. Plataforma de L'Vov

La plataforma de L'Vov, es de grafito y se encuentra debajo del orificio de entrada de la muestra, en ésta la muestra es evaporada y calcinada, la función de la plataforma es retrasar la vaporización y la atomización de la muestra hasta que la atmósfera del horno ha alcanzado condiciones de equilibrio térmico (Figura 7), obteniendo así señales con una mayor reproducibilidad (62,66,68).

Se ha demostrado empíricamente que reduciendo la porosidad natural del tubo de grafito, se pueden mitigar algunos de los efectos de la matriz en la que está contenida la muestra y la reproducibilidad. Durante una atomización, parte del analito y de la matriz difunden aparentemente en el tubo, lo que hace más lento el proceso de atomización, obteniéndose así señales más bajas del analito. Para evitar este efecto la mayoría de las superficies de grafito se recubren con una delgada capa de carbono pirolítico, que permite sellar los poros del tubo de grafito.

El grafito pirolítico es un tipo de grafito que se ha depositado capa a capa en un medio altamente homogéneo, lo que se consigue pasando una mezcla de gas inerte y un hidrocarburo como metano a través del tubo mientras se mantiene a una temperatura elevada y baja presión (63).

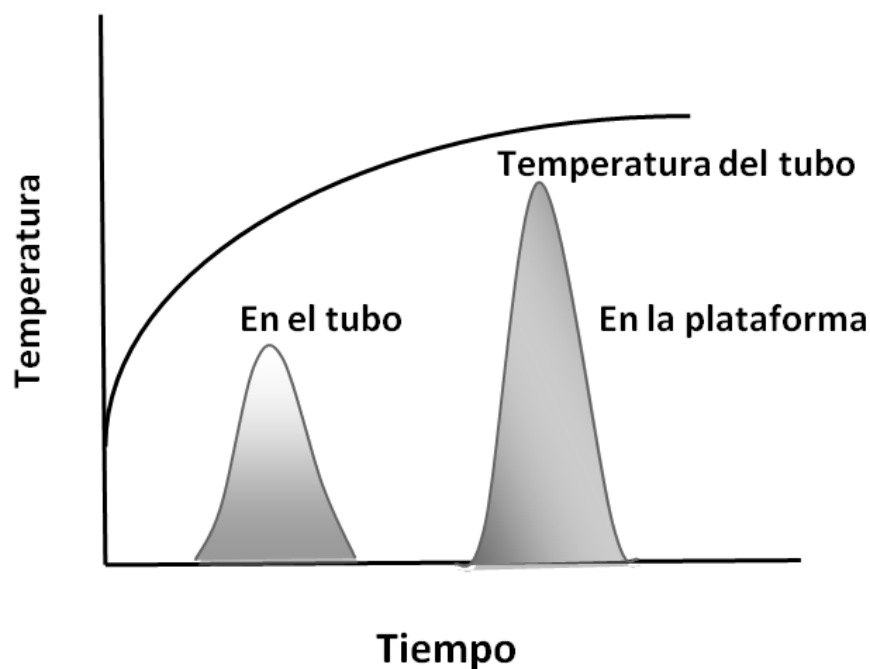


Figura 7. Grafica que muestra la diferencia de calentamiento que existe entre la plataforma de L'Vov y las paredes del tubo (67).

9.2.2. Atomizador Transversal de Grafito con plataforma de L'Vov

Durante los últimos 20 años se ha tratado de mejorar el horno de grafito originalmente descrito por Massmann. Este diseño ha sido mejorado de forma continua sin embargo, se sabe que existen varias limitaciones fundamentales de este diseño, por ejemplo la distribución de temperatura a lo largo del tubo de grafito en un horno longitudinal no es uniforme. El uso de la plataforma L'vov en la atomización y el pre-enfriamiento tiene la finalidad mejorar la distribución de la temperatura, reduciendo o retrasando su distribución a lo largo de la plataforma.

El diseño del tubo transversal en el horno de grafito, proporciona una distribución uniforme de la temperatura en toda la longitud del mismo. Esto significa que los extremos del tubo y el centro llegan a la misma temperatura, en la Figura 8 se representa los tipos de horno de grafito y la distribución de la temperatura en ambos casos.

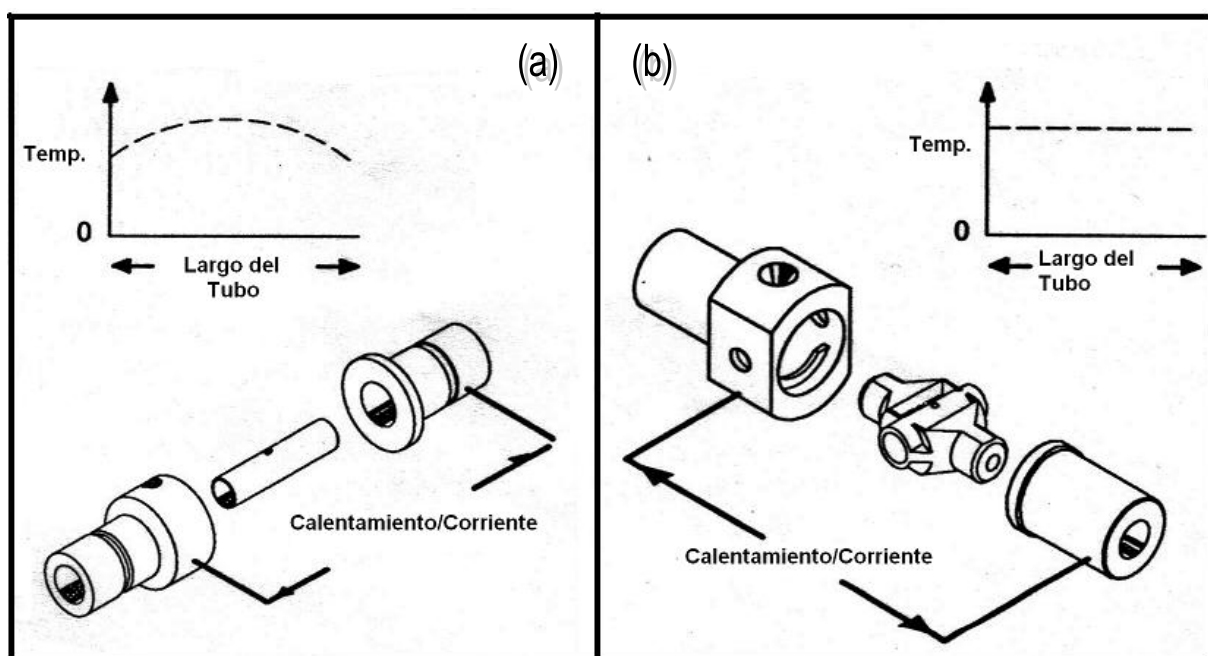


Figura 8. Distribución de la temperatura a lo largo de un tubo de grafito, tubo longitudinal (a), tubo transversal (b) (67).

El mejor medio para lograr la uniformidad térmica, y un entorno estable es a través del uso de una aplicación transversal, con un máximo poder de calentamiento y con plataforma de L'Vov (Figura 9). En estas condiciones, resulta óptima la formación de átomos libres, y la recombinación de los átomos de moléculas,

evitando así que puedan producirse efectos de memoria. Además al ser todos los componentes del horno de grafito inertes, de larga vida, de alta calidad y pureza se garantiza a largo plazo su reproducibilidad (62,66,67,69).

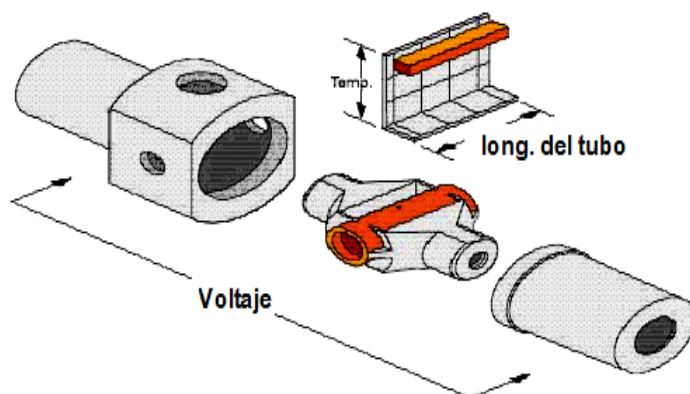


Figura 9. Diagrama de un horno de grafito transversal, en el cual se muestra el calentamiento transversal del tubo, mostrando la distribución de la temperatura a lo largo del tubo (62).

9.2.3. Tubo de grafito transversal

El tamaño y la forma del tubo transversal de grafito, han sido establecidos después de un largo programa de desarrollo con el fin de lograr una distribución uniforme de la temperatura sobre la longitud del tubo. La incorporación de la plataforma de L'Vov en los tubos, se realiza mediante un proceso mecanizado a partir de una pieza de alta densidad espectral antes de ser recubierto con una fina capa de grafito pirolítico. Esta superficie impide la difusión de la fase gaseosa durante la atomización.

La mayoría de las matrices provocan menos interferencia en los tubos recubiertos con grafito pirolítico, porque no son retenidos entre las capas de grafito durante la pirolisis de la muestra, además los tubos recubiertos con grafito pirolítico tienen una vida útil mayor debido a su superficie relativamente impermeable. Los tubos de grafito tienen vida útil de 50 a varios cientos de determinaciones, dependiendo del tiempo de atomización, temperatura, flujo de gas y el tipo de muestra (67,69).

9.2.4. Corrector de fondo Zeeman para GFAA

Cuando una radiación (línea de resonancia) es expuesta a un intenso campo magnético ($\sim 10\text{KG}$), se produce un desdoblamiento de los niveles de energía electrónicos de los átomos, lo que conduce a la formación de diversas líneas de absorción para cada transición electrónica. Estas líneas están separadas unas de otras en unos 0.01 nm . Siendo la suma de las absorbancias de estas líneas exactamente igual a la de la línea de procedencia. Este fenómeno común para todos los espectros atómicos, se denomina efecto Zeeman (66,67,68,69).

En función del tipo de transición electrónica implicado en el proceso de absorción existen diversos modelos de desdoblamiento. El modelo más sencillo que se observa con transiciones de singulete, conduce a una línea central o línea π y a dos líneas satélite σ igualmente espaciadas. La línea central que coincide con la longitud de onda original, tiene una absorbancia del doble que la correspondiente a la línea σ . En transiciones más complejas, se producen desdoblamientos adicionales de las líneas π y σ (66,67,68).

La aplicación del efecto Zeeman en los instrumentos de Absorción Atómica se basa en la distinta respuesta a la radiación polarizada de los dos tipos de picos de absorción. El pico π absorbe solamente la radiación que esta polarizada en un plano paralelo a un campo magnético externo; por el contrario los picos σ solo absorben la radiación polarizada a 90° respecto al campo (Figura 10) (66).

Los instrumentos con efecto Zeeman permiten una corrección más exacta del fondo, haciéndolos especialmente útiles en atomizadores electrotérmicos donde permiten la determinación directa de elementos en muestras como orina y sangre. En estas muestras la descomposición de la materia orgánica conduce a grandes correcciones de fondo y por consiguiente, a la posibilidad de errores significativos (67,69,70,71).

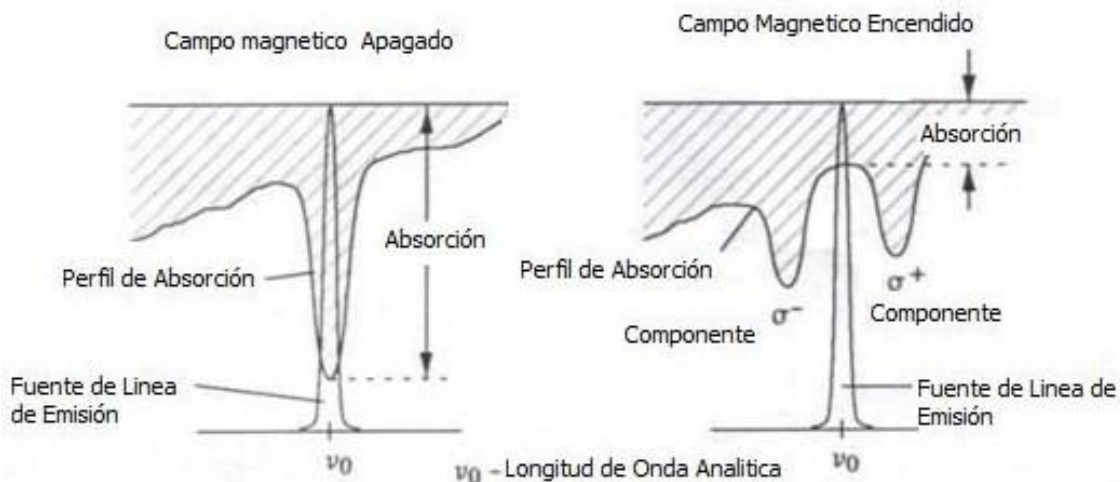


Figura 10. Efecto de corrección de fondo mediante el uso de corrector Zeeman (67).

En un sistema modulado Zeeman, la combinación atómica y la absorción de fondo se medirán primero, mientras que el campo magnético está apagado. Cuando el campo magnético está activado, el detector mide exclusivamente el fondo de absorción, y el componente π no es detectado. La diferencia entre las dos señales de absorción atómica es corregida por el efecto Zeeman (69,70).

El campo magnético puede ser aplicado a vapor atómico ya sea transversal (perpendicular) o longitudinal (es decir, paralelo) al eje óptico. Una gran ventaja del corrector de fondo Zeeman longitudinal es que no es necesario un polarizador para la eliminación del componente π , proporcionando así mayor rendimiento de luz y la mejora del rendimiento analítico (67,69).

9.2.5. Interferencias en Absorción Atómica Electrotérmica

Una interferencia se presenta cuando existe alguna alteración en el proceso dentro del tubo de grafito o en la llama que origine una disminución de la población de átomos libres y neutros durante la atomización. La Espectrofotometría de Absorción Atómica con sus diferentes métodos es una técnica analítica que permite control de las interferencias lo que la hace una técnica analítica casi libre de interferencias.

Las interferencias pueden ser de dos clases:

- Químicas
- Físicas

Interferencia química

Esta interferencia se presenta cuando la respuesta debida al analito se ve afectada por la presencia de diversos componentes en la muestra, originando ausencia o nula absorción de energía por parte del analito. Este tipo de interferencia se puede presentar cuando la temperatura de atomización no sea suficientemente alta para disociar las moléculas o cuando el átomo disociado se oxida de inmediato, dando un compuesto que no se disocia a la temperatura de la llama. Esta interferencia puede reducirse o eliminarse con modificaciones en el programa de calentamiento y con el empleo de modificadores de matriz que favorecen la formación de compuestos volátiles por reacción con algunos componentes de la matriz o por la formación de compuestos estables con el analito permitiendo el uso de temperaturas altas en el proceso de atomización (63).

Interferencias físicas

Las interferencias físicas se presentan cuando la presencia de otros componentes en la solución muestra afecta las propiedades fisicoquímicas de la solución (viscosidad, tensión superficial, etc.), entre las cuales se han considerado:

- Interferencia espectral
- Interferencia por matriz

9.2.6. Interferencia espectral

Esta interferencia sucede cuando dos líneas de resonancia para dos diferentes elementos tienen valores muy parecidos. Las líneas de absorción o emisión atómica tienen un grosor de 0.001 nm, están perfectamente definidas por una longitud de onda, sin embargo a pesar que existen algunos casos de absorción o emisión atómica muy similar cada una de ellas tiene diferente sensibilidad. Los casos de interferencia entre las líneas de resonancia de diferentes elementos son conocidas (Anexo 1) (63).

Las interferencias espectrales también se producen debido a la presencia de productos de combustión, que poseen señales de absorción anchas que interfieren con la línea de resonancia principal en la cuantificación del analito (63).

9.2.7. Interferencia por matriz

La interferencia por matriz se presenta cuando la absorbancia registrada por la muestra y por la preparación de referencia no se correlaciona por efecto de la concentración de sales o moléculas presentes en la solución problema (71).

El primer evento ocurre cuando la muestra es más viscosa o tiene una diferente tensión superficial respecto a las soluciones patrón, al momento de introducir la muestra al sistema, donde los eventos de la medición de los volúmenes de muestra, modificador de matriz y disolvente quedan sujetos a una interferencia física. En fluidos biológicos esta interferencia se disminuye notablemente con el empleo de sustancias tensoactivas como es el caso del tritón X100, favoreciendo la medición de los componentes líquidos y la introducción de la muestra al tubo de grafito. Hace algún tiempo, el problema de la interferencia de matriz en la atomización electrotérmica era importante. Actualmente, con los recientes progresos en la tecnología de la plataforma, los nuevos materiales de grafito de alta calidad, la instrumentación fotométrica rápida y la corrección de fondo Zeeman se consigue reducir este tipo de interferencias al nivel que se encuentra en las llamas (63,71).

9.3. Modificadores de matriz

Este método emplea compuestos químicos conocidos como modificadores de matriz, tiene gran aplicación en Espectrofotometría Electrotérmica para la cuantificación de metales traza (ppb,ng/mL), ya que contribuyen a eliminar algunas interferencias (67,72).

El modificador de matriz es una sustancia añadida para lograr diversos efectos, tales como mejorar la sensibilidad y la repetitividad, con las consecuentes mejoras en el método analítico (67).

Los efectos de los modificadores de matriz son los siguientes:

1. Eliminación de componentes de interferencia

Alternativamente, el modificador de matriz puede reaccionar con diversos compuestos presentes en la matriz para volverlos más volátiles y así promover su eliminación antes de la atomización (72).

2. Disminuir la vaporización de determinados elementos

Cuando el analito forma compuestos estables con el modificador lo hace más estable, disminuye su volatilidad e impide su pérdida durante el pre tratamiento térmico, así el analito permanecerá en la plataforma hasta el paso de atomización, ésto permite una mayor aproximación a las condiciones isotérmicas. Este efecto es especialmente importante para los elementos con un bajo punto de fusión, como As, Cd, o Pb. Ya que al ser elementos con un bajo punto de fusión son fácilmente vaporizados, un ajuste alto de temperatura en la pirolisis reduce la sensibilidad y dificulta la reproducibilidad. Por el contrario, un ajuste de temperatura bajo es suficiente para evitar la vaporización de los elementos medidos pero resulta insuficiente para eliminar por completo la interferencia de los componentes, de manera que la interferencia se produce durante la atomización (67,72).

Absorción de fondo

La absorción de fondo es una interferencia común en Absorción Atómica y que no es compensada por los métodos descritos anteriormente, puede tener diferentes orígenes, tales como:

- La presencia de moléculas en la muestra que pasan a la llama y afectan el haz de radiación, pudiendo ser corregida, la absorción de fondo, al momento de ajustar correctamente el instrumento.

- Cuando está presente gran cantidad de sales en la muestra, mismas que llegan a la llama y que pueden producir absorción de fondo, a consecuencia de la luz dispersa o por absorción molecular.
- Cuando se emplean atomizadores electrotérmicos (horno de grafito) durante la fase de atomización, donde algún material orgánico puede ser desprendido, causando humo y una severa atenuación del haz de luz (67,72,73).

9.4. Optimización del programa para el horno de grafito

Muchas soluciones acuosas pueden ser analizadas utilizando la pirolisis y atomización a temperaturas recomendadas por el fabricante. Las muestras más complejas pueden requerir ajustes, además se debe tener cuidado para evitar perder el analito durante la etapa de pirolisis. Por lo tanto existen procedimientos para optimizar cada paso en el programa del horno (63,67,69).

9.4.1. Secado

La finalidad de este paso es evaporar el disolvente de la muestra sin salpicaduras, ya que esto puede provocar picos irregulares o dobles que conducen a los errores. El secado (desolvatación) es una parte importante en la secuencia de cualquier programa de horno de grafito y tiene una gran influencia en la determinación de la precisión y la vida útil del tubo. Cuando se introduce la muestra, no debe haber salpicaduras o chisporroteo. Si se producen salpicaduras o chisporroteo, el horno está demasiado caliente. Esto podría ocurrir si el agua de refrigeración está demasiado caliente o si el tiempo de análisis de una muestra a otra es demasiado corto (67,68,69).

La temperatura de secado es típicamente de 20°C a 40°C por encima del punto de ebullición del disolvente. El tiempo de rampa deberá ser lo suficientemente largo para evitar un aumento rápido de temperatura que puede provocar salpicaduras, de 1 a 5 segundos resulta suficiente. Con el horno de grafito transversal se recomienda un procedimiento de secado en dos etapas. El secado secuencial no debe tener más tiempo que el único paso sugerido anteriormente para hornos equipados con plataformas, pero a partir de la experiencia se han encontrado condiciones de secado más reproducibles (67,68,69).

20 µL de muestra acuosa puede ser secada con una secuencia de 110°C con una rampa de 5°C/seg y un tiempo sostenido de 20 segundos, seguido de un incremento de temperatura a 130°C con un tiempo sostenido de 30 seg en este

procedimiento se calienta inicialmente la plataforma, en el punto de ebullición del disolvente, seguido de un aumento a 130°C, eliminándolo rápidamente del sistema de vapor (67,68,69).

Si el instrumento está equipado con un sistema de extracción, es aconsejable la iniciación y optimización de la secuencia de secado sin utilizar el sistema de extracción. Esto le permite comprobar el proceso de secado y total eliminación de vapor de disolvente del horno mirando la condensación del vapor de disolvente en un pequeño espejo, colocado en un ángulo entre los polos magnéticos. Se debe tomar en cuenta que cuando se utilizan grandes volúmenes de muestra, habrá un aumento en la cantidad de matriz depositada en el horno. Esto probablemente aumenta la señal de fondo (67,68,69).

9.4.2. Pirolisis o calcinación

El objetivo del paso de pirolisis térmica es la eliminación de la mayor cantidad de matriz tanto como sea posible antes de la atomización. Esto disminuye la posibilidad de interferencia química y reduce la magnitud de la señal de fondo (67,68,69).

Para muchos de los elementos, el uso de un modificador de matriz mejora el análisis. El modificador se añade a la muestra en altas concentraciones, transformando al analito en un compuesto más estable. Esto hace la pirolisis térmica más previsible y reproducible para una gran variedad de matrices (67,68,69).

Las sales de cloruro son relativamente volátiles mientras que, los nitratos y sulfatos soportan temperaturas más altas antes de la volatilización. El uso de un modificador de la matriz convierte el analito a una especie común pudiendo eliminar el tipo de problema con picos múltiples (67,68,69).

Para muchas soluciones acuosas, la temperatura óptima de pirolisis es la recomendada para cada elemento por el fabricante. Un tiempo de espera de 30 segundos suele ser suficiente, aunque algunas matrices densas pueden requerir un mayor tiempo. Para matrices complejas, la temperatura óptima de pirolisis debe ser determinada empíricamente integrando la absorbancia contra la temperatura (67,68,69).

El tiempo de rampa desde el secado a la pirolisis, de 5 a 10 segundos es suficiente. Sin embargo, la matriz puede contener diferentes componentes que

requieren una ampliación en los requisitos de temperatura de descomposición térmica (67,68,69).

Si la temperatura de pirólisis sube en un paso, los componentes de la matriz pueden disociarse o hervir tan rápidamente que pueden causar salpicaduras de la muestra las cuales pueden causar irregularidades o picos múltiples. En tales casos, se requiere una rampa relativamente larga de aproximadamente 15 segundos (67,68,69).

Gas alternativo, algunas matrices orgánicas son mejor removidas por pirólisis con un gas alternativo como el aire o el oxígeno. Es aconsejable purgar el tubo de grafito con el paso de argón antes de incrementar más la temperatura (67,68,69).

9.4.3. Atomización

La temperatura seleccionada para atomización debe ser suficientemente elevada para garantizar la completa volatilización del analito. La temperatura óptima depende de las propiedades del compuesto formado por el analito (67,68,69).

Se debe establecer previamente el programa del horno, con el tiempo de secado y la temperatura. Utilizando una constante de tiempo de pirólisis y la temperatura a partir de las condiciones recomendadas o previamente determinadas. Variar la temperatura por encima de la atomización y por debajo de la temperatura recomendada, se sugiere hacerlo utilizando incrementos de 100°C o 200°C (67,68,69).

Cabe señalar que, debido a la distribución uniforme de la temperatura en el horno, las temperaturas en fase de gas son más altas y, en consecuencia, la eficiencia de atomización. Por esta razón, no son necesarias altas temperaturas de atomización, de este modo rara vez es necesaria una temperatura mayor a 2500°C (67,68,69).

La potencia máxima de tasa de calentamiento (tiempo rampa cero) es seleccionado para el paso de atomización. Seguida de la supresión de gas, con el fin de mantener los átomos volatilizados en el camino de la radiación durante el mayor tiempo posible, la purga de gas se fija en cero mL/min para el paso de atomización. Además, detener el flujo de gas permite un enfoque más cercano al equilibrio térmico (67,68,69).

9.4.4. Limpieza

Se recomienda una limpieza de salida de 2400°C a 2500°C durante 3 segundos normalmente. Si el paso de limpieza es demasiado corto o demasiado frío algunas muestras residuales podrán continuar en el tubo e interferir con la consiguiente atomización. La presencia de cualquier residuo de muestra se puede comprobar ejecutando una atomización en blanco, después del paso de limpieza. Tomando en cuenta que una limpieza superior a 2550°C durante largos períodos de tiempo (> 5 segundos) puede disminuir la vida del tubo de grafito (67,68,69).

10. PRUEBAS DE DESEMPEÑO EN MÉTODOS ANALÍTICOS

Cuando se tiene interés en medir un componente en una muestra, es necesario contar con una metodología de medición cuyo límite de cuantificación sea el adecuado (método analítico). Por ello las empresas de transformación requieren de este tipo de metodologías, dedicando tiempo para su desarrollo, partiendo del hecho de que deben cumplir el atributo de confiabilidad, para alcanzar este atributo, es necesario llevar a cabo en la mayoría de las ocasiones estudios experimentales que permitan demostrar la confiabilidad de lo que se está midiendo. Un proceso que permite cumplir este fin es el de la validación (74).

La validación determina lo apropiado de un análisis para proveer la información deseada. La validación puede aplicarse a muestras y metodologías, la validación de muestras tiene como fin aceptar a las muestras como miembros de la población en estudio, admitir las muestras para las medidas, establecer la autenticidad de las muestras y decidir si es necesario un nuevo muestreo (63).

Hoy en día los laboratorios deben demostrar que sus métodos analíticos proporcionan resultados confiables y adecuados para la finalidad y propósito para el que ha sido diseñado, ya que muchas de las decisiones que se toman, están basadas en la información que estos datos proporcionan (63).

La validación de la metodología analítica, junto a otras actividades englobadas en el control del aseguramiento de la calidad, permite demostrar a los laboratorios que sus métodos analíticos proporcionan resultados fiables (63).

11. PARÁMETROS DE LA VALIDACIÓN

Exactitud: Concordancia entre un valor obtenido empleando el método y el valor de referencia.

Límite de Cuantificación: Concentración mínima del analito que puede ser detectada con precisión y exactitud, bajo las condiciones de operación establecidas.

Límite de Detección: Concentración mínima del analito en una muestra, que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones de operación establecidas.

Linealidad: Habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo determinado.

Método analítico: Descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra.

Precisión: Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto o de una referencia.

Repetibilidad: Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y método (74).

12. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

Métodos espectrofotométricos

- Precisión del sistema

CV \leq 3%.

- Linealidad del sistema

$r^2 \geq 0.93$.

IC(β_1), no debe incluir el cero.

- Exactitud y repetibilidad

IC(β_1), debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del 1% de recobro se incluya en el intervalo de 97-103%.

CV del porcentaje de recobro: no debe ser mayor de 3%.

- Linealidad del método

Cantidad adicionada vs cantidad recuperada

$r^2 \geq 0.98$.

IC(β_1), no debe incluir el cero.

IC(β_1), no debe incluir la unidad.

El CV xy del porcentaje de recobro, no debe ser mayor de 3%.

Porcentaje de recobro

El IC(μ) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del 1%de recobro se incluya en el intervalo: 97-103%. El CV no debe ser mayor de 3%.

- Precisión del método

CV \leq 3%.

- Limite de detección

Con base a la señal ruido

$r^2 \geq 0.98$.

El límite de detección debe ser menor a la especificación de la prueba de impurezas límite.

➤ Límite de cuantificación

Con base a la curva de calibración y la desviación estándar de la regresión:

$r^2 \geq 0.98$.

IC(β_1), no debe incluir el cero.

El límite de detección debe ser menor a la especificación de la prueba de impurezas límite (74).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido al crecimiento poblacional y la interacción cada vez más común de las zonas urbanas con las industriales, así como el uso de suplementos alimenticios a base de compuestos de cromo para el consumo humano, se debe implementar un método por el cual se pueda vigilar la concentración de este metal en el organismo humano.

El picolinato de cromo, una sustancia que, supuestamente, reduce la grasa corporal y que forma parte de muchos suplementos que toman algunos deportistas para aumentar su masa muscular se ha mostrado en cultivos de laboratorio que el picolinato de cromo es capaz de penetrar en las células, dañar el ADN y provocar mutaciones cancerígenas.

El picolinato de cromo tiene gran aceptación porque parece reducir los síntomas de enfermedades cardiovasculares y de la diabetes. Aunque, de momento, estos resultados no se han observado en animales, se recomienda precaución a la hora de consumir productos que lleven este elemento, ya que aún se desconocen las consecuencias que podría tener si se consume en periodos prolongados.

En el desarrollo experimental de este trabajo se pretendió optimizar y validar un método que sea exacto, preciso y reproducible, con el cual sea posible determinar la concentración de cromo presente en el suero y semen humano. La técnica se enfoca a la determinación de cromo de muestras de suero y semen provenientes de voluntarios sanos (hombres universitarios), los cuales consumieron picolinato de cromo como suplemento alimenticio, los resultados de estas determinaciones serán contrastados finalmente con los valores de concentración normales de cromo, evaluadas antes de la ingestión el suplemento por los voluntarios.

La técnica de Absorción Atómica por horno de grafito (GFAA) establece los límites de detección y cuantificación en el orden de $\mu\text{g/L}$ y pg/mL además de ser una técnica de alta especificidad para un grupo de alrededor de 60 a 70 elementos.

Dado que los límites de detección y cuantificación dependen de la sensibilidad del instrumento y a cada elemento en particular, la determinación experimental y la validación del método analítico se vuelven de vital importancia.

IV. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Establecer mediante la técnica de espectroscopia de absorción atómica por horno de grafito (GFAA) el método que permita cuantificar los niveles de concentración de cromo, presentes en semen humano, así como comprobar por medio del desarrollo y validación estadística, que el método cumple con los lineamientos estipulados para los que fue diseñado.

2. Objetivos particulares

- Establecer los límites de detección a nivel traza (ppb, $\mu\text{g/L}$) en el método analítico utilizando el instrumento de Absorción Atómica con horno de grafito y corrector de fondo Zeeman Perkin Elmer Sima A 6000.
- Establecer un programa óptimo de análisis para este instrumento.
- Desarrollar los parámetros estipulados para las pruebas de desempeño para el método analítico (Límite de detección y cuantificación, Linealidad y precisión del sistema, Linealidad y precisión del método para suero y semen así como la reproducibilidad) mediante el uso de modelos estadísticos.
- Establecer la concentración promedio de cromo en las muestras de plasma seminal empleando la técnica de Espectroscopia de Absorción Atómica por horno de grafito (GFAA) para muestras reales de los voluntarios del estudio.
- Determinar si existe diferencia significativa entre los valores de concentración promedio y los obtenidos en los voluntarios sometidos a la ingesta de picolinato de cromo durante el estudio.

V. HIPÓTESIS

El desarrollo y la implementación de los parámetros de validación de métodos analíticos para el método de Espectroscopia de Absorción Atómica por horno de grafito (GFAA), garantiza la confiabilidad de las determinaciones a realizar en suero y semen humano.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Selección de los individuos

Se reclutaron varones jóvenes entre 21 y 27 años de edad, a los cuales se les ingresó en el ensayo con base en los datos de la historia clínica y el análisis previo de muestras de semen que indicaron que son individuos sanos. Los varones se dividieron en dos grupos al azar, grupo 1 que ingirió dosis de 200 µg de picolinato de cromo y grupo 2 que ingirió dosis de 200 µg de L-carnitina como placebo. En ambos grupos la ingesta fue cada tercer día, durante 21 días.

2. Toma de muestras de semen

Se tuvo un periodo de abstinencia sexual de 3 a 4 días entre cada muestra de semen (OMS, 1999). Las muestras se obtuvieron por masturbación directamente en un envase de plástico estéril. De cada individuo se conto con muestras antes durante y después de la ingesta del complemento alimenticio o del placebo.

3. Especificaciones del método analítico

Con el fin de garantizar la confiabilidad y representatividad de los datos obtenidos en el estudio, éste se realizó considerando las siguientes especificaciones:

3.1. Condiciones instrumentales

- Modelo del instrumento: Perkin-Elmer SIMAA 6000 GFAA.
- Tubo de grafito transversal recubierto con carbón pirolítico Perkin-Elmer.
- Plataforma de L'Vov integrada al tubo de grafito.
- Corrector de fondo Zeeman.
- Lámpara de cátodo hueco Perkin Elmer Lumina para cromo.
- Línea de resonancia: 357.9 nm.

3.2. Reactivos

- Ácido nítrico suprapuro (65%) Merck.
- Agua bidestilada.
- Nitrato de Magnesio (solución 1%) Perkin Elmer.
- Solución de referencia de cromo (1000 µg/mL) Perkin Elmer.
- Tritón X-100 grado laboratorio, Sigma-Aldrich.
- Dextran.

3.3. Especificaciones de análisis

- Volumen de inyección total: 40 µL.
- Volumen de la muestra: 20 µL.
- Modificador de matriz: Nitrato de magnesio.
- Volumen del modificador de Matriz: 10 µL.
- Volumen de ácido nítrico al 5% como diluyente: 10 µL.
- Ecuación de calibración: Lineal con intercepto en el cero.
- Secuencia de Pipeteado: modificador de matriz+ muestra/estándar+ diluyente.

3.4. Validación del método analítico

3.4.1. Precisión del sistema

Se prepararon por sextuplicado, soluciones a una concentración de 1 µg/L por el método de dilución a partir de una Solución de Referencia de 1000 µg/mL, posteriormente se midió la respuesta analítica bajo las condiciones establecidas anteriormente para el horno de grafito.

Se realizó el cálculo de, S y CV con las fórmulas correspondientes (Anexo 3) y tomando en cuenta los criterios de aceptación.

3.4.2. Linealidad del sistema

Se prepararon por triplicado 5 niveles de concentración (0.25, 0.5, 1, 1.5, 2 µg/mL) por el método de diluciones a partir de una Solución de Referencia de 1000 µg/mL, posteriormente se midió la respuesta analítica bajo las condiciones establecidas anteriormente para el horno de grafito, se establecieron estos niveles de concentración esperando variaciones significativas en la concentración de cromo en las matrices biológicas.

Se realizó el cálculo del valor de la pendiente (b_1), la ordenada al origen (b_0), el coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(b_1)$), con las fórmulas correspondientes (Anexo 3)

3.4.3. Exactitud del método analítico

Como los componentes de las matrices a analizar no eran conocidos y por ende no era posible preparar un placebo analítico con la misma composición de las muestras, se procedió a determinar con el método analítico la concentración de cromo presente en una muestra de la matriz biológica, una vez conocida la concentración se prepararon 6 muestras adicionadas del analito con una solución con concentración de $1\mu\text{g/mL}$, finalmente se realizó el análisis de las muestras adicionadas y se determinó la cantidad recuperada del analito tomando como referencia la cantidad adicionada.

Se calculó el promedio aritmético (\hat{y}), la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media poblacional $IC(\mu)$ del porcentaje de recobro, con las fórmulas correspondientes (Anexo 3) ,se puede observar los cálculos especificados en el Anexo 2.

3.4.4. Linealidad del método analítico

Se analizó la muestra para determinar la concentración del analito presente en la misma, se prepararon tres niveles de concentración con muestras adicionadas por triplicado ($0.5, 1, 1.5\mu\text{g/mL}$), las muestras fueron analizadas por el mismo analista, posteriormente se determinó la cantidad recuperada del analito.

Se reporta la relación de cantidad adicionada vs cantidad recuperada, se calculó el valor de la pendiente (b_1), la ordenada al origen (b_0), el coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$), el intervalo de confianza para la ordenada al origen ($IC(\beta_0)$) y el coeficiente de variación de regresión (CV_{xy}), se calculó el porcentaje de recobro de cada muestra adicionada, y así se calculó el promedio aritmético (\hat{y}), la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media poblacional $IC(\mu)$ del porcentaje de recobro. Con las fórmulas correspondientes (Anexo 3) y tomando en cuenta los cálculos especificados (Anexo 2), además de realizar la respectiva gráfica para los datos obtenidos.

3.4.5. Límite de detección

Se determinó mediante la técnica de curva de calibración y la desviación estándar de los blancos preparando 3 concentraciones del analito por medio de diluciones ($0.25, 0.5, 1.0\mu\text{g/mL}$) y se prepararon 5 blancos a los cuales se les midió la respuesta analítica, posteriormente los datos obtenidos fueron verificados

empleando el método de señal ruido, se calculó el valor de la pendiente (b_1), el coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(b_1)$). Con las fórmulas correspondientes (Anexo 3) y tomando en cuenta los cálculos especificados (Anexo 2).

3.4.6. Limite de cuantificación

Se determinó mediante la técnica de curva de calibración y la desviación estándar de los blancos preparando 3 concentraciones del analito por medio de diluciones (0.25,0.5,1.0 $\mu\text{g/mL}$) y se prepararon 5 blancos a los cuales se les midió la respuesta analítica posteriormente los datos obtenidos fueron verificados empleando el método de señal ruido, se calculó el valor de la pendiente (b_1), el coeficiente de determinación (r^2), la desviación estándar de la regresión ($S_{y/x}$) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(b_1)$). Con las fórmulas correspondientes (Anexo 3) y tomando en cuenta los cálculos especificados (Anexo 2).

3.4.7. Precisión intermedia o reproducibilidad

Se analizó por triplicado en dos días diferentes y por dos analistas diferentes un nivel de concentración (1 $\mu\text{g/mL}$). Utilizando el mismo equipo (Perkin-Elmer SIMAA 6000 GFAA), con los mismas sustancias de referencia y las mismas condiciones del horno, se reportó el contenido del analito en todas las muestras y se calculó la media aritmética (\bar{y}), la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV). Con las fórmulas correspondientes (Anexo 3) y tomando en cuenta los cálculos especificados (Anexo 2)

4. Análisis estadístico

Los datos se expresaron como media \pm e.e.m. y se analizaron mediante el empleo del paquete estadístico GraphPad Insat 3, con el que se realizó una comparación de los datos entre los grupos de estudio (voluntarios testigo vs voluntarios con tratamiento de L-carnitina y voluntarios sometidos al tratamiento con picolinato de cromo) de las fases de estudio que comprendieron antes, durante y después del estudio con el suplemento alimenticio por medio de la prueba de U de Mann Whittney. Se consideró como estadísticamente significativo aquellas diferencias cuya probabilidad fue menor o igual al 0.05.

VII. RESULTADOS

1. Programa de calentamiento

Debido a que el cromo es un elemento refractario fue necesario establecer experimentalmente un programa de calentamiento con el fin de optimizar el método de cuantificación de cromo en muestras de semen y de suero sanguíneo, este programa es una modificación de las condiciones recomendadas por el fabricante del instrumento (Perkin-Elmer), donde solo se consideran muestras en solución acuosa con una matriz simple, sin embargo cuando se trata de fluidos biológicos la matriz es compleja con una gran cantidad de moléculas orgánicas. La cuantificación de cromo (entre otros elementos traza) en semen y suero representa un verdadero reto analítico, debido a la baja concentración y a la complejidad de la matriz,

Especificaciones del programa de análisis experimental para el horno de grafito (Tabla 2) establecido en las determinaciones de cromo.

Tabla 2. Condiciones experimentales para la cuantificación de cromo en horno de grafito.

Etapa	Temp. (°C)	Tiempo de Rampa (seg)	tiempo de seguridad(seg)	gas interno	Tipo de gas	Lectura
1	130	8	40	250	normal	-
2	400	15	30	250	normal	-
3	1300	15	20	250	normal	-
4	20	1	10	250	normal	-
5	2450	0	5	0	normal	x
6	2600	2	3	250	normal	-
Temperatura de Inyección (°C)						20

x. Lectura de la muestra en el paso de atomización.

En la Figura 11 se presentan gráficamente los pasos del programa establecido para las determinaciones de cromo en suero y semen humano.

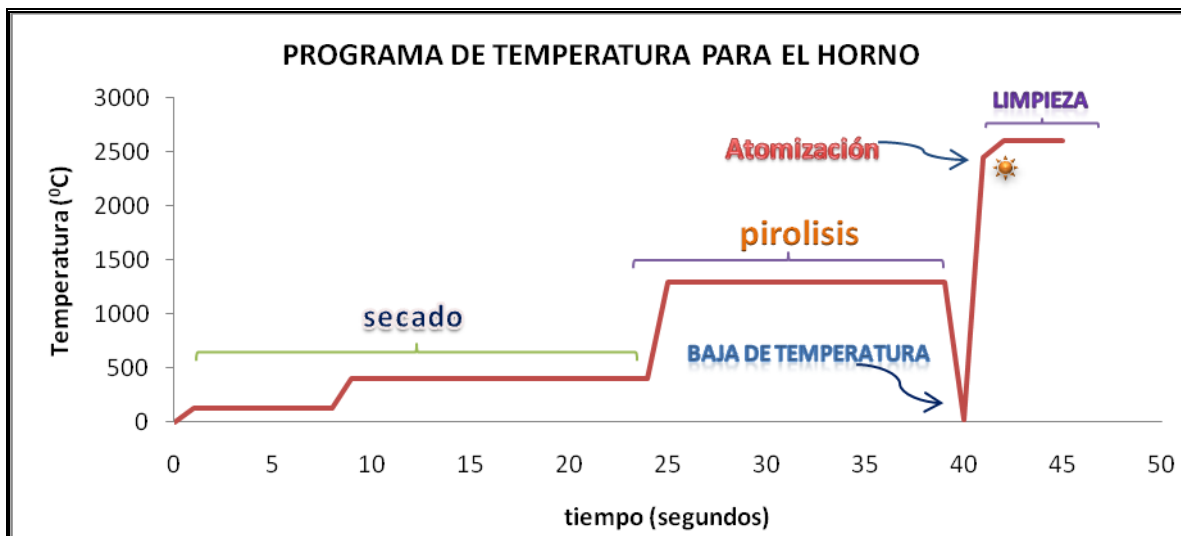


Figura 11. Etapas del programa de calentamiento para la cuantificación de cromo en semen y suero por horno de grafito.

Secado

Esta etapa fue dividida en dos pasos caracterizados por un incremento de temperatura con el fin de evaporar los elementos más volátiles de la matriz biológica, de forma paulatina, evitando así que la misma se proyecte o chisporrotee dentro del tubo generando posibles variaciones.

Pirolisis o calcinación

En este punto se ha asegurado la evaporación total de el/los solventes presentes en la matriz así como de los compuestos volátiles, la muestra es calcinada a una temperatura de 1300°C, eliminando así la materia orgánica presente en la muestra.

Disminución de temperatura a 20°C (baja de temperatura).

En este punto la temperatura desciende a 20°C con el paso de Argón con la finalidad de eliminar cualquier tipo de interferencia producida por el desprendimiento de gases o vapores producidos durante la pirolisis, quedando en este punto la muestra lista para la atomización.

Atomización

En este punto las muestras fueron calentadas a 2450°C, dicha temperatura resultó ser la óptima, con la cual se asegura la atomización del metal y la obtención de la lectura de absorbancia.

Limpieza

La temperatura de limpieza se estableció en 2600°C, el incremento de temperatura en este punto es crucial pues se debe asegurar la completa remoción de el analito evitando posibles lecturas erróneas por memoria física, esto sin llegar a condiciones extremas de temperatura que pudiesen deteriorar el tubo de grafito.

Corrección de fondo mediante el efecto Zeeman

Mediante el empleo de un corrector de fondo Zeeman se logra la eliminación de la absorción de fondo, debido principalmente a restos de los componentes orgánicos e inorgánicos presentes en la matriz, en el análisis de las muestras, tanto acuosas como biológicas, este efecto se observa claramente en la Figura 12.

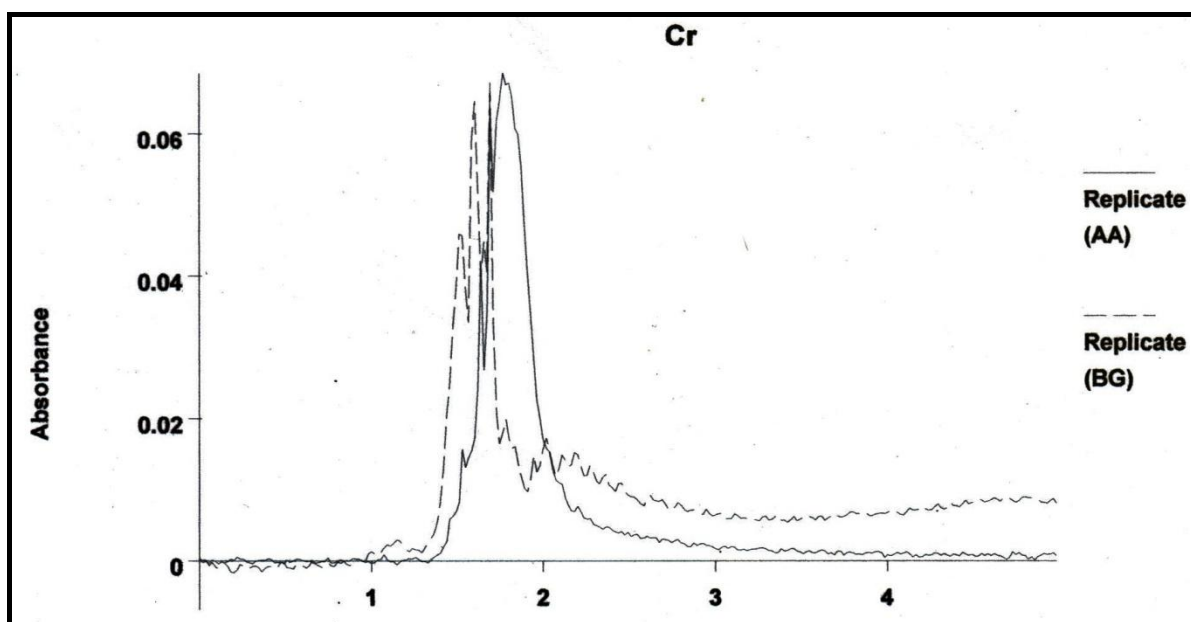


Figura 12. Corrección de fondo utilizando el efecto Zeeman.

En el cual se observa la resta automática que realiza el instrumento, de la señal de ruido (BG) con respecto a la respuesta del analito logrando obtener solo la respuesta y cuantificación del analito.

2. Contenido de cromo en muestras de semen

El contenido de cromo se determinó mediante la técnica de absorción atómica por horno de grafito utilizando un corrector de fondo con efecto Zeeman, además se utilizó $Mg(NO_3)$ como modificador de matriz tanto para la inyección de los estándares como para la inyección de las muestras en el instrumento, cada muestra fue analizada por duplicado.

En la Tabla 3, se observan los resultados obtenidos para los grupos de L-carnitina y el grupo de individuos con tratamiento de picolinato de cromo, agrupados de acuerdo a las fechas en que fueron colectadas las muestras.

Tabla 3. Valores de concentración de Cr ($\mu\text{g/L}$) obtenidos en el semen de cada voluntario en las diferentes fechas del estudio

		ANTES DEL TRATAMIENTO (11 días)		DURANTE EL TRATAMIENTO (21 días)				DESPUES DEL TRATAMIENTO (8 días)		
		07/04/2008	18/04/2008	21/04/2008	28/04/2008	05/05/2008	07/05/2008	12/05/2008	16/05/2008	
TIPO DE TRATAMIENTO	VOLUNTARIO	día 1	día 8	día 3	día 10	día 19	día 21	día 3	día 7	
PLACEBO	L-Carnitina	4	0.213	0.195	0.212	0.179	0.192	0.205	0.196	0.208
	L-Carnitina	8	0.2	0.2	0.199	0.197	0.201	0.2	0.196	0.193
TRATAMIENTO	Cr(Pic) ₃	3	0.205	0.211	0.373	0.992	1.054	0.977	0.427	0.297
	Cr(Pic) ₃	5	0.175	0.2	0.381	0.411	0.433	2.513	0.681	0.614
	Cr(Pic) ₃	9	0.195	0.198	0.771	1.321	1.578	2.018	0.549	0.403
	Cr(Pic) ₃	10	0.155	0.224	0.698	1.094	1.343	1.411	0.638	0.457
	Cr(Pic) ₃	13	0.193	0.205	0.259	0.49	0.516	0.614	0.226	0.223
	Cr(Pic) ₃	17	0.164	0.176	0.395	1.382	1.594	1.524	1.159	0.655
	Cr(Pic) ₃	18	0.276	0.224	0.708	0.921	0.986	0.842	0.639	0.476
	Cr(Pic) ₃	19	0.18	0.214	0.515	0.922	1.053	1.069	0.684	0.575
	Cr(Pic) ₃	20	0.257	0.28	1.042	1.382	5.308	3.044	0.481	0.205
Cr(Pic) ₃	21	0.183	0.219	0.448	1.142	1.306	1.086	0.653	0.448	

En la Figura 13 observamos los datos de la tabla representados por un diagrama de dispersión en el cual podemos observar la variabilidad de la concentración de cromo en el semen de cada uno de los individuos sometidos al tratamiento, esto atribuible que cada organismo responde de manera diferente a la estimulación y almacenamiento del metal, durante el estudio no se llevó a cabo una dieta rigurosa, por lo que las diferencias en alimentación entre los individuos puede jugar un papel fundamental en dicha variabilidad.

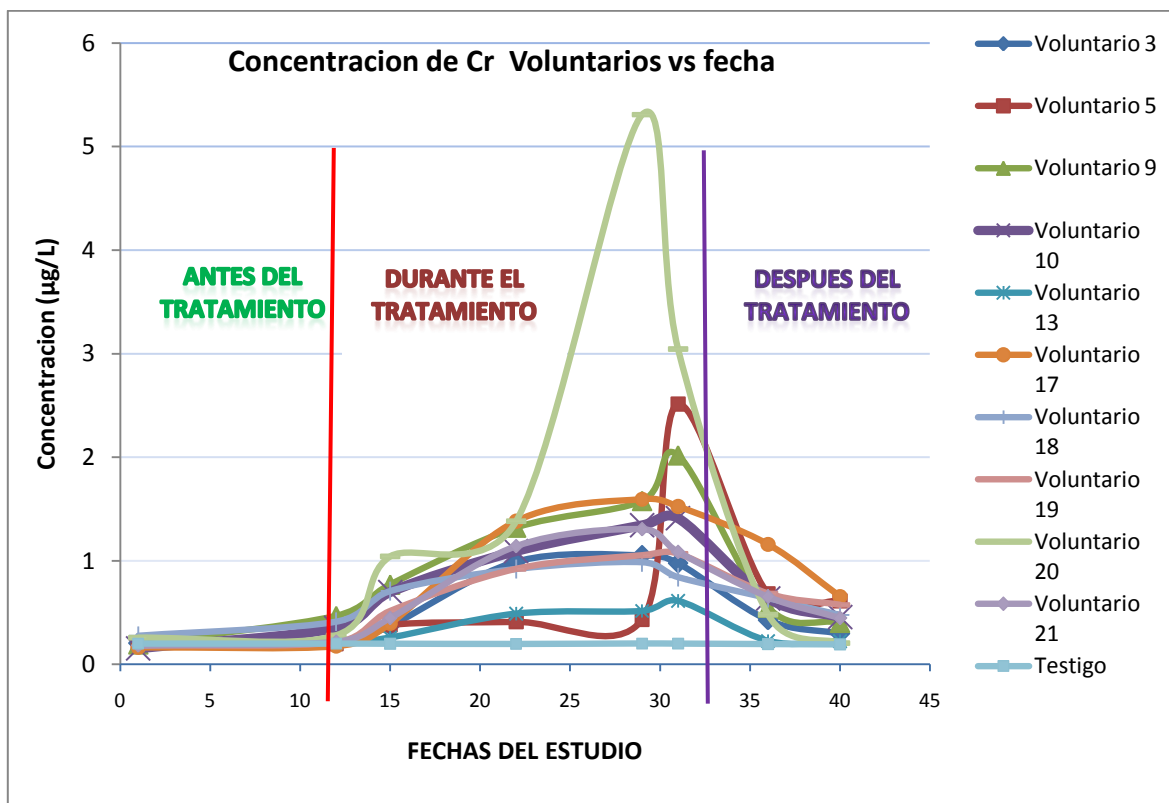


Figura 13. Gráfica de dispersión para los valores individuales en las diferentes fechas de ingesta de 200 µg del suplemento.

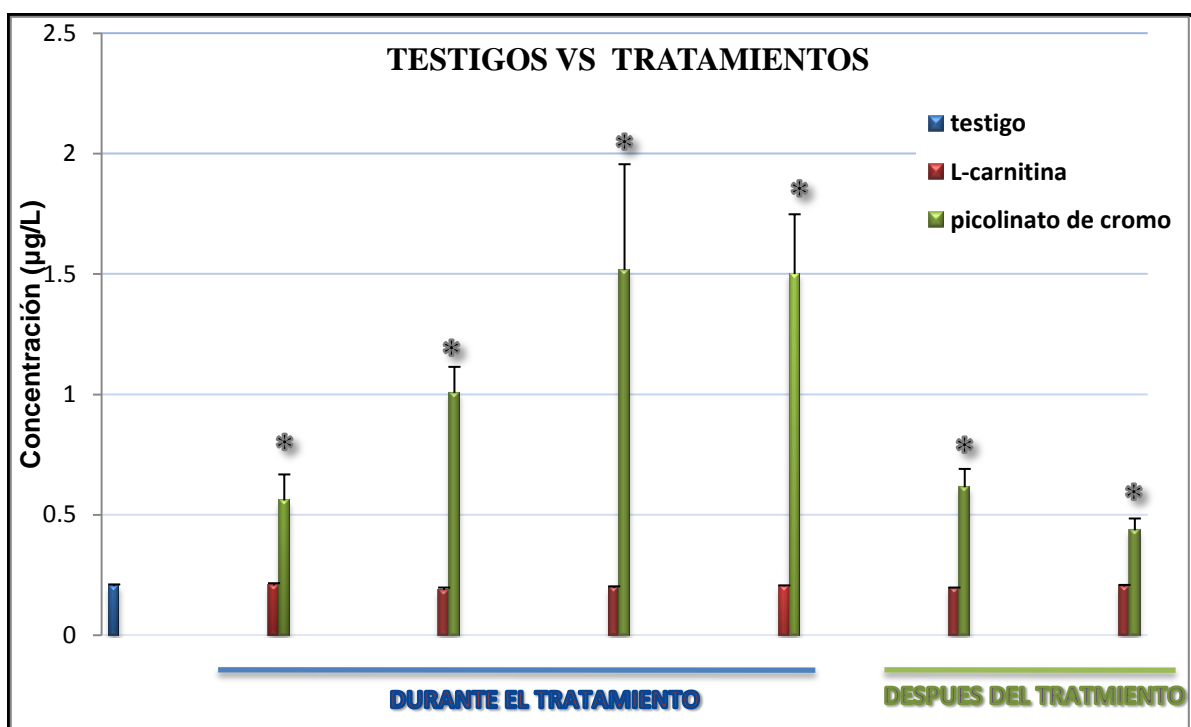
En la Tabla 4, se muestran las medias poblacionales por fecha para los dos grupos de estudio pudiéndose observar de forma consistente los cambios en las concentraciones de cromo en los individuos con tratamiento en contraste con los valores testigo así como los voluntarios expuesto a L-carnitina.

Tabla 4. Valores de concentración ($m \pm e.e.m$) poblacional de cromo en el semen de testigos y voluntarios sometidos a la ingesta de 200 $\mu\text{g}/\text{día}/21$ días de picolinato de cromo y L-carnitina.

NIVELES DE CONCENTRACIÓN DE CROMO EN SEMEN ($\mu\text{g}/\text{L}$).							
SIN TRATAMIENTO (TESTIGO)	TRATAMIENTO CON:	DURANTE EL TRATAMIENTO				DESPUÉS DEL TRATAMIENTO	
0.204 \pm 0.006 n= 24	L-carnitina n= 2	0.206 \pm 0.006	0.188 \pm 0.009	0.197 \pm .005	0.203 \pm .003	0.196 \pm .001	0.201 \pm .007
	Cr(Pic) ₃ n= 10	0.559 \pm 0.076	1.006 \pm 0.108	1.517 \pm 0.439	1.510 \pm 0.248	0.614 \pm 0.076	0.435 \pm 0.049

n = Número de muestra

De igual modo se presentan en la Figura 14, los datos de la tabla anterior mediante el uso de un gráfico de barras, en el cual se observan incrementos de concentración del metal en la población en estudio sometida al tratamiento con picolinato de cromo teniendo un máximo de concentración en el día 18 del periodo de tratamiento con picolinato de cromo con una concentración de $1.517 \pm 0.248 \mu\text{g/L}$ y un posterior decremento de las concentraciones donde se observa que existe diferencia significativa entre los valores de concentración testigo y las fechas posteriores a la suspensión del tratamiento, así mismo se aprecia que no existe diferencia significativa entre los valores testigo con los correspondientes a la L-carnitina.



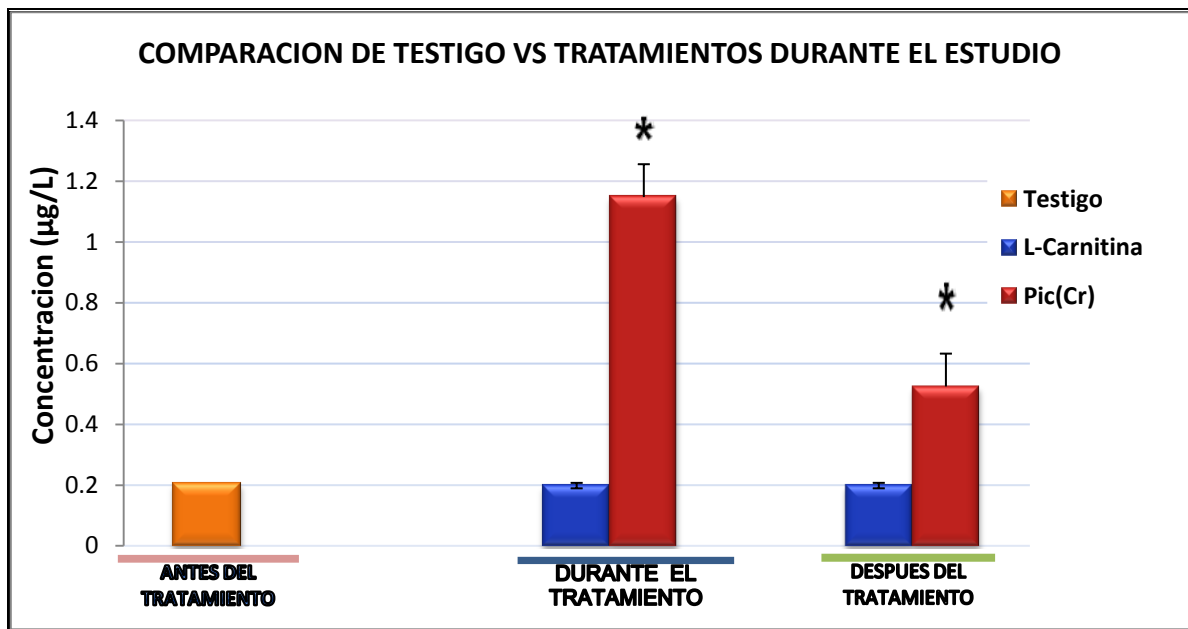
*Cr(Pic)₃ p <0.05 vs Testigo y L-carnitina correspondiente.

Figura 14. Comparación de los testigos con los valores poblacionales de concentración de cromo en semen para ambos grupos de estudio en las diferentes fechas de análisis.

En la gráfica de barras (Figura 15) los datos están agrupados en los tres periodos en los que se dividió el estudio, mediante el uso del promedio de medias de los testigos vs los voluntarios sometidos al tratamiento, además se hizo uso de la representación gráfica del error típico, para ambas poblaciones en estudio.

En este se observa claramente el contraste entre ambos grupos entre testigo y los que ingirieron el placebo de L-carnitina no se aprecia diferencia significativa en las concentraciones de cromo, mientras que entre los voluntarios que ingirieron

picolinato de cromo comparado con L-carnitina se observa diferencia significativa tanto durante el tratamiento como una vez suspendida la ingesta del mismo.



*Cr(Pic)₃ p <0.05 vs Testigo y L-carnitina correspondiente.

Figura 15. Diagrama de barras para los valores poblacionales de los tres periodos de estudio (antes, durante y después del tratamiento), donde se observan los errores típicos para cada periodo.

Así mismo en la Figura 16 podemos observar la distribución y dispersión de los datos concernientes a los valores testigo y los obtenidos para picolinato de cromo en las distintas fechas del estudio mediante el uso de diagramas de caja y bigote, en los cuales se exhibe una gran variabilidad en las concentraciones de cromo en semen del grupo de picolinato de cromo con respecto al testigo así como los valores por fecha entre si, esto por la diversidad de respuesta correspondiente para cada organismo, además de la falta de control en la dieta de los individuos sometidos al estudio.

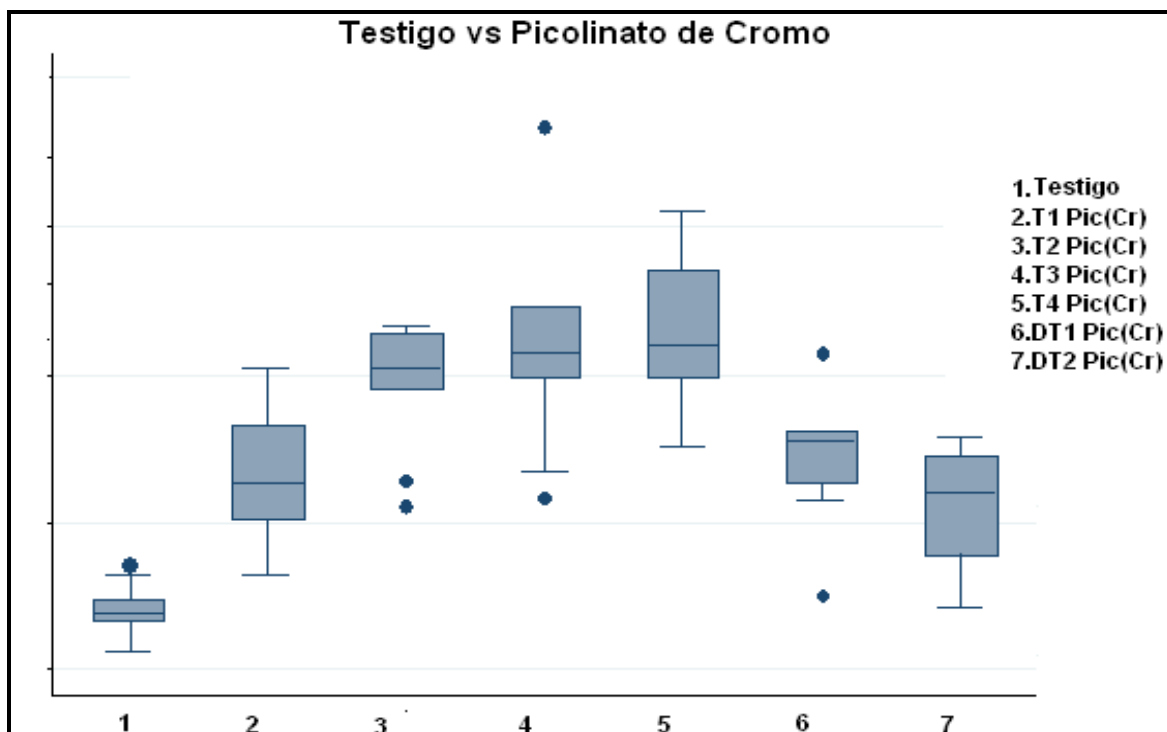


Figura 16. Diagrama de caja y bigote donde se observa la tendencia y distribución de los datos para los valores testigo vs tratamiento con picolinato de cromo.

Presumiblemente estos cambios en la concentración del cromo de los sujetos sometidos al estudio se debe a la absorción y almacenamiento del metal en semen y aunque se presenta un proceso de recuperación, caracterizado por la disminución paulatina de las concentraciones del metal nunca llega este a los valores iniciales, con los resultados obtenidos nos damos cuenta que hicieron falta probablemente uno o dos muestreos posteriores a la interrupción de la toma para así poder evaluar si efectivamente existe una recuperación del organismo o se trata de una mejora parcial a la exposición del metal.

3. Validación del método analítico

3.1. Precisión del sistema

Se realizó el análisis de la preparación de un sextuplicado de soluciones por el método de dilución obteniendo para cada una de ellas una concentración final de $1\mu\text{g/L}$.

Después de realizar el análisis de los datos obtenidos (Tabla 5) podemos observar que cumple con el criterio de aceptación, pues el valor obtenido para el coeficiente de variación (C.V) fue de 0.982%, el cual está dentro de la especificación cuyo límite es de un $C.V \leq 3$ con lo cual podemos aseverar que el método es preciso, es decir que existe concordancia entre las lecturas obtenidas individualmente.

Tabla 5. Datos de absorbancia obtenidos para la precisión del sistema.

Concentración ($\mu\text{g/L}$)	Absorbancia
1.0	0.0519
1.0	0.0531
1.0	0.0522
1.0	0.0521
1.0	0.0531
1.0	0.0525

CV= 0.982

3.2. Linealidad del sistema

Los datos obtenidos después de analizar cinco niveles de concentración por triplicado, están agrupados por concentración y sus respectivas replicas con el fin de facilitar su manejo (Tabla 6). Al realizar el análisis de los datos se constata que el sistema presenta linealidad pues cumple con los criterios de aceptación, con una r^2 de 0.990, además el intervalo de confianza (IC) para la pendiente no incluye el cero (Tabla 12), demostrando así la proporcionalidad de las concentraciones en el rango establecido para la curva, del mismo modo se presenta la curva de linealidad (Figura16) con las concentraciones utilizadas.

Tabla 6. Datos de absorbancia obtenidos para la linealidad del sistema.

Concentración ($\mu\text{g/L}$)	Absorbancia
0.25	0.0151
0.25	0.0133
0.25	0.0125
0.5	0.0261
0.5	0.0210
0.5	0.0297
1.0	0.0552
1.0	0.0531
1.0	0.0522
1.5	0.0854
1.5	0.0884
1.5	0.0817
2.0	0.1080
2.0	0.1096
2.0	0.1014

$r^2 = 0.991$, LIC= 0.0513, LISC= 0.057

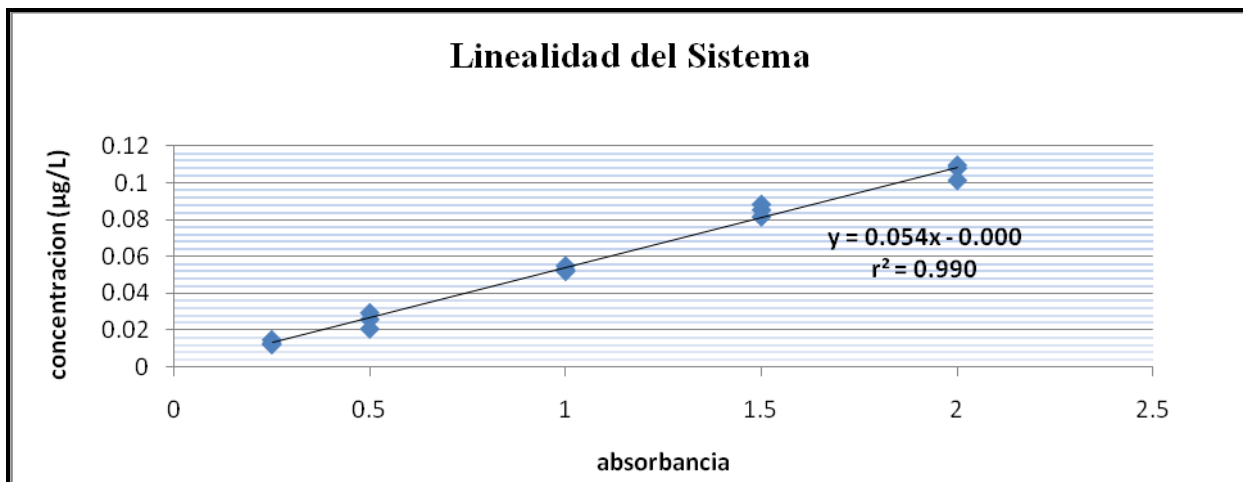


Figura 17. Gráfica para la linealidad del sistema.

3.3. Limite de detección y cuantificación

Tanto el límite de detección como el límite de cuantificación fueron determinados con el método de curva estándar, utilizando los valores de los blancos (Tabla 7) y posteriormente verificados por el método de señal ruido, ambas determinaciones están por debajo del valor mínimo utilizado en la curva estándar diseñada para el desarrollo del estudio, esto refleja la alta sensibilidad del instrumento además de verificar la fiabilidad de los datos pues ambos están lejos de los criterios de rechazo.

Tabla 7. Valores de los blancos utilizados para el cálculo de limite de detección y cuantificación.

BLANCOS	Y
1	0.0016
2	0.0014
3	0.0011
4	0.0012
5	0.0013

Limite de detección= 0.0036

Limite de cuantificación= 0.012

3.4. Parámetros de validación para el método en suero

Exactitud del método

Se realizó un sextuplicados de muestras biológicas adicionadas con una concentración de estándar de 1 µg/mL (Tabla 8), los resultados muestran que existe concordancia entre los datos obtenidos además se cumplen los criterios de aceptación ya que el CV (Tabla 13) es menor al establecido por su especificación por lo tanto se concluye que no existe interferencia en las determinaciones por parte de la matriz biológica.

Tabla 8. Valores obtenidos para la exactitud del método en, la que se observan los porcentajes de recobro obtenidos.

MUESTRA	CANTIDAD ADICIONADA (µg/L)	CANTIDAD RECUPERADA (µg/L)	% RECOBRO (Y)
1	1.0	0.998	99.80
2	1.0	0.993	99.30
3	1.0	1.022	102.20
4	1.0	1.001	100.10
5	1.0	1.023	102.30
6	1.0	1.021	102.10

$\hat{y} = 100.967$
CV = 1.363%

Linealidad del método

Para cantidad adicionada vs cantidad recuperada en la Tabla 9 se presentan los resultados obtenidos de cromo en las muestras de suero, donde el coeficiente de determinación es superior a 0.98, el IC(β_1) incluye la unidad, el IC(β_0) incluye el cero y el CV es menor a 3, de igual manera se observa que para el porcentaje de recobro el promedio aritmético de los datos se encuentra dentro del IC establecido, además su CV es menor a 3, como se muestra en la Tabla 12.

Estos criterios de aceptación son para un método espectrofotométrico, por lo tanto no existe interacción de la matriz con las determinaciones realizadas, teniendo así un método lineal el cual demuestra que las concentraciones obtenidas son proporcionales dentro del intervalo de interés en que son analizadas las muestras.

Tabla 9. Resultados de la linealidad del método para suero donde se observan, los porcentajes de recobro obtenidos para las determinaciones.

Placebo	Adicionado	Recuperado	Recobro(z)
	($\mu\text{g/L}$)	($\mu\text{g/L}$)	%
1	0.5	0.512	102.40
2	0.5	0.515	103.00
3	0.5	0.509	101.80
4	1.0	1.023	102.30
5	1.0	1.011	101.10
6	1.0	1.037	103.70
7	1.5	1.509	100.60
8	1.5	1.534	102.27
9	1.5	1.525	101.67

Adicionado vs Recuperado:

$r^2 \geq 0.999$

CV= 1.020

% Recobro:

$\hat{Y} \% \text{ recobro} = 102.092$

CV= 0.9198

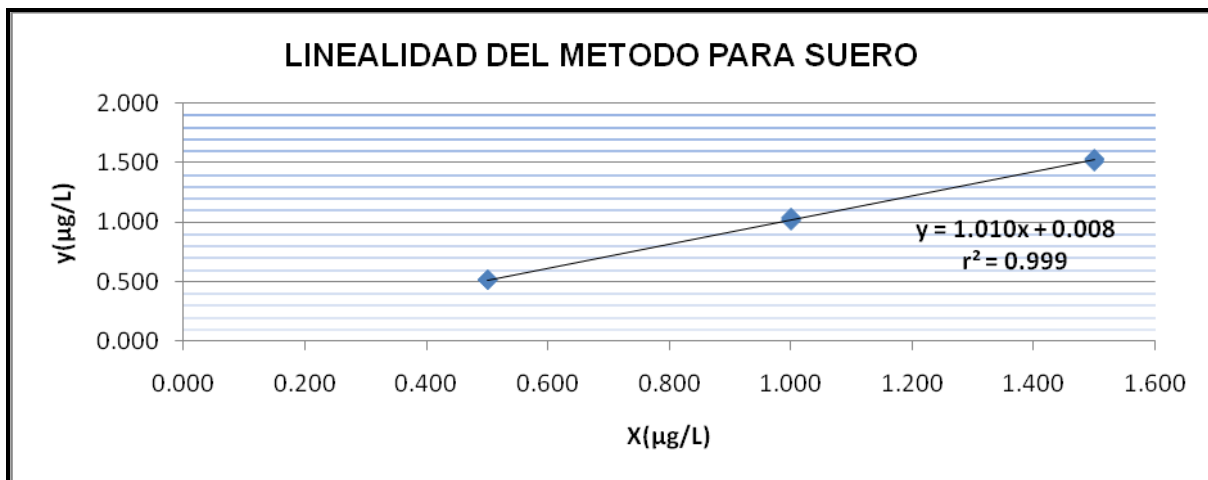


Figura 18. Gráfica para la linealidad del método para suero

3.5. Parámetros de validación para el método en semen

Exactitud del método

Se realizó un sextuplicado de muestras biológicas adicionadas con una concentración de estándar de 1 µg/mL (Tabla 9), los resultados muestran que existe concordancia entre los datos obtenidos por lo tanto presenta exactitud ya que el CV es menor al establecido por la especificación por lo tanto se concluye que no existe interferencia en las determinaciones por parte de la matriz biológica (Tabla 12).

Tabla 10. Valores de concentración y % de recobro obtenidos para la exactitud del método.

Placebo	Adicionado	Recuperado	Recobro
	µg/L	µg/L	%
1	1.0	1.053	105.30
2	1.0	1.070	107.00
3	1.0	1.065	106.50
4	1.0	1.061	106.10
5	1.0	1.057	105.70
6	1.0	1.077	107.70

$$\hat{y} = 106.383$$

$$CV = 0.825$$

Linealidad del método para semen

En la Tabla 11 se presentan la cantidad adicionada vs cantidad recuperada el coeficiente de determinación es superior a 0.98, el $IC(\beta_1)$ incluye la unidad, el $IC(\beta_0)$ incluye el cero y el CV es menor a 3, de igual manera se observa que para el porcentaje de recobro el promedio aritmético de los datos se encuentra dentro del IC establecido, además su CV es menor a 3, de igual modo se presenta la gráfica correspondiente para estos datos (Figura 19).

Todos estos criterios de aceptación son para un método espectrofotométrico, por lo tanto no existe interacción de la matriz con las determinaciones realizadas, teniendo así un método lineal el cual demuestra que las concentraciones obtenidas son proporcionales dentro del intervalo de interés en que son analizadas las muestras.

Tabla 11. Resultados obtenidos en la las determinaciones para la linealidad del método

Placebo	Adicionado	Recuperado	Recobro(z)
	($\mu\text{g/L}$)	($\mu\text{g/L}$)	%
1	0.5	0.501	100.20
2	0.5	0.520	104.00
3	0.5	0.514	102.80
4	1.0	1.034	103.40
5	1.0	1.023	102.30
6	1.0	1.019	101.90
7	1.5	1.501	100.07
8	1.5	1.503	100.20
9	1.5	1.510	100.67

Adicionado vs Recuperado:

$r^2= 0.999$

$CV= 1.145$

% Recobro:

$\hat{y}\%_{\text{recobro}}= 101.725$

$CV= 1.475$

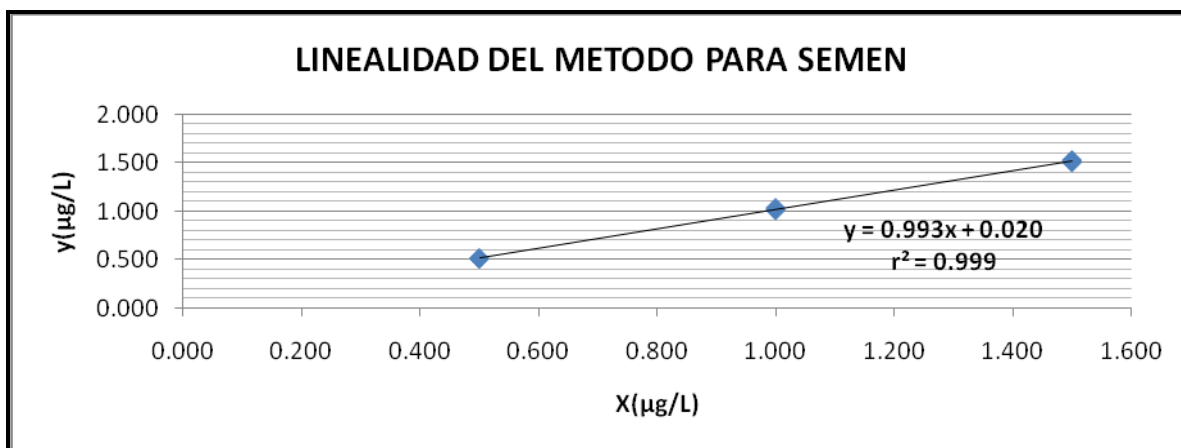


Figura 19. Gráfica correspondiente para la linealidad del método para semen.

3.6. Precisión intermedia o reproducibilidad

Los resultados obtenidos por el análisis muestran la existencia de concordancia entre los datos individuales (Tabla 11), no importando el día o el analista, con base en el CV menor a 3% se demuestra (Tabla 12) que se trata de un método ampliamente reproducible y en el cual no existe interferencia significativa ni variaciones por parte del analista.

Tabla 12. Valores obtenidos para reproducibilidad para 2 analistas en 2 días diferentes (µg/L)

		Analista	
		1	2
Día	1	0.998	0.993
		1.012	1.011
		1.034	1.004
	2	0.996	0.995
		1.007	0.998
		1.012	1.002

CV= 1.127

Resultados de la validación

Tabla 13. Resultados obtenidos para la validación del método analítico.

PARÁMETRO	VALOR EXPERIMENTAL		CRITERIO DE ACEPTACIÓN
LÍMITE DE DETECCIÓN	0.0036		
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	0.012		
PRECISIÓN DEL SISTEMA	CV= 0.982%		CV ≤ 3%
LINEALIDAD DEL SISTEMA	$r^2 = 0.991$		$r^2 \geq 0.98$
	LIC= 0.0513	LSIC= 0.0576	IC(β_1) No debe incluir el 0
PRECISIÓN DEL MÉTODO PARA SUERO	$\hat{y} = 100.967$		$\hat{y} =$ dentro del IC(μ) (99.406-102.512)
	CV= 1.363%		CV ≤ 3%
LINEALIDAD DEL MÉTODO PARA SUERO	Adicionado vs Recuperado		Adicionado vs Recuperado
	$r^2 \geq 0.999$		$r^2 \geq 0.98$
	LIC= 0.99	LSIC= 1.031	IC(β_1) Debe incluir la unidad
	LIC= -0.012	LSIC= 0.023	IC(β_0) Debe incluir el cero
	CV= 1.020		CV % de recobro ≤ 3%
	% Recobro		% Recobro
	$\hat{y}_{\% \text{ recobro}} = 102.092$		$\hat{y}_{\% \text{ rec}} =$ dentro del IC(μ)(101.370-102.814)
	CV= 0.9198		CV % de recobro ≤ 3%
PRECISIÓN DEL MÉTODO PARA SEMEN	$\hat{y} = 106.383$		$\hat{y} =$ dentro del IC(μ) (105.389-107.318)
	CV= 0.825		CV ≤ 3%
LINEALIDAD DEL MÉTODO PARA SEMEN	Adicionado vs Recuperado		Adicionado vs Recuperado
	$r^2 = 0.999$		$r^2 \geq 0.98$
	LIC= 0.971	LSIC= 1.015	IC(β_1) Debe incluir la unidad
	LIC= -0.003	LSIC= 0.045	IC(β_0) Debe incluir el cero
	CV= 1.145		CV % de recobro ≤ 3%
	% Recobro		% Recobro
	$\hat{y}_{\% \text{ rec}} = 101.725$		$\hat{y}_{\% \text{ rec}} =$ dentro del IC(μ)(100.57-102.88)
	CV= 1.475		CV ≤ 3%
REPRODUCIBILIDAD	CV= 1.127		CV ≤ 3%

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el año de 1993, Mertz *et al* describen las dificultades existentes para la cuantificación de cromo y lo define como un elemento de difícil cuantificación por los métodos analíticos no específicos, como es el caso de métodos colorimétricos empleados anteriormente (53).

En 1994, Granadillo *et al*, coinciden con Mertz *et al*, en cuanto a la dificultad de cuantificar cromo en los valores de concentración presentes en los sistemas biológicos, sobre la facilidad de contaminación, que puede presentarse a través del ambiente, durante la colecta de muestras, por el uso de material lavado inapropiadamente, por el uso de tapones de plástico con color para tubos de vidrio hechos a base de compuestos de cromo, así como el uso de agujas de acero inoxidable las cuales podrían contener cromo debido al proceso de elaboración del metal, de ahí la complejidad para lograr determinaciones confiables del metal cuya concentración en sistemas biológicos está presente en cantidades menores a 5 µg/L (54).

Lo anterior se ve reflejado en los diversos valores de concentración descritos como valores basales de cromo, estos dependen principalmente de la matriz y la técnica analítica usada para el análisis tal y como puede observarse en la Tabla 1 donde en 1971 Schroeder *et al*, utilizando un análisis de Espectrofotometría de Absorción Atómica en llama reporta valores de concentración basales de cromo de 28 µg/L, esto podría deberse a un control deficiente de la contaminación de las muestras y el empleo de un método de análisis optimo para la cuantificación de este elemento, sin embargo como puede observarse en la tabla, a pesar del paso del tiempo y el avance tecnológico aun sigue siendo difícil determinar las condiciones y el método de análisis óptimos para obtener con precisión y confiabilidad el nivel de concentración basal para cromo en diversas matrices biológicas.

Según Kayne *et al* en 1978 y Granadillo *et al* en 1994 el uso de la absorción atómica con horno de grafito y la corrección de fondo Zeeman resultan ser ideales para la cuantificación de cromo en eritrocitos y demás componentes sanguíneos. La Espectrofotometría de Absorción Atómica con horno de grafito es una de las técnicas específicas para la cuantificación de elementos traza con un amplio grado de precisión y confiabilidad (54,56).

Debido a que las muestras provenientes de fluidos biológicos, pueden contaminarse fácilmente, con cromo presente en el ambiente, se implemento un riguroso control en el manejo de las muestras de suero y semen para su posterior análisis.

En primer lugar la toma de muestra para suero y semen se efectuó, en frascos de polipropileno con tapones sin color, posteriormente el material destinado para la manipulación de las muestras biológicas, fue lavado y se dejó reposando en una solución de ácido nítrico suprapuro al 5 % durante 24 horas con la finalidad de eliminar la presencia de cromo en el material. Garantizando de esta manera la confiabilidad de las muestras, para su posterior análisis por la técnica de Absorción Atómica Electrotérmica, la cual resulta ser específica y altamente sensible para la cuantificación de cromo.

En el desarrollo del presente estudio se realizaron diversas pruebas para determinar las condiciones de análisis óptimas para el método analítico, con base en los resultados obtenidos se decidió modificar las condiciones de temperatura y los tiempos de rampa, sugeridos por la guía de operación del instrumento y por el programa de análisis propuesto por el fabricante, ya que éstos sólo están contemplados para soluciones acuosas, esto fundamentado en que la guía de operación, recomienda que en caso de ser necesario se deben optimizar las condiciones de análisis basándose en las características del analito (cromo) con el fin de obtener un método analítico que presente mayor eficiencia y precisión (67).

En primer instancia se decidió el uso del calentamiento paulatino antes de la pirólisis para lograr un secado eficiente y evitar que la matriz se proyectase en las paredes del tubo, posteriormente se estableció una temperatura de pirólisis de 1300°C menor a la preestablecida (1500°C), esto responde a la necesidad de disminuir bruscamente la temperatura a 20°C antes de la atomización, ya que al disminuir la temperatura a condiciones ambientales, se permite la eliminación de componentes volátiles (generación de vapor o humo) que pudiesen interferir con la lectura disminuyendo la precisión y confiabilidad de las determinaciones.

El uso de una temperatura de atomización alta (2450°C) con respecto a la establecida por el fabricante (2300°C), se debe a que el cromo es un elemento refractario que necesita una alta temperatura de atomización para poder así alcanzar su estado basal. En publicaciones hechas por Burguera *et al* y Granadillo describen al cromo como un elemento extremadamente estable a altas temperaturas por lo tanto es considerado como refractario con un punto de fusión de 1903°C, y un punto de ebullición de 2672°C lo que origina el uso de una temperatura alta en la atomización (3,54).

Según lo publicado por Cornelis en 1995, en el caso de las muestras biológicas el uso del tritón X-100 responde a la necesidad de reducir la viscosidad de la muestra, la sangre y demás fluidos biológicos se comportan de manera diferente a las soluciones de referencia acuosas y a las adicionadas con estándar (55). En el presente estudio se usó el tritón X-100 con la finalidad de minimizar la tensión

superficial y la viscosidad de las muestras, igualando de esta forma las condiciones de la matriz a las soluciones de referencia acuosas utilizadas para la calibración, además favoreció la correcta inyección de la muestra por el capilar del automuestreador del instrumento, evitando posibles variaciones en el volumen de inyección y por lo tanto en las determinaciones del analito.

En las publicaciones de Mertz en 1993 y la Compañía Varian en 2002, mencionan que los instrumentos con efecto Zeeman permiten una corrección de fondo más exacta, haciéndolos especialmente útiles en atomizadores electrotérmicos donde permiten la determinación directa de elementos en muestras biológicas como orina y sangre. En estas muestras la descomposición de la materia orgánica conduce al requerimiento de grandes correcciones de fondo y por consiguiente, a la posibilidad de disminuir errores significativos (53,70).

En 2001 Case *et al*, plantean que la corrección de fondo Zeeman resulta ser muy apropiada, siendo así este método el ideal para la cuantificación de cromo en los eritrocitos y demás componentes sanguíneos (57). De este modo el uso del corrector de fondo con efecto Zeeman elimina por completo las interferencias espectrales que pudiesen presentarse durante el análisis de cromo en fluidos biológicos, como es el caso del análisis de suero y semen.

El uso del modificador de matriz $Mg(NO_3)_2$, está ampliamente recomendado para favorecer la eliminación de matrices biológicas y estabilizar los analitos de interés evitando la pérdida de los mismos durante los distintos pasos de tratamiento en el horno, según lo publicado por la Compañía Perkin Elmer y Lagalante, los cuales coinciden en que el uso de modificadores de matriz es un complemento indispensable en la Absorción Atómica Electrotérmica, ya que con este se logra obtener condiciones de análisis eficientes (67,72,73).

Burguera *et al*. pública que el uso correcto del modificador de matriz promueve la formación de elementos más estables de cromo como es el caso del óxido de cromo (Cr_2O_3) el cual resulta ser un elemento más estable con un punto de fusión de $2435^\circ C$ y un punto de ebullición de hasta $3000^\circ C$ por tanto la muestra podría ser atomizada directamente después de la pirólisis sin correr riesgo de perder parte del analito (3,51). En este estudio el uso de un modificador de matriz tiene como principal objetivo estabilizar el analito logrando así la eliminación de los demás componentes de una matriz tan compleja como lo es el suero y el semen con la formación de un elemento altamente estable a temperaturas elevadas como lo es el Cr_2O_3 del cual se liberará el cromo en el paso de atomización.

Skoog *et al.* mencionan en su publicación que la validación tiene la función de determinar si un análisis es apropiado para proveer de manera confiable la información deseada, esto se aplica a muestras, metodologías y datos, teniendo como fin aceptar a las muestras como miembros de la población en estudio, admitir las muestras para las medidas, establecer la autenticidad de las muestras y decidir si es necesario un nuevo muestreo (63).

La Guía de Validación del Colegio de QFB menciona que cuando se tiene interés en medir un componente en una muestra, es necesario contar con una metodología de medición cuyo límite de cuantificación sea el adecuado (65). De este modo hoy en día los laboratorios deben demostrar que sus métodos analíticos proporcionan resultados fiables y adecuados para su finalidad y propósito perseguido (63).

Dada la diversidad de valores de concentración para cromo reportados por diferentes autores y la complejidad del análisis para este metal por sus características químicas y físicas, se deben establecer las condiciones de análisis así como un adecuado programa analítico para las muestras biológicas de suero y semen humano por el método de Absorción Atómica Electrotérmica con corrector Zeeman (ZGFAA), además se debe corroborar la confiabilidad y especificidad de dicho método y de este modo la confiabilidad de los datos obtenidos de este análisis, es ahí donde la validación del método analítico juega un papel fundamental.

Por tales motivos se decidió realizar la determinación de los parámetros típicos de la validación tanto para el sistema como para el método de análisis de cromo en suero y semen humano por ZGFAA, eliminando así por completo especulaciones sobre los valores de concentración obtenidos para el semen.

Para la determinación de cromo se encontró que el límite de detección fue de 0.0036 $\mu\text{g/L}$, esto resulta ser de gran importancia ya que describe la capacidad del instrumento y proporciona una forma de estimar la concentración mínima detectada del analito, diferenciándola así de las variaciones instrumentales. Para el método analítico se determinó un valor límite de cuantificación de 0.012 $\mu\text{g/L}$ utilizado para definir el rango mínimo para el método seleccionado, indicando de esta forma la mínima cantidad que puede ser cuantificada con precisión, en este caso el valor está por debajo de la concentración de cromo determinada por el instrumento para el analito, de este modo se asegura que las muestras fueron analizadas en un rango de concentración superior al límite de cuantificación, logrando así la confiabilidad de las mismas.

El sistema resultó ser lineal y preciso con base en los resultados están dentro de los criterios de aceptación establecidos para un método espectrofotométrico, además se observa que existe concordancia entre los resultados analíticos individuales y que los datos obtenidos tienen un comportamiento lineal dentro del rango establecido para la curva de calibración (0.25-2 $\mu\text{g/L}$).

Para la validación del método en suero se obtuvieron valores para la precisión de $CV= 1.363\%$ y $\hat{y}= 100.967$ (99.406-102.512) y para semen se obtuvieron valores de $CV= 0.825$ y $\hat{y}= 106.383$ (105.389-107.318), por este motivo se observa que los coeficientes de variación para ambos casos están dentro del límite de especificación, así como el promedio aritmético de los datos está dentro del intervalo de confianza establecido para ambos métodos, evidenciando así que se trata de un método preciso para ambas matrices biológicas.

De igual modo para la linealidad del método para suero y semen se obtuvieron valores que están dentro de los intervalos de confianza con lo cual se concluye que los datos presentan linealidad dentro del rango analítico establecido de (0.5 a 1.5 $\mu\text{g/L}$) y que bajo las condiciones de análisis establecidas, la matriz biológica no ejerce interacción con las determinaciones.

Los valores obtenidos para la reproducibilidad ($CV=1.127$) indica la capacidad del método para ser realizado varias veces y por diferentes analistas sin comprometer los datos por variaciones de los mismos siempre y cuando se lleve a cabo bajo las condiciones de análisis anteriormente establecidas.

Datos publicados por Bray *et al* y González *et al*, muestran que el uso de picolinato de cromo está en aumento por la población en general que trata de eliminar grasa mediante el consumo de este suplemento alimenticio sin conocer sus posibles efectos secundarios. Donde los posibles efectos benéficos buscados por los consumidores del suplemento de $\text{Cr}(\text{Pic})_3$ son mínimos o nulos en la mayoría de los casos y que en contraste se presenta la acumulación del metal en distintos órganos como es el caso del hígado y riñón (21,44).

El organismo al ser expuesto a la ingesta de picolinato de cromo tiene un comportamiento caracterizado por un rápido incremento de la concentración del metal en el semen, estos resultados son muy similares a los expuestos por National Research donde se afirma que el consumo de pequeñas cantidades de cromo no es tóxico sin embargo una sobreexposición del metal provoca una acumulación del mismo que podría tener efectos tóxicos para el organismo (42).

En la Tabla 4 se muestra que no existe diferencia significativa entre los valores testigo (antes de iniciar el tratamiento) con respecto a los obtenidos para los voluntarios que ingirieron L-carnitina, por lo tanto su ingesta no ejerce efectos sobre la concentración de cromo en el semen. Ya que los valores testigo corresponden a todos los individuos antes de iniciar el tratamiento con alguno de los suplementos alimenticios, son de mayor representatividad que los obtenidos para L-carnitina, por lo tanto se usaron como referencia para el análisis estadístico.

En el presente estudio se observa un rápido incremento de la concentración de cromo en las muestras de semen para los voluntarios tratados con picolinato de cromo, a partir de la primera muestra analizada dentro del periodo de tratamiento y se alcanza una concentración máxima en el día 18 del periodo de tratamiento con picolinato de cromo con una concentración de $1.517 \pm 0.248 \mu\text{g/L}$, mostrando un posterior decremento en la concentración de cromo en el semen una vez suspendida la ingesta del suplemento, esto podría deberse a la presencia de un periodo de recuperación caracterizado por la eliminación de metal por el organismo, sin embargo no se alcanza el valor de concentración testigo, presumiblemente hizo falta el análisis de por lo menos dos fechas más después de suspender la ingesta del picolinato de cromo.

Del mismo modo en la Figura 15 podemos observar la representación gráfica de los valores poblacionales durante las tres etapas del estudio (antes de la toma, durante el tratamiento, después del tratamiento) donde queda nuevamente de manifiesto que no existe diferencia significativa entre los valores testigos vs L-carnitina, en contraste los datos de los voluntarios sujetos al tratamiento con picolinato de cromo que presentan una gran variabilidad entre sí caracterizados por el error típico, así como una diferencia significativa con respecto a los valores de concentración testigo.

En el 2001 y 2004 Taylor y Suresh *et al* respectivamente encontraron que las membranas de los espermatozoides de los mamíferos son ricos en ácidos grasos polinsaturados, que los hacen muy flexibles, pero al mismo tiempo muy susceptibles a los radicales libres induciendo daño peroxidativo, disminuyendo la flexibilidad membranal (29,32,34).

En estudios realizados en el 2005 por Aruldas en monos expuestos a agua contaminada con Cr(VI), se observó que la intoxicación por cromo afecta a las células germinales en gran extensión del compartimiento adluminal, caracterizada por la disminución de la calidad espermática, de este modo los valores seminales normales en estos animales se observaron alrededor de los seis meses después

de haber sido suspendida la exposición, lo cual podría ser un indicio de recuperación (13,36).

En los datos publicados por Rosas en el 2009, analiza los parámetros seminales de las muestras biológicas utilizadas en el presente estudio y determina que la ingesta de picolinato de cromo no causa alteraciones en los volúmenes de eyaculado, sin embargo afecta dramáticamente los parámetros seminales de movilidad, ya que disminuyó por debajo de un 50%, la morfología espermática también resultó afectada caracterizada por el incremento de formas anormales con defectos de cabeza, pieza media y cola, de igual modo, se reporta un decremento en la cantidad de espermatozoides vivos durante la exposición al suplemento de cromo y una posible recuperación posterior a la interrupción del tratamiento (75). De este modo queda de manifiesto la relación de ingesta de cromo vs decremento en la calidad espermática, resultados que son apoyados por los obtenidos en el presente trabajo al mostrar el incremento en la concentración de cromo en las muestras de semen de los individuos sometidos a la ingesta de picolinato de cromo, causando un decremento en la calidad espermática lo cual se atribuye al fuerte potencial oxidante del cromo en las células lípidicas de los espermatozoides.

Los resultados obtenidos son de gran importancia ya que miles de personas se ven expuestas al cromo ya sea por una exposición ocupacional o por la ingesta de suplementos alimenticios que contienen picolinato de cromo u otro compuesto de este metal, sin tener conocimiento que esta exposición se caracteriza por un incremento en la concentración de cromo en el semen humano y que esta acumulación se correlaciona con daño en la calidad espermática.

Así mismo el diseño e implementación de un método de analítico óptimo es crucial para cualquier estudio, pues en él se soporta la confiabilidad de los resultados obtenidos, tal es el caso del análisis por Espectroscopia de Absorción Atómica con horno de grafito y corrector Zeeman, el cual comprobó mediante la validación que cumple con los lineamientos estipulados para los que se diseñó, garantizando así la confiabilidad de las determinaciones realizadas en las muestras de semen humano.

IX. CONCLUSIONES

- El método analítico de Absorción Atómica Electrotérmica por horno de grafito y el uso de un corrector de fondo Zeeman (ZGFAA), junto con un óptimo programa de atomización garantizan la confiabilidad de las determinaciones del analito (cromo) y disminuyen posibles interacciones espectrales.
- El método analítico de absorción Atómica por horno de Grafito con corrector de fondo Zeeman (ZGFAA) es altamente específico para el análisis de cromo.
- El uso del corrector de fondo Zeeman elimina por completo las posibles interferencias espectrales.
- Mediante el uso del $Mg(NO_3)_2$ como modificador de matriz se eliminan las posibles interferencias de matriz.
- Los resultados de la validación demuestran la confiabilidad del método analítico para las determinaciones de suero y plasma seminal humano.
- La suplementación con picolinato de cromo durante 21 días a individuos sanos en edad reproductiva ocasiona un incremento de las concentraciones normales del metal en semen lo que se correlaciona con la disminución de los diferentes parámetros seminales, viéndose afectada la calidad espermática.

X. PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES

- Cuantificar la concentración de cromo y los parámetros seminales en una población de varones expuestos crónicamente al suplemento alimenticio, los cuales pueden ser deportistas que han ingerido el suplemento durante meses e incluso años, esto con el fin de evaluar la repuesta y la posible recuperación a niveles normales de concentración del Cr en el organismo así como los valores seminales normales, esto en caso de que existiese tal recuperación.

- Se recomienda realizar el estudio en pacientes que presenten Diabetes Mellitus y poder contrastar los resultados con los de este estudio con el fin de establecer las diferencias en la absorción e impacto en los parámetros seminales de personas con una patología crónica degenerativa.

XI. REFERENCIAS

1. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Exposure to Chromium Occurs from Ingesting Contaminated Food or Drinking Water or Breathing Contaminated Workplace air. Chromium(VI) at High Levels can Damage the Nose and can Cause Cancer. Chromium has been found at 1,036 of the 1,591 National Priority List sites Identified by the Environmental Protection Agency (EPA). 2001.
2. Grijalva Haro MI, Ballesteros Vázquez MN, y Cabrera Pacheco RM. Contenido de Cromo en Alimentos y Estimación de su Ingestión Dietaria en el Noroeste de México. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 2001;51:110.
3. Burguera JL, Burguera M, Rondon C, Rodriguez L, Carrero P, Petit de Peña, et al. Determination of Chromium in Urine by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry using different Chemical Modifiers. Journal of Analytical Atomic Spectrometry. 1999;14:821-5.
4. Porter David J, Raymond Lawrence W, Anastasio Geraldine D. Chromium: Friend or Foe? American Medical Association. 2008;8:390.
5. Vincent John B. The Biochemistry of Chromium. Journal of Nutrition. 2000:715-8.
6. Dayan AD, and Paine AJ. Mechanisms of Chromium Toxicity, Carcinogenicity and Allergenicity: Review of the Literature from 1985 to 2000. Human & Experimental Toxicology. 2001;20:451.
7. Carlsen Elizabeth, Giwercman A, Keiding N, Sakakkebaek NE. Evidence for Decreasing Quality of Semen during past 50 years British Medical Journal of Nutrition. 1992;305:609-13.
8. Bonde JP, Ernst E. Sex Hormones and Semen Quality in Welders Exposed to Hexavalent Chromium. Hum Exp Toxicol. 1992 Jul;11(4):259-63.
9. WHO Regional Office for Europe. Chromium. 2000:14.
10. Nudler Silvana, Quinteros Fernanda, Miler Eliana, Cabilla Jimena, Ronchetti Sonia, Duvilanski Beatriz. Chromium VI administration Induces Oxidative Stress in Hypothalamus and Anterior Pituitary Gland from Male Rats. Toxicology Letters. 2009;185:187-97.
11. Danadevi K, Rozati Roya, Banu Saleha B, and Grover Paramjit. Genotoxic Evaluation of Welders Occupationally Exposed to Chromium and Nickel using the Comet and Micronucleus assays. Mutagenesis. 2004;19(1):35-41.

12. Figá-Talamanca I, Traina ME, and Urbani E. Occupational Exposures Metals, Solvents and Pesticides: Reproductive Effects and Biological Markers. *Occup Med.* 2001;51(3):174-88.
13. Arulldhas Michael M, Subramanian S, Sekar P, Vengatesh G, Chandrahasan Gowri, Govindarajulu P, et al. Chronic Chromium Exposure-Induced Changes in Testicular Histoarchitecture are Associated with Oxidative Stress: Study in a non-human Primate (*Macaca radiata* Geoffroy) M. *Human Reproduction.* 2005;20:2801–13,.
14. Kold Jensen T, Bonde Jens P, and Michael Joffe. The Influence of Occupational Exposure on Male Reproductive Function. *Occupational Medicine.* 2006;56:544–53.
15. Medeiros MG, Rodrigues AS, Batoréu MC, Laires A, Rueff J, and Zhitkovich A. Elevated Levels of DNA–Protein Crosslinks and Micronuclei in Peripheral Lymphocytes of Tannery Workers Exposed to Trivalent Chromium. *Mutagenesis.* 2003;18(1):19-24.
16. Vincent John B. Mechanisms of Chromium Action: Low-Molecular-Weight Chromium-Binding Substance. *J Am Coll Nutr.* 1999 February 1, 1999;18(1):6-12.
17. Vincent John B. Recent Advances in the Nutritional Biochemistry of Trivalent Chromium. *Proceedings of the Nutrition Society.* 2004;63:41-7.
18. Cefalu William T, Hu Frank B. Role of Chromium in Human Health and in Diabetes. *Diabetes Care.* 2004 November 1, 2004;27(11):2741-51.
19. Katz Sidney A. The Analytical Biochemistry of Chromium. *Environmental Health Perspectives.* 1991;92:13-6.
20. Witmer Charlotte, Faria Ellen, Park Hyoun-Sook, Sadrieh Nakissa, Yurkow Edward, O'Connell Sean, et al. In Vivo Effects of Chromium. *Environmental Health Perspectives.* 1994;102:169-76.
21. Bray George A, Geenway Frank L. Current and Potential Drugs for Treatment of Obesity. *Endocrine Reviews.* 1999;20:805-75.
22. Mosher WE. Reproductive impairments in the United States Demography 1985;22:1965-82.
23. Auger Jacques, Kunstmann Jean Marie, Czyglik Françoise, and Jouannet Pierre. Decline in Semen Quality among Fertile Men in Paris during the past 20 years. *The New England Journal of Medicine.* 1995;332(5):281-5.

24. OMS. Manual de laboratorio de la OMS para el examen del semen humano 2001 .
25. Pages G, Aller J. Infertilidad, Fisiología, Diagnóstico y Tratamiento. AMOLCA, editor. Venezuela; 2006.
26. Danadevi K, Rozati R. Semen Quality of Indian Welders Occupationally Exposed to Nickel and Chromium. *Reproduced Toxicologi*. 1995;17:451-6.
27. Hepburn DD, Dion, Xiao Jiarong, Bindom Sharell, Vincent John B, and O'Donnell Janis. Nutritional Supplement Chromium Picolinate Causes Sterility and Lethal Mutations in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(7):376-71.
28. Mukhopadhyay I. KS, y Kar CD. Hazardous Effects of Effluent from the Chrome Plating Industry: 70 kda Heat Shock Protein Expression as a Marker of Cellular Damage in Transgenic *Drosophila melanogaster*. *Env Health Persp*. 2003;111:1926-32.
29. Kumar Sunil, Sathwara NG, Gautam Anil K, Agarwal Kamlesh, Shah Bharti, Kulkarni Pradeep K, *et al*. Semen Quality of Industrial Workers Occupationally Exposed to Chromium. *Journal of Occupational Health*. 2005;47:424-30.
30. Garcon G, Leleu B, Zerimech F, Marez T, Haguenoer JM, Furon D, *et al*. Biologic Markers of Oxidative Stress and Nephrotoxicity as Studied in Biomonitoring of Adverse Effects of Occupational Exposure to Lead and Cadmium. *Occup Environ Medicine*. 2004;46:1180-6.
31. Gurer-Orhan H, Sabir HU, Ozgunes H. Correlation between Clinical Indicators of Lead Poisoning and Oxidative Stress Parameters in Controls and Lead-Exposed Workers. *Toxicology Letters*. 2004;195:147-54.
32. Suresh C. Sikka. Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Andrology and Assisted Reproductive Technology. *Journal of Andrology*. 2004;25(1):5-18.
33. GJ, Zhang LL, Lu L, Wu P, Zheng W. Occupational Exposure to Welding Fume among Welders: Alterations of Manganese, Iron, Zinc, Copper, and Lead in Body Fluids and the Oxidative Stress Status. *Ocupational Enviroment Medical*. 2004;46:241-8.
34. Taylor Clare T. Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Human Fertility. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2001;10:189-98.
35. Kim H, Cho SH. Exposure to Hexavalent Chromium does not Increase 8-Hydroxydeoxyguanosine Levels in Korean Chro-mate Pigment Workers. *Industrial Health*. 1999;37:335-41.

36. Shi Xianglin, Dalal NS, and Kasprzak Kazimierz S. Generation of Free Radicals from Hydroxigen Peroxide and Lipid Hydroperoxides in the Presence of Cr(III). *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1993;302(1):294-9.
37. Agarwal Ashok, Prabakaran Sushil A, and Said Tamer M. Prevention of Oxidative Stress Minireview Injury to Sperm. *Journal of Andrology*. 2005; 26.
38. Baker A. Mark, and Aitken John R. Reactive Oxygen Species in Spermatozoa: Methods for Monitoring and Significance for the Origins of Genetic Disease and Infertility. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2005;3:1-9.
39. Caglieri Andrea, Goldoni Matteo, Acampa Olga, Andreoli Roberta, Vettori Maria V, Corradi Massimo, et al. The Effect of Inhaled Chromium on Different Exhaled Breath Condensate Biomarkers among Chrome-Plating Workers. *Environmental Health Perspectives*. 2006;114:542-6.
40. Sanocka Dorota, and Kurpisz Maciej. Reactive Oxygen Species and Sperm Cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2004;2:1-7.
41. Solorzano del Rio. Un Nuevo Remedio Natural para Perder Peso:el Picolinato de Cromo. *Terapia Bioquímica Nutricional OASA*. 1998:24-32.
42. Melvin H.W. *Nutrición para la Salud, la Condición Física y el Deporte*. 1 ed. Paidotribo, editor.; 2002.
43. Balk Ethan M, Tatsioni Athina, Lichtenstein Alice H, Lau Joseph, Pittas Anastassios G. Effect of Chromium Supplementation on Glucose Metabolism and Lipids. *Diabetes Care*. 2007;30:2154–63.
44. González Muñoz MJ, Meseguer I, Martínez Para MC, Aguilar MV, y Bernao A. Repercusiones del Picolinato de Cromo en el Metabolismo Proteico en Función de la Edad. *Nutrition Hospitalaria*. 2006;21:709-14.
45. Campbell Wayne W, Joseph Lyndon JO, Davey Stephanie L, Cyr-Campbell Deanna, Anderson Richard A, and Evans William J. Effects of Resistance Training and Chromium Picolinate on Body Composition and Skeletal Muscle in Older Men. *J Appl Physiol*. 1999;86(1):29-39.
46. Luigi Di Luigi. Supplements and the Endocrine System in Athletes. *Clin Sports Med*. 2008;27:131-51.
47. Davies S, McLaren Howard J, Hunnisett A, Howard M. Age-related Decreases in Chromium Levels in 51,665 Hair, Sweat, and Serum Samples from 40,872 Patients--Implications for the Prevention of Cardiovascular Disease and Type II Diabetes Mellitus. *Metabolism*. 1997 May;46(5):469-73.

48. Henderson LM, Swam PB. Picolinic Acid Carboxilase. Academic Press New York Methods in Enzimology. 1971.
49. Komorowski James R, Greenberg Danielle, Juturu Vijaya. Chromium Picolinate does not Produce Chromosome Damage. Toxicology in Vitro. 2007;22:819–26.
50. Berner TO, Murphy MM, Slesinski R. Determining the Safety of Chromium Tripicolinate for Addition to Foods as a Nutrient Supplement. Food and Chemical Toxicology. 2004;42:1029–42.
51. The Index Merck. The Merck Index an Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals 40 ed. Whitehouse Station, NJ, USA: Merck Research Laboratories; 2006.
52. Martínez Álvarez J.R, Gómez Candela C, Villarino Marín AL. Obesidad y Alimentos Funcionales: ¿Son eficaces los nuevos ingredientes y productos? Revista Médica Universitaria Navarra. 2006;50:31-8.
53. Mertz Walter. Chromium in Human Nutrition: A Review. Journal of Nutrition. 1993:626-33.
54. Granadillo Victor A, Parra de Machado L, and Romero Romer A. Determination of Total Chromium in Whole Blood, Blood Components, Bone, and Urine by Fast Furnace Program Electrothermal Atomization AAS and Using neither Analyte Isoformation nor Background Correction. Analytical Chemistry. 1994;66:3624-31.
55. Cornelis R, Heinzow B, Herber R.F.M, Christensen Molin J, Paulsen O.M, Sabbioni E, et al. Sample Collection Guidelines for Trace Elements in Blood and Urine. Pure & Appl Chem. 1995;67:1575-608.
56. Kayne Frederick J, Komar G, Laboda H, and Vanderlinde Raymond E. Atomic Absorption Spectrophotometry of Chromium in Serum and Urine with a Modified Perkin-Elmer 603 Atomic Absorption Spectrophotometer. Clinical Chemistry 1978;24(12):1978-2151.
57. Case Patrick C, Ellis Lyndon, Turner Justine C, and Fairman Ben. Development of a Routine Method for the Determination of Trace Metals in Whole Blood by Magnetic Sector Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry with Particular Relevance to Patients with Total Hip and Knee Arthroplasty. Clinical Chemistry. 2001;47(2):275-80.
58. Schroeder Henry A, and Nason Alexis P. Trace-Element Analysis in Clinical Chemistry. Clinical Chemistry. 1971;17(6):461-74.

59. Iyengar Venkatesh, and Woittiez Joost. Trace Elements in Human Clinical Specimens: Evaluation of Literature Data to Identify Reference Values. *Clinical Chemistry*. 1988;34.
60. Flaterty Ellen JO, Kerger Brent D, Hays Sean M, and Paustenbach Dennis J. A Physiologically Based for the Ingestion of Chromium (III) and Chromium (VI) by Humans *Toxicological Sciences* 2001;60:196-213.
61. Rolla Nunes Berta, Goncalves Magalhães Cristina, Bento Borba da Silva José. Fast Determination of Chromium in Human Serum by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. *J Anal At Spectrom*. 2002;17:1335–8.
62. Perkin Elmer Inc. Guide to Inorganic Analisis. In press 2004.
63. Skoog Douglas A, West Donald M, Holler F. James, Crouch Stanley R. *Fundamentos de Química Analítica*. 8a. ed. Mexico DF: Thomson Editotes S.A de C.V; 2005.
64. Rohm Ed Haas Co. Separation Technologies. 1990.
65. Hamilton Simpson Ellis. *Cálculos en Química Analítica*. 17 ed. Mc Graw-Hill Book Co, editor. Bogotá, Colombia; 1990.
66. Skoog Douglas A, Holler F. James, Nieman Timothy A. *Principios de Análisis Instrumental*, 5ta ed. Mc Graw-Hill, editor. España; 2001.
67. Perkin Elmer Inc. The Graphite Furnace Technique Users Guide. 2004.
68. Robinson James W. *Atomic Spectroscopy*. 2 ed. E.U.A.: Marcel Dekker, Inc.; 1996.
69. Schelemner Gerhard, Radziuk Bernard. *Analitical Graphite Furnace Atomic Absortion Spectrometry*. 1 ra ed. Birkhauser, editor. Germany; 1999.
70. Varian Inc. *Varian Atomic Absorption Spectrometers*. Varian Sales and Dealer Offices. 2002:16.
71. Shimadzu corporation. *Spectrophotometric Analysis*. LA122-E002. Japan: A315; 2002.
72. Perkin Elmer LLC. Automatic matrix modification for improved analytical quality and sample throughput. U.S.A; 1999.
73. Lagalante Anthony F. Atomic absorption spectroscopy: A Tutorial Review. *Applied Spectroscopy Reviews* 1999;34:173–89.

74. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México A.C. Guía de Validación de Métodos Analíticos 2002. 1ra; 2002. p. 123.

75. Rosas Fuentes Avilene. Efecto del Picolinato de Cromo en Parámetros Seminales y en las Concentraciones de Glucosa e Insulina. México: UNAM; 2009.

XII. ANEXOS

1. Interferencias espectrales de algunos elementos

Línea de la fuente	Emisión nm	Analito	Absorción nm	Separación nm
Aluminio	308.215	Vanadio	308.211	0.004
Antimonio	217.023	Plomo	216.999	0.024
Antimonio	217.919	Cobre	217.894	0.024
Antimonio	231.147	Níquel	231.095	0.052
Antimonio	323.252	Litio	323.261	0.009
Arsénico	228.812	Cadmio	228.802	0.010
Cobre	324.754	Europio	324.753	0.001
Galio	403.298	Manganeso	403.307	0.009
Germanio	422.657	Calcio	422.673	0.016
Iodo	206.163	Bismuto	207.170	0.007
Fierro	271.903	Platino	291.904	0.001
Fierro	297.470	Manganeso	279.482	0.012
Fierro	285.213	Magnesio	285.213	0.001
Fierro	287.417	Galio	287.424	0.007
Fierro	342.728	Cobre	342.754	0.026
Fierro	327.445	Cobre	327.396	0.049
Fierro	338.241	Plata	338.289	0.048
Fierro	352.424	Níquel	352.454	0.030
Fierro	396.114	Aluminio	396.153	0.093
Fierro	460.765	Estroncio	460.733	0.032
Plomo	241.173	Cobalto	241.162	0.011
Plomo	247.638	Paladio	247.643	0.005

Manganeso	403.307	Galio	403.298	0.009
Mercurio	253.652	Cobalto	253.649	0.003
Mercurio	285.242	Magnesio	285.213	0.029
Mercurio	359.348	Cromo	359.349	0.001
Neón	359.352	Cromo	359.349	0.003
Silicio	250.690	Vanadio	250.690	0.001
Zinc	213.856	Fierro	213.859	0.003

2. Cálculos realizados para los parámetros de la validación

Limite de detección y cuantificación

ΣY	0.0066
Σy^2	0.00001
N	5
Sb	0.00019
LD($\mu\text{g/L}$)	0.012
LC($\mu\text{g/L}$)	0.03524965

Precisión del sistema

ΣY	0.052
Σy^2	0.017
Media aritmética (\hat{y})	0.052
Desviación estándar (S)	0.001
CV(%)	0.982

Linealidad del sistema

Σx	15.75
Σy	0.852
Σx^2	22.687
Σy^2	0.0668
Σxy	1.230
N	15
pendiente (b_1)	0.0545
ordenada al origen (b_0)	-0.0004
(r^2)	0.991
S_{XY}	0.004
S_{b1}	0.001
$t_{0.975, n-2}$	2.160
IC(β_1)	0.0513 0.0576

Parámetros de validación para el método en suero

Exactitud del método

Σy	605.800
Σy^2	61175.080
N	6.000
\hat{Y}	100.967
S	1.376
CV (%)	1.363
$t_{0.975, n-2}$	2.776
LIC(μ)	99.406
LSC(μ)	102.512

Linealidad del método

CANTIDAD ADICIONADA VS RECUPERADA	
Σx	9
Σy	9.175
Σx^2	10.5
Σy^2	10.886
Σxy	10.691
n	9
b_1	1.010
b_0	0.008
r^2	0.999
$S_{y/x}$	0.010
S_{b1}	0.008
$t_{0.975, n-2}$	2.364
LIC(β_1)	0.990
LSIC(β_1)	1.030
X	1
S_{b0}	0.008
$t_{0.975, n-2}$	2.364
LIC(β_0)	-0.012
LSIC(β_0)	0.029
\hat{y}	1.019
$CV_{XY}(\%)$	1.020

% DE RECOBRO	
Σz	918.833
Σz^2	93813.1322
Y	102.092
S	0.9390
CV	0.9198
$t_{0.975}$	2.3060
LIC(μ)	101.370
LSIC(μ)	102.814

Parámetros de validación para el método en semen

Exactitud del método

Σy	638.30
Σy^2	67908.33
n	6
\hat{Y}	106.383
S	0.877
CV(%)	0.825
$t_{0.975, n-2}$	2.776
LIC(μ)	105.389
LSC(μ)	107.318

Linealidad del método

Cantidad adicionada vs recuperada	
Σx	9
Σy	9.125
Σx^2	10.5
Σy^2	10.732
Σxy	10.615
N	9
b_1	0.993
b_0	0.0209
r^2	0.999
$S_{y/x}$	0.012
S_{b1}	0.009
$t_{0.975, n-2}$	2.365
LIC(β_1)	0.971
LSIC(β_1)	1.015
X	1.000
S_{b0}	0.010
$t_{0.975, n-2}$	2.365
LIC(β_0)	-0.003
LSIC(β_0)	0.045
\hat{Y}	1.014
$CV_{X/Y}(\%)$	1.145

% DE RECOBRO	
Σz	915.53
Σz^2	93151.50
y	101.725
S	1.500
CV	1.475
$t_{0.975}$	2.306
LIC(μ)	100.57
LSIC(μ)	102.88

Reproducibilidad

Σy	12.062
Σy^2	12.126
n	12
\hat{y}	1.005
S	0.011
CV	1.127

3. Formulas empleadas para la validación

Precisión del sistema

Media aritmética

$$\hat{y} = \frac{\Sigma y}{n}$$

Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{n(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2}{n(n-1)}}$$

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{S}{\hat{y}} * 100$$

$$\Sigma y = x_1 + x_2 + \dots + x_n$$

Linealidad del sistema

Pendiente

$$b^1 = \frac{n\Sigma xy - \Sigma x \Sigma y}{n \Sigma x^2 - (\Sigma x)^2}$$

Ordenada al origen

$$b_0 = \frac{\Sigma y - b_1 \Sigma x}{n}$$

Coefficiente de determinación

$$r^2 = \frac{(n(\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y))^2}{(n(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2)(n(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2)}$$

Intervalo de confianza para la pendiente

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_1}$$

$$S_{b_1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{n}}}$$

$$S_{x/y} = \sqrt{\frac{\Sigma y^2 - b_1 \Sigma xy - b_0 \Sigma y}{n-2}}$$

Exactitud y respetabilidad del método

Media aritmética

$$\hat{y} = \frac{\Sigma y}{n}$$

Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{n(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2}{n(n-1)}}$$

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{S}{\hat{y}} * 100$$

Intervalo de confianza para la media poblacional

$$IC(\mu) = \hat{y} \pm t_{0.975, n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Linealidad del método

Pendiente

$$b^1 = \frac{n \Sigma xy - \Sigma x \Sigma y}{n \Sigma x^2 - (\Sigma x)^2}$$

Ordenada al origen

$$b_0 = \frac{\Sigma y - b_1 \Sigma x}{n}$$

Coefficiente de determinación

$$r^2 = \frac{(n(\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y))^2}{(n(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2)(n(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2)}$$

Intervalo de confianza para la pendiente

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_1}$$

$$S_{b_1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$S_{x/y} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}}$$

Intervalo de confianza para la ordenada al origen

$$S_{b_0} = S_{x/y} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(x)^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

Coefficiente de variación de la regresión

$$CV_{x/y} = \frac{S_{y/x}}{\hat{y}} * 100$$

Reproducibilidad

Media aritmética

$$\hat{y} = \frac{\sum y}{n}$$

Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{S}{\hat{y}} * 100$$