


**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**


The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central shield with a blue background, a red figure, and a white figure. The shield is flanked by two golden lions. Above the shield is a golden crown. The shield is set against a light blue background with a white cross. The entire emblem is enclosed in a circular border with the Latin text "CAROLINA ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER CETERAS OBIS CONSPICUA" around the top and "UNIVERSITAS" at the bottom.

**“Validación del método analítico para la determinación de plomo en sangre por espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito en el laboratorio del Departamento de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala”**

**José Manuel Marroquín Quiñonez**  
**Químico Farmacéutico**

**GUATEMALA, JULIO DE 201**

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure, likely a saint or religious figure, seated on a throne. The figure is surrounded by various symbols, including a cross, a book, and a sword. The seal is set against a background of a landscape with mountains and a sun. The Latin motto "ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER CÆTERAS OB HIS CONSPICUA CAROLINA" is inscribed around the perimeter of the seal.

**“Validación del método analítico para la determinación de plomo en sangre por espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito en el laboratorio del Departamento de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala”**

**Informe de Tesis**

**Presentado por**

**José Manuel Marroquín Quiñonez**

**Para optar al título de  
Químico Farmacéutico**

**GUATEMALA, JULIO DE 2015**

## **JUNTA DIRECTIVA**

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
Licda. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza, M. A.	Secretaria
Licda. Miriam Carolina Guzmán Quilo, M.Sc	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Br. Michael Javier Mó Leal	Vocal IV
Br. Blanqui Eunice Flores De León	Vocal V

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por concederme la vida y permitirme llegar a este momento tan especial.

A mis padres Jorge y Alma por su amor incondicional, por su apoyo y por brindarme las oportunidades necesarias para ser una mejor persona y un buen profesional farmacéutico.

A mis catedráticos por ser parte fundamental de mi formación profesional.

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, casa de estudios que me permitió formarme como Químico Farmacéutico.

Al Departamento de Toxicología “Julio Valladares Márquez” al Centro de Información y Asesoría Toxicológica -CIAT- y al Laboratorio de Toxicología por permitirme realizar mi proyecto de investigación, *Tesis Ad Gradum*.

A las licenciadas Carolina Guzmán, Mayté Donis y Gabriela Chaulón por sus conocimientos aportados para llevar a cabo la validación del método analítico para la determinación de plomo en sangre por espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito.

A todas aquellas personas que de alguna forma, ayudaron a que este trabajo fuera realizado.

## **DEDICATORIA**

A mis padres Jorge y Alma por su amor, su apoyo y por brindarme todas las oportunidades para ser antes que un Químico Farmacéutico una mejor persona.

A mis hermanos Jorge, Daniel y Mónica por su amor y porque a pesar de todo siempre creyeron y confiaron en mí.

A mis amigos incondicionales y compañeros de estudio, por todo el amor, pasión y esfuerzo realizado en esta aventura llamada ciencias farmacéuticas.

Al Hospital Regional de Zacapa en especial al Departamento de Farmacia y la Unidad de Nutrición Parenteral por permitirme realizar mi Ejercicio Profesional Supervisado.

Al ser que en el comienzo fue mi inspiración.

## ÍNDICE

	<b>Pág.</b>
<b>I. RESUMEN</b>	1
<b>II. INTRODUCCIÓN</b>	3
<b>III. ANTECEDENTES</b>	5
<b>IV. JUSTIFICACIÓN</b>	7
<b>V. OBEJTIVOS</b>	8
<b>VI. HIPÓTESIS</b>	9
<b>VII. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	10
<b>VIII. RESULTADOS</b>	22
<b>IX. DISCUSIÓN</b>	47
<b>X. CONCLUSIONES</b>	59
<b>XI. RECOMENDACIONES</b>	61
<b>XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	62
<b>XIII. ANEXOS</b>	71

## 1. RESUMEN

La determinación de plomo en sangre es importante debido a que es un metal tóxico que provoca graves daños al organismo humano, se han constatado sus efectos nocivos para las funciones renal y hepática y los sistemas hematopoyéticos, nervioso central y periférico (Menke, 2006).

La amplia utilización del plomo y sus derivados en las actividades industriales le ha convertido en un contaminante ambiental muy importante en el ámbito de la prevención de patologías profesionales (Lewis, 2014). Por tal razón las pruebas bioquímicas desarrolladas en los laboratorios de análisis se han convertido en parte fundamental para el diagnóstico toxicológico de saturnismo.

Los métodos espectrofotométricos son los de elección al momento de realizar análisis de elementos traza, ya que presentan alta sensibilidad, volumen de muestra pequeño y menor complejidad al momento de tratar la matriz.

En Guatemala, el laboratorio del Departamento de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala como parte de su labor realiza análisis espectrofotométrico para determinar dicho metal.

Por lo cual en este trabajo se realizó la validación del método analítico para la determinación de plomo en sangre por medio de espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito. Para la medición se utilizó un Espectrofotómetro de absorción atómica AAnalyst 700 con horno de grafito pirolítico y Automuestreador AS-800 con lámpara de plomo de cátodo hueco marca Perkin Elmer.

El objetivo consistió en validar, evaluar y verificar los respectivos parámetros de calidad con los cuales todo método que sea validado debe cumplir. Estos parámetros fueron linealidad, exactitud, precisión, repetibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, especificidad y rango de trabajo; asegurando que los resultados obtenidos son válidos y confiables, según las condiciones previamente establecidas tanto para el instrumento como para el modelo analítico. Los resultados obtenidos se analizaron utilizando prueba de hipótesis y análisis de varianza, a través del programa estadístico IBM Statistics SPSS 22.

Se utilizaron estándares de plomo a distintas concentraciones preparados a partir de un material de referencia certificado el cual contenía una concentración  $999 \pm 1.03 \mu\text{g/mL}$  de plomo en ácido nítrico al 5%. Se elaboró una recta de calibración lineal con estándares acuosos, la cual se utilizó para evaluar los resultados obtenidos de las muestras fortificadas en el laboratorio. Posteriormente para evaluar los parámetros estadísticos se realizó una recta de regresión lineal para las muestras de sangre fortificadas (método adición de estándar).

Se determinó que los resultados del modelo de regresión lineal cumplen con los supuestos de linealidad, independencia, normalidad y homocedasticidad, pues el método expresó una adecuada relación lineal entre la absorbancia y la concentración de plomo tanto para la recta de calibración con estándares acuosos como en la medición con muestras biológicas, realizadas a partir de la recta acuosa.

Se evaluó la exactitud del método obteniendo porcentajes de recuperación con una media de 100.83% para el rango de concentraciones de  $2 \mu\text{g/dL}$  a  $40 \mu\text{g/dL}$ . Los datos presentaron precisión para dicho rango con coeficientes de variación de 0.04% a 4.19%.

Se evaluó que existe repetibilidad para una concentración de  $30 \mu\text{g/dL}$  de plomo en sangre, encontrando una media de  $30.37 \mu\text{g/dL}$ , una desviación estándar de 0.24 y un coeficiente de variación de 0.77%. Tanto la precisión como la repetibilidad cumplen con el límite aceptado para un coeficiente de variación (CV%)  $< 5.0\%$ .

El límite de detección se estableció en  $0.66 \mu\text{g/dL}$  y el límite de cuantificación en  $1.99 \mu\text{g/dL}$ . Luego del análisis se determinó que no existe interferencia de matriz, ya que se comprobó que no hay diferencia significativa entre las pendientes de la recta de regresión para muestras biológicas y la pendiente de calibración con estándares acuosos. El rango de trabajo establecido durante el análisis fue de 2 a  $4 \mu\text{g/dL}$ .

Así se considera que el método analítico es adecuado para su aplicación debido a que se obtuvieron resultados seguros y confiables, garantizando la calidad de los mismos a través del proceso de validación.



## 2. INTRODUCCIÓN

La exposición al plomo se considera un problema ocupacional y ambiental, que requiere atención especial debido a que ha causado casos graves de intoxicación tanto aguda como crónica en la población mundial. Se estima que la exposición provoca 143, 000 muertes cada año y es responsable del 0.6% de la carga de morbilidad a nivel mundial (Haeflinger, 2013).

El plomo es un metal pesado que se encuentra en forma natural en el medio ambiente, pero las fuentes de contaminación principales son antropogénicas, produciendo una gran cantidad de efectos nocivos para el organismo. Actúa a nivel del desarrollo de los glóbulos rojos, el sistema cardiovascular y el sistema nervioso (Molina et al, 2007). Los síntomas de exposición al plomo son numerosos. La exposición crónica, incluso a niveles bajos de plomo va en detrimento del desarrollo mental de los niños y se ha relacionado con una disminución en el coeficiente intelectual y con problemas de comportamiento; otros síntomas de intoxicación por plomo pueden ser: irritabilidad, disminución del apetito y la energía, sueño insuficiente, dolores de cabeza, estreñimiento. Además son comunes la anemia y los cólicos abdominales. Los altos niveles de plomo pueden causar encefalopatía aguda, marcha inestable (*marcha de steppage*), debilidad muscular, convulsiones y hasta coma (Bleecker, 2005).

Sin embargo el diagnóstico clínico en ocasiones es difícil de establecer cuando no existen antecedentes claros de exposición, debido a que los intoxicados a veces no tienen síntomas y porque los signos y síntomas, cuando están presentes, son relativamente inespecíficos (Haeflinger, 2013). Es así como las investigaciones de laboratorio son la única vía fiable para confirmar el diagnóstico clínico a las personas expuestas a plomo, por lo cual su papel en la identificación, cuantificación y tratamiento de la intoxicación por este analito es esencial. Por ello es necesario contar con metodologías analíticas estandarizadas que cumplan con parámetros de exactitud, precisión, linealidad, sensibilidad y selectividad que aseguren y garanticen la calidad de los resultados analíticos. El proceso por el cual se evalúan estos atributos se conoce con el nombre de validación (Gómez, 2013).

El presente trabajo de tesis validó el método analítico para la determinación de plomo en sangre por espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito, evaluando parámetros que

permiten verificar y validar el uso del método por medio del equipo de espectrofotometría de absorción atómica Perkin Elmer y la técnica analítica proporcionada por el laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, con la finalidad de contribuir a un mejor diagnóstico diferencial en la intoxicación por plomo, a través de resultados de laboratorio seguros.

### 3. ANTECEDENTES

Se han realizado diversos trabajos e investigaciones relacionados con la detección y cuantificación de plomo en sangre. Así como la validación de métodos analíticos utilizando la Espectrofotometría de Absorción Atómica con horno de Grafito (GFAAS).

En el área de Toxicología Ambiental se han realizado diversas investigaciones como la del año 2014 por la Sociedad de Ciencias Medioambientales, en dicho estudio se analizó plomo y otros metales pesados presentes en el río Tonghui en Beijing-China, por un método de extracción conocido como "*cloud point extraction*", para la determinación de dichos metales se utilizó el método de Espectrofotometría de Absorción Atómica acoplado a un Horno de Grafito (Ren, Zhao, Sun y Zhong, 2014).

En el año 2012 Robledo, L y Castaño, A realizaron la validación de la metodología para el análisis de los metales cadmio y plomo en agua tratada por Absorción Atómica con Horno de Grafito en el Laboratorio de análisis de aguas y alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira-Colombia (Robledo y Castaño, 2012).

Otro estudio realizado por Pacheco, et al, en el 2011 consistió en determinar el contenido de plomo sanguíneo en mujeres expuestas al humo de madera en la ciudad de Temuco-Chile. Las concentraciones de plomo en sangre fueron analizadas por Espectrofotometría de Absorción Atómica con Horno de Grafito (Pacheco, et al, 2011).

En Lima-Perú para el año 2010 Castro, C y Sobrano, F determinaron y cuantificaron plomo en muestras de sangre venosa de escolares de 12 a 17 años. La cuantificación se realizó mediante el método de Espectrofotometría de Absorción Atómica (Castro y Sobrano, 2010).

Shrivas, K y Kumar, D en el 2010 determinaron la concentración de plomo en una gota de sangre como muestra, utilizando un proceso de microextracción. La cuantificación de plomo se determinó por medio de Espectrofotometría de Absorción Atómica con Horno de Grafito (Shrivas y Kumar, 2010).

En el año 2008 La Universidad de Chile Desarrollo un método para la determinación de Pb mediante Espectrofotometría de Absorción Atómica Electrotérmica (ETASS) en suspensiones de pelo y uña como biomarcadores de exposición (Valdebenito, 2008).

En el año 2007 Molina, et al, determinaron y estandarizaron la cuantificación de plomo en muestras de sangre provenientes de operarios de estaciones de servicio del Estado de Mérida en la ciudad de Buenos Aires-Argentina. La determinación de plomo se realizó por espectrofotometría de absorción atómica por atomización electrotérmica (ETASS), (Molina, et al, 2007).

En el año 2007, Cedano, K y Requena, L realizaron un estudio Toxicológico en el cual determinaron las concentraciones de cadmio, magnesio y plomo en muestras de sangre y/u orina (Cedano, K y Requena, L, 2007). La determinación de plomo se realizó por espectrofotometría de absorción atómica por llama.

En Trujillo-Venezuela en el 2003 Aranguren, F., Burgueren, J y Montilla, J realizaron un estudio para determinar las concentraciones de plomo en sangre y en orina de trabajadores que laboran en expendios de gasolina, los resultados de los análisis se obtuvieron por el método espectrofotométrico de absorción atómica con horno de grafito (Aranguren, F., et al, 2003).

Yee, H., Nelson, J y Jackson, B en el año 1994 publicaron en el Journal of Analytical Toxicology un estudio titulado *Measurement of lead in blood by graphite furnace atomic absorption spectrometry*, en el cuál validaron un método para determinar las concentraciones de plomo en sangre utilizando para la curva de calibración estándares acuosos (Yee H., Nelson, J y Jackson, B, 1994).

En Guatemala no se han publicado estudios de validación en temas de plomo.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Un caso de intoxicación por plomo resulta en ocasiones difícil de diagnosticar por parte del médico debido a que en el examen físico realizado al paciente los signos y síntomas encontrados son inespecíficos y probablemente la historia clínica no sea muy completa.

Por lo tanto es necesario realizar análisis de laboratorio que confirmen no solo la presencia sino también la cantidad de dicho metal, y así estos resultados puedan ser comparados con los límites de plomo en sangre establecidos por las entidades sanitarias internacionales. Sin embargo para que los resultados sean seguros, confiables y objetivos es necesario que el método utilizado para su cuantificación esté validado.

Es así como la principal finalidad de la validación es verificar, confirmar y asegurar que los resultados obtenidos por el método evaluado, en este caso la determinación de plomo en sangre por espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito sean exactos y precisos. Los resultados de los análisis serán información indispensable para el médico al momento de emitir un diagnóstico diferencial en los casos en que se encuentren valores anormales de plomo, con la garantía que los resultados obtenidos en el laboratorio sean veraces y así administrar un tratamiento adecuado al paciente intoxicado con plomo.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVO GENERAL**

5.1.1 Validar el método analítico para la determinación de plomo en muestras de sangre por medio de espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito.

### **5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

5.2.1 Evaluar las características de desempeño: linealidad, exactitud, precisión, repetibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, especificidad y rango del método para la determinación de plomo en sangre por medio de absorción atómica con horno de grafito.

5.2.2 Definir las condiciones óptimas del método y del equipo para lograr asegurar que los resultados obtenidos sean los adecuados y que cumplan con los parámetros de calidad requeridos.

## **6. HIPÓTESIS**

El método para determinar plomo en sangre por espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito utilizado en el laboratorio del Departamento de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala cumple con los parámetros de desempeño: linealidad, exactitud, precisión, repetibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, especificidad y rango, para ser considerado como un método analítico útil, válido, seguro y confiable.

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1 MATERIALES**

#### **7.1.1 UNIVERSO DE TRABAJO**

Metodologías para la medición de plomo en sangre por espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito.

#### **7.1.2 MUESTRA**

Muestras de sangre fortificadas con estándar de plomo en los niveles establecidos.

#### **7.1.3 RECURSOS**

##### **7.1.3.1 RECURSOS HUMANOS**

**7.1.3.1.1 Investigador:** Br. José Manuel Marroquín Quiñonez.

**7.1.3.1.2 Asesora:** MSc. Carolina Guzmán Quilo.

**7.1.3.1.3 Revisora:** MSc. Mayté Donis de Recinos.

##### **7.1.3.2 RECURSOS INSTITUCIONALES**

**7.1.3.2.1** Biblioteca de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia (CEDOF) de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

**7.1.3.2.2** Departamento de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

**7.1.3.2.3** Laboratorio del Departamento de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.



#### **7.1.4 INSTRUMENTACIÓN**

**7.1.4.1** Agitador eléctrico marca Fisher.

**7.1.4.2** Balanza analítica Shimadzu AY 220.

**7.1.4.3** Baño de ultrasonido.

**7.1.4.4** Cabina de extracción de gases.

**7.1.4.5** Microcentrífugadora.

**7.1.4.6** Espectrofotómetro de absorción atómica AAnalyst 700 con horno de grafito y Automuestreador AS-800 Perkin Elmer.

**7.1.4.7** Lámpara de Pb de cátodo hueco (C-HCL) de Perkin-Elmer.

**7.1.4.8** Refrigeradora Frigideir.

#### **7.1.5 MATERIALES Y CRISTALERIA.**

**7.1.5.1** Balones aforados de diferente capacidad.

**7.1.5.2** Bulbo de hule para pipetas de Pasteur.

**7.1.5.3** Embudos de plástico.

**7.1.5.4** Espátula.

**7.1.5.5** Gradilla.

**7.1.5.6** Pipetas de émbolo Transferpette Brand con capacidad de 10-100  $\mu$ l y de 100-1000  $\mu$ l.

**7.1.5.7** Papel filtro Whatman No. 1

**7.1.5.8** Pipetas de vidrio.

**7.1.5.9** Puntas para pipetas de émbolo.

**7.1.5.10** Recipientes plásticos para disoluciones lavadoras.

**7.1.5.11** Soporte para copas de análisis

**7.1.5.12** Tubos vacutainer con EDTA.

**7.1.5.13** Microtubos de centrifuga de 1.5 ml con cierre hermético.

**7.1.5.14** Tubos de grafito.

**7.1.5.15** Tubos plásticos de aproximadamente 5 ml de capacidad con cierre hermético.

**7.1.5.16** Vasos de precipitado de diferentes capacidades.

#### **7.1.6 REACTIVOS**

**7.1.6.1** Solución Stock de Plomo de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , en  $\text{HNO}_3$  (comercial).

**7.1.6.2** Ácido nítrico ultrapuro 65 % p/p.

**7.1.6.3** Fosfato Monobásico de Amonio.

**7.1.6.4** Ácido Nítrico 1.6 M

**7.1.6.5** Tritón X-100 (octil-fenoxi-polietoxietanol).

**7.1.6.6** Agua destilada tipo I:  $\pm 1.0 \text{ MU cm}^{-1}$

**7.1.6.7** Gas Argón 99.99 %.

**7.1.6.8** Disolución de lavado.

**7.1.6.9** Disolución estándar de plomo 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

**7.1.6.10** Disolución de trabajo: 2 µg/dL, 4 µg/dL, 8 µg/dL, 12 µg/dL, 16 µg/dL, 20 µg/dL, 26 µg/dL, 30 µg/dL, 36 µg/dL, 40 µg/dL.

### **7.1.7 Materiales de oficina**

**7.1.7.1** Computadora.

**7.1.7.2** Impresora

**7.1.7.3** Hojas de papel bond tamaño carta

**7.1.7.4** Software Win lab 32 AA Furnace-Automated Analysis Control

**7.1.7.5** Software estadístico XLSTAT

**7.1.7.6** Software estadístico IBM Statistics SPSS versión 22.0

## 7.2 ASPECTOS MÉTODOLÓGICOS Y TÉCNICA ANALÍTICA

### 7.2.1 PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES

**7.2.1.1 Disolución estándar de Plomo de 10 µg/mL:** De la solución stock de Plomo de 1000 µg/mL medir 100 µl y transferirlo a un balón volumétrico de 10 ml el cual debe contener 500 µl de ácido nítrico ultrapuro al 5% v/v mezclar y aforar con agua destilada tipo I.

**7.2.1.2 Disoluciones estándares:** Preparar los estándares de 2, 4, 8, 12, 16, 20, 26, 30, 36, 40 µg/dL en balones aforados de 10 ml, tomando las alícuotas correspondientes de:

**Tabla 1. Preparación de estándares acuosos**

Disolución STD de plomo [10 µg/mL] µl	µL HNO <sub>3</sub> 5%	µl Agua*	Concentración de las soluciones de trabajo
20	500	c.s.p. 10 ml	2 µg/dL
40	500	c.s.p. 10 ml	4 µg/dL
80	500	c.s.p. 10 ml	8 µg/dL
120	500	c.s.p. 10 ml	12 µg/dL
160	500	c.s.p. 10 ml	16 µg/dL
200	500	c.s.p. 10 ml	20 µg/dL
260	500	c.s.p. 10 ml	26 µg/dL
300	500	c.s.p. 10 ml	30 µg/dL
360	500	c.s.p. 10 ml	36 µg/dL
400	500	c.s.p. 10 ml	40 µg/dL

Fuente: Datos Experimentales

\*Mezclar y aforar con agua destilada tipo I

## 7.2.2 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

**7.2.2.1 Modificador de matriz:** Pesar 0.2 g de Fosfato monobásico de amonio y transferirlo a un balón de 100 ml, agregar agua hasta disolución, añadir 0.5 ml de Tritón X-100 cuidando que no se forme espuma, 0.2 ml de ácido nítrico ultrapuro mezclar, sonificar y aforar con agua destilada tipo I

**7.2.2.2 Disolución de Tritón X-100 (solución de lavado):** Transferir 200 ml de agua destilada a un balón de 2 L, adicionar 10 ml de Tritón X-100, disolver en baño de ultrasonido y llevar a volumen de 2000 ml con agua destilada tipo I, trasvasar a un recipiente de plástico de boca ancha con tapón de rosca.

**7.2.1.3 Disolución de Ácido Nítrico 1.6 M:** Medir 10.90 ml de ácido nítrico ultrapuro y transferirlos cuidadosamente a un balón volumétrico de 100 ml conteniendo agua, mezclar dejar enfriar y llevar a volumen con agua destilada tipo I.

## 7.2.3 PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES DE CALIBRACIÓN Y DE LAS MUESTRAS

### a. Estándares acuosos

- En tubos plásticos, identificados, agregar en el siguiente orden

**Tabla 2. Preparación del Blanco y del estándar de 40 µg/dL**

Estándar de plomo (µg/dL)	Agua destilada	Estándar 40 µg/dL de plomo	Modificador de matriz	Ácido nítrico 1.6 N
Blanco	200 µl	----	800 µl	500 µl
Estándar 40 µg/dL de plomo	100 µl	100 µl	800 µl	500 µl

Fuente: Datos Experimentales

**Nota:** Solo se prepara el estándar de 40 µg/dL y se programa el Automuestreador del equipo para hacer las diluciones de 2, 4, 8, 12, 16, 20, 26, 30 y 36 µg/dL utilizando el mismo blanco para dichas diluciones.

- Todos los tubos se deben homogenizar durante 30 min en agitador eléctrico, después de agregar el modificador de matriz.
- Luego de agregar el ácido nítrico 1.6 N, homogenizar por 15 min más en agitador eléctrico.
- Trasvasar el contenido a las copas y colocar en el soporte rotatorio del Automuestreador del Espectrofotómetro de absorción atómica para la lectura correspondiente (ver condiciones del equipo en el numeral 7.2.4 a).
- Encender el Espectrofotómetro de absorción atómica de acuerdo al intervalo de temperaturas (ver condiciones del equipo en el numeral 7.2.4 b).

**b. Con adición de estándar (muestra fortificada)**

- Previo a tomar la alícuota correspondiente, agitar manualmente el tubo plástico que almacena la muestra, hasta conseguir que ésta sea homogénea.
- En tubos plásticos, identificados, agregar en el siguiente orden como se indica en la tabla 3:

**Tabla 3. Preparación de las muestras fortificadas**

<b>Sangre + EDTA</b>	<b>Estándar de plomo</b>	<b>Modificador de matriz</b>	<b>Ácido Nítrico 1.6 M</b>	<b>Concentración de las muestras fortificadas</b>
100 µl	-----	800 µl	500 µl	BLANCO
100 µl	100 µl STD de 2 µg/dL	800 µl	500 µl	2 µg/dL
100 µl	100 µl STD de 4 µg/dL	800 µl	500 µl	4 µg/dL
100 µl	100 µl STD de 8 µg/d	800 µl	500 µl	8 µg/dL
100 µl	100 µl STD de 12 µg/dL	800 µl	500 µl	12 µg/dL
100 µl	100 µl STD de 16 µg/Dl	800 µl	500 µl	16 µg/dL
100 µl	100 µl STD de 20 µg/dL	800 µl	500 µl	20 µg/dL
100 µl	100 µl STD de 26 µg/dL	800 µl	500 µl	26 µg/dL
100 µl	100 µl STD de 30 µg/dL	800 µl	500 µl	30 µg/dL
100 µl	100 µl STD de 36 µg/dL	800 µl	500 µl	36 µg/dL
100 µl	100 µl STD de 40 µg/dL	800 µl	500 µl	40 µg/dL

Fuente: Datos Experimentales

- Todos los tubos se deben homogenizar durante 30 min en agitador eléctrico, después de agregar el modificador de matriz.
- Luego de agregar el ácido nítrico 1.6 M, homogenizar por 15 min más en agitador eléctrico.
- Pasar el contenido de todos los tubos a microtubos de centrifuga de 1.5 ml y centrifugar por 5 min.
- Pasar todos los sobrenadantes a las copas de lectura identificadas apropiadamente.
- Colocar las copas en el soporte rotatorio del Automuestreador del Espectrofotómetro de absorción atómica para la lectura correspondiente (ver condiciones del equipo en el numeral 7.2.4 a).
- Leer blanco, estándar y muestras fortificadas.

#### **7.2.4 TÉCNICA ANALÍTICA:**

##### **a) CONDICIONES INSTRUMENTALES**

- Longitud de onda: 283.3 nm
- Elemento: Pb
- Rendija: 0.7 L
- Corriente (mA): 10
- Energía de la lámpara de Pb: 48-50
- Lectura: área de pico
- Tiempo de integración: 5 seg.
- BOC: 2 seg.
- Volumen de muestra: 20  $\mu$ L



## b) PROGRAMA DE TEMPERATURAS

Tabla 4. Temperaturas optimizadas utilizadas en el horno de grafito para la medición de plomo.

ETAPAS	TEMPERATURA °C	T. RAMPA seg.	T. ESPERA seg.	FLUJO ARGÓN
1	100	5	20	250
Secado	140	15	15	250
Mineralización	700	10	20	250
Atomización	1800	0	5	0
Limpieza	2600	1	5	250

\* Nota: Temperatura de inyección: 110 °C

Fuente: De acuerdo al método analítico

## c) CÁLCULOS Y RESULTADOS

Automáticamente el equipo reporta la concentración en  $\mu\text{g}/\text{dL}$  tanto para los estándares de la recta de calibración como para las muestras de sangre. Los resultados para las muestras fortificadas se expresan obteniendo el porcentaje de recuperación. Antes de realizar un dictamen final, los resultados obtenidos durante el análisis se comparan con los valores de referencia establecidos en la siguiente tabla, reportando según sea el caso.

**Tabla 5. Límites de concentración de plomo en sangre según distintas organizaciones internacionales de la salud y el trabajo.**

Paciente	OMS	CDC	OSHA	ACGIH	Repetto
<b>No expuesto</b>	15-20 µg/dL	< 10 µg/dL	---	---	4-30 µg/dL
<b>Expuesto</b>	30-40 µg/dL	---	< 40 µg/dL	< 30 µg/dL	4-30 µg/dL
<b>Niños</b>	< 15 µg/dL	< 10 µg/dL	---	---	≤ 10 µg/dL
<b>Mujeres en edad fértil</b>	< 15 µg/dL	< 10 µg/dL	---	---	---

Fuente: Datos Bibliográficos.

### 7.2.5 CONTROL DE LA CALIDAD ANALÍTICA

El control de la calidad analítica permite verificar el procedimiento analítico, comparar métodos y asegurar la transferibilidad de los resultados. El material empleado para el control de la calidad analítica ha de ser de procedencia humana y la matriz similar a la de los especímenes, en este caso sangre. Asimismo, las concentraciones han de comprender tanto las que estén dentro del intervalo de referencia como 3 concentraciones arriba y 3 abajo del mismo intervalo.

## 7.3 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO ANALÍTICO

### 7.3.1 EXACTITUD:

La exactitud se calcula como el porcentaje de recuperación de la cantidad valorada con respecto a la cantidad de analito añadida a la muestra.

Para evaluar la exactitud se utilizaron las concentraciones de trabajo, se realizaron tres determinaciones repetidas de cada concentración.

Para estimar el % de recuperación se calcula la media teórica dependiendo de la cantidad de estándar añadida, se calculan los intervalos de confianza y se aplica la fórmula siguiente:

$$\text{recuperación}(\%) = 100 \times \frac{\bar{x}_j}{\rho_j}$$

Donde  $\bar{x}_j$  es la media de las concentraciones del estándar añadido y  $\rho_j$  es la concentración teórica del estándar.

### 7.3.2 PRECISIÓN

La precisión del método se expresa en términos de *repetibilidad*. Es decir que los factores de tiempo, analista, muestra, equipo y día serán bajo las mismas condiciones. Así el estudio de la precisión consistió en realizar 10 mediciones de la misma muestra, misma concentración, el mismo día, con él mismo equipo y analista, se expresó como la desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación), para el análisis se utilizará el estándar de 30 µg/dL.

Además se calcularán los parámetros de calidad para cada concentración con el objetivo de evaluar la precisión del método analítico, los parámetros de calidad son: la media, desviación estándar, CV% y sesgo.

### 7.3.3 ESPECIFICIDAD:

Para verificar la ausencia de interferencias provocadas por la matriz se comprobará mediante el análisis de la varianza (ANOVA) que las pendientes de las rectas de regresión lineal por el método de adiciones estándar sobre 10 muestras reales no son estadísticamente diferentes de la obtenida con los patrones acuosos ese mismo día. Si no se observan diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes en ninguna de las adiciones estándar en relación a la calibración con patrones acuosos se concluye que las interferencias químicas son despreciables (Seijas, et al, 2009).

### 7.3.4: LÍMITE DE DETECCIÓN

Se determina a partir de la menor concentración de plomo que puede detectarse pero no necesariamente cuantificarse mediante la siguiente fórmula:

$$X_{LD} = \frac{3\sigma}{S}$$

Donde:

$\sigma$  = desviación estándar de la respuesta del blanco

S = La pendiente de la curva de calibración (Organismo Argentino de Acreditación OAA, 2008).

### 7.3.5 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN:

Se calcula con la mínima concentración de analito que puede ser determinado con aceptable precisión y exactitud, Su estimación se realiza generalmente multiplicando por 10 la desviación estándar del blanco aplicando la siguiente fórmula:

$$X_{LC} = \frac{10\sigma}{S}$$

Donde:

$\sigma$  = desviación estándar de la respuesta del blanco

S = La pendiente de la curva de calibración

Criterio de precisión de un coeficiente de variación (CV) del 10% en el límite de cuantificación (Organismo Argentino de Acreditación OAA., 2008).

#### **7.3.6 LINEALIDAD:**

Para su estimación se analizarán 10 puntos de calibración, correspondientes a las concentraciones de 2, 4, 8, 12, 16, 20, 26, 30, 36, 40 µg/dL. Realizándose 3 lecturas para cada concentración. Se elaborará una gráfica de regresión lineal, se aplicará como límite un coeficiente de correlación  $r \geq 0.995$ , además se evaluarán los residuales a través de un gráfico de dispersión y de un análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor. Para evaluar la autocorrelación de los datos se utilizará el estadístico de Durbin-Watson.

#### **7.3.7 Rango:**

Se determina a partir de la mayor a la menor concentración de plomo que el equipo pudo detectar, también conocido como intervalo de trabajo. Se determinará además el intervalo lineal del método analítico.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 LINEALIDAD

Se realizó una curva de calibración preparando estándares de plomo en solución de ácido nítrico al 5% v/v a concentraciones de 2, 4, 8, 12, 16, 20, 26, 30, 36 y 40  $\mu\text{g}/\text{dL}$ , trabajando cada uno por triplicado (tabla 3).

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de regresión lineal (gráfica 1), obteniendo un coeficiente de correlación (R) de 0.998412 y un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.996826 (tabla 1), además se obtuvo un valor de  $p = 1.345886\text{E-}31$  según el análisis de varianza (tabla 2). De igual forma se realizó una gráfica de residuales de la regresión lineal de la curva de calibración de estándares de plomo (gráfica 2), donde se pudo determinar que los residuales tipificados representados frente a la concentración se distribuyen de forma aleatoria a un lado y otro de la línea que representa la desviación cero con respecto al dato esperado de la recta de regresión, determinando que el error se distribuye simétricamente. La normalidad se evaluó a través de un Histograma y un Gráfico de probabilidad normal (gráfica 3 y 4). La homocedasticidad o igualdad de varianzas se comprobó a través de una gráfica de dispersión entre los pronósticos tipificados y los residuos tipificados (gráfica 5).

**Tabla 1. Estadísticos de la regresión lineal para la recta de calibración con estándares acuosos**

<i>Resumen del modelo</i>	
<b>R</b>	0.998412
<b>R cuadrado</b>	0.996826
<b>R cuadrado ajustado</b>	0.999999793
<b>Error estándar de la estimación</b>	2.70639E-05
<b>Durbin-Watson</b>	2.096

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Análisis de datos en IBM Statistics SPSS 22.0

**Tabla 2. Análisis de varianza de la regresión lineal de la recta de calibración y sus residuos.**

<i>Origen de las Variaciones</i>	<i>SC</i>	<i>g.L</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad*</i>
Regresión	0.035379473	1	0.025393	48302473.91	1.345886E-31
Residuales	6.59211E-09	9	7.32457E-10		
Total	0.03537948	10			

\*  $\alpha = 0.05$ , SC = suma de cuadrados, g.L = grados de libertad, CM = cuadrado medio, F = F de Fisher.

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Análisis de datos en IBM Statistics SPSS 22.0

Los resultados para la curva de calibración son los siguientes.

**Tabla 3. Valores obtenidos de la concentración y absorbancia de los estándares acuosos utilizados en la recta de calibración.**

<i>Estándar de Plomo (<math>\mu\text{g/dL}</math>)</i>	<i>No. de replicas</i>	$\bar{X}$ <i>Concentración <math>\mu\text{g/dL}</math></i>	$\bar{X}$ <i>Absorbancia</i>
Blanco	3	-0.983	0.0000
Std 2	3	1.966	0.0126
Std 4	3	3.985	0.0212
Std 8	3	7.498	0.0362
Std 12	3	12.461	0.0574
Std 16	3	16.541	0.0748
Std 20	3	20.738	0.0928
Std 26	3	26.628	0.1179
Std 30	3	30.697	0.1353
Std 36	3	36.191	0.1587
Std 40	3	38.276	0.1676

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

Todos los casos contribuyen a la obtención de la ecuación de regresión lineal, pero no todos lo hacen con la misma fuerza (Daniel, 2002), debido a esto los puntos de influencia son casos que afectan de forma importante al valor de la ecuación de regresión, la presencia de puntos de influencia no tiene por qué constituir un problema en regresión, de hecho, lo normal es que en un análisis de regresión no todos los casos tengan la misma importancia (desde el punto de vista estadístico). Estos puntos de influencia fueron evaluados a través de los estadísticos de distancias que se observan en la tabla 4.

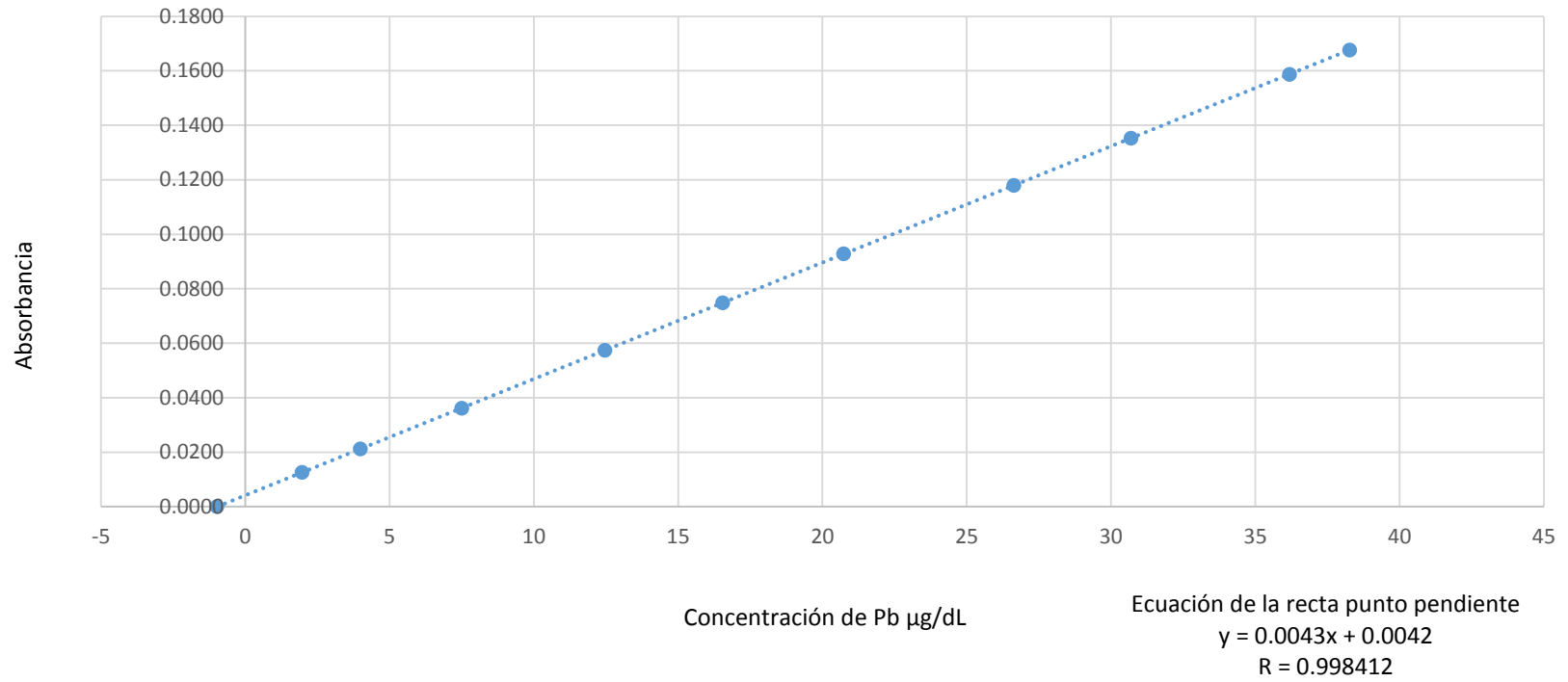
**Tabla 4. Estadísticas de residuos, puntos de influencia (distancias) de la recta de calibración con estándares acuosos de plomo.**

	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Media</i>	<i>SD</i>	<i>N</i>
<i>Valor pronosticado</i>	0.000002	0.167626	0.0795	0.0594806	11
<i>Valor pronosticado estándar</i>	-1.337	1.482	0	1	11
<i>Error estándar de valor pronosticado</i>	0	0	0	0	11
<i>Valor predicho corregido</i>	0.000002	0.167638	0.079501	0.0594823	11
<i>Residuo</i>	-0.0000259	0.0000562	0	0.0000257	11
<i>Residuo estándar</i>	-0.956	2.075	0	0.949	11
<i>Residuo estudentizado</i>	-1.151	2.182	-0.019	1.034	11
<i>Residuo eliminado</i>	-0.0000375	0.0000621	-0.0000011	0.0000307	11
<i>Residuo estudentizado suprimido</i>	-1.175	2.999	0.065	1.23	11
<i>Distancia de Mahal.</i>	0.006	2.195	0.909	0.764	11
<i>Distancia de Cook</i>	0.001	0.298	0.098	0.115	11
<i>Valor de influencia centrado</i>	0.001	0.22	0.091	0.076	11

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Análisis de datos en IBM Statistics SPSS 22.0

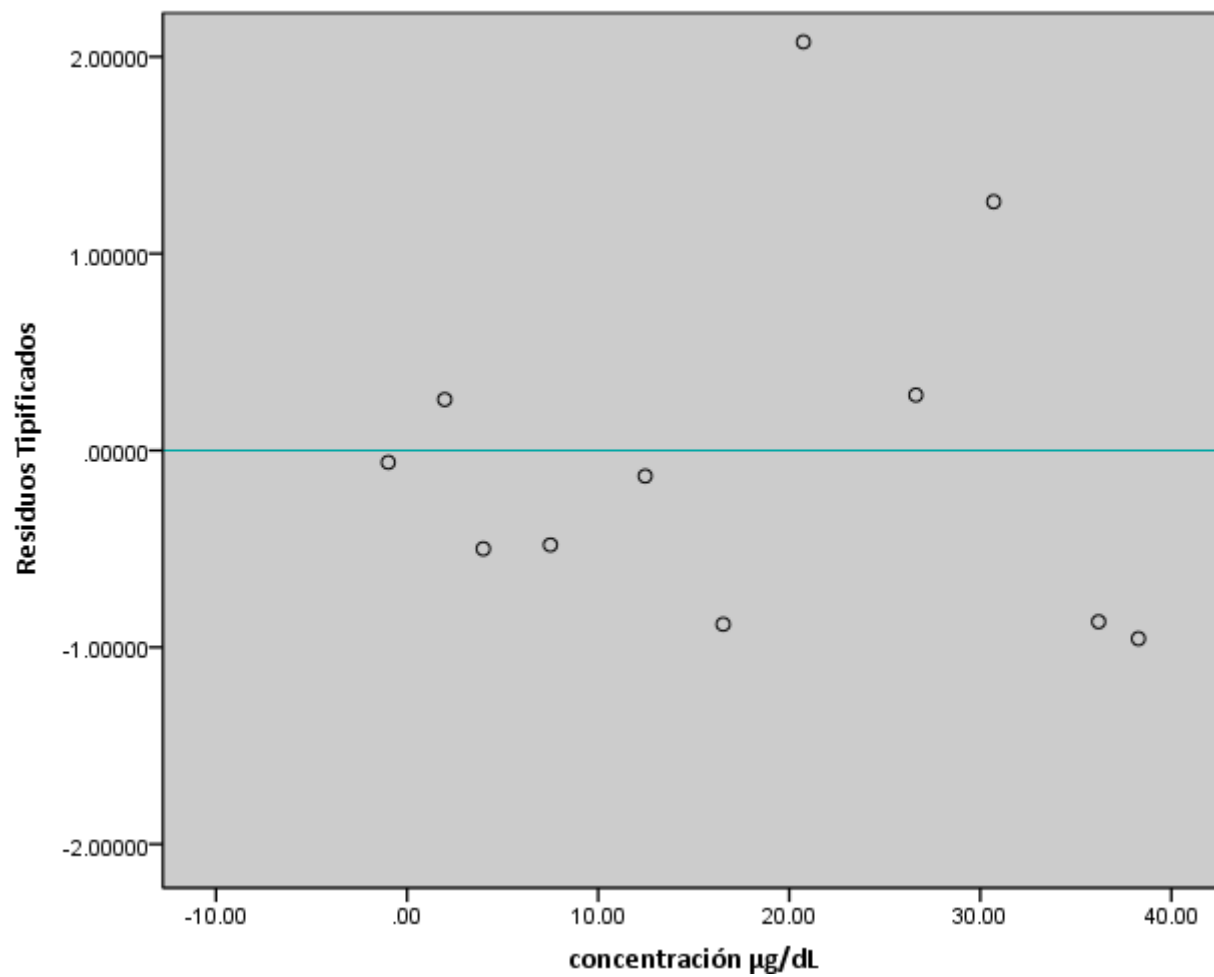


Gráfica 1: Recta de calibración con estándares acuosos



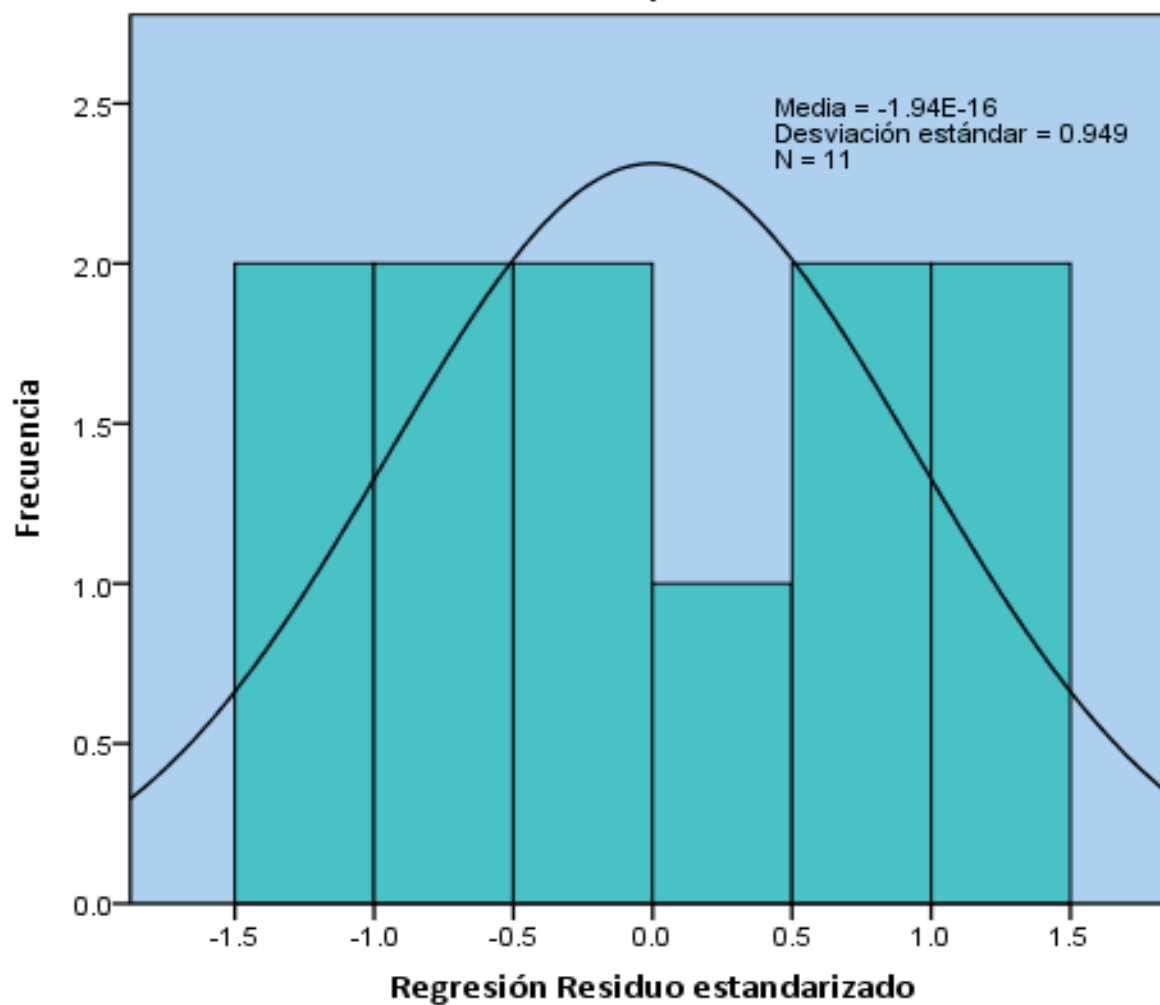
Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

Gráfica 2: Gráfica de residuales tipificados de la recta de calibración con estándares acuosos.



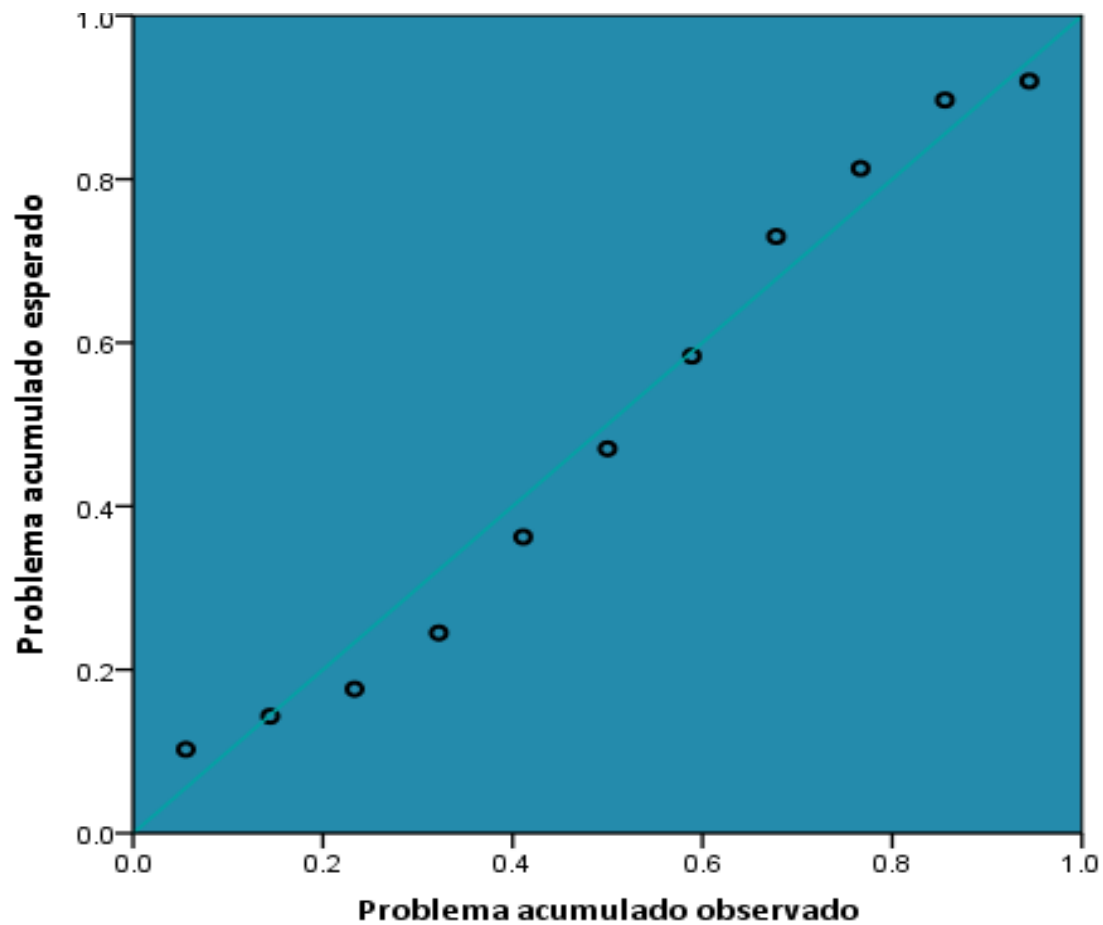
Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Análisis de datos en IBM Statistics SPSS 22.0

Gráfica 3. Histograma de los residuos tipificados de la curva de calibración con estándares acuosos de plomo.



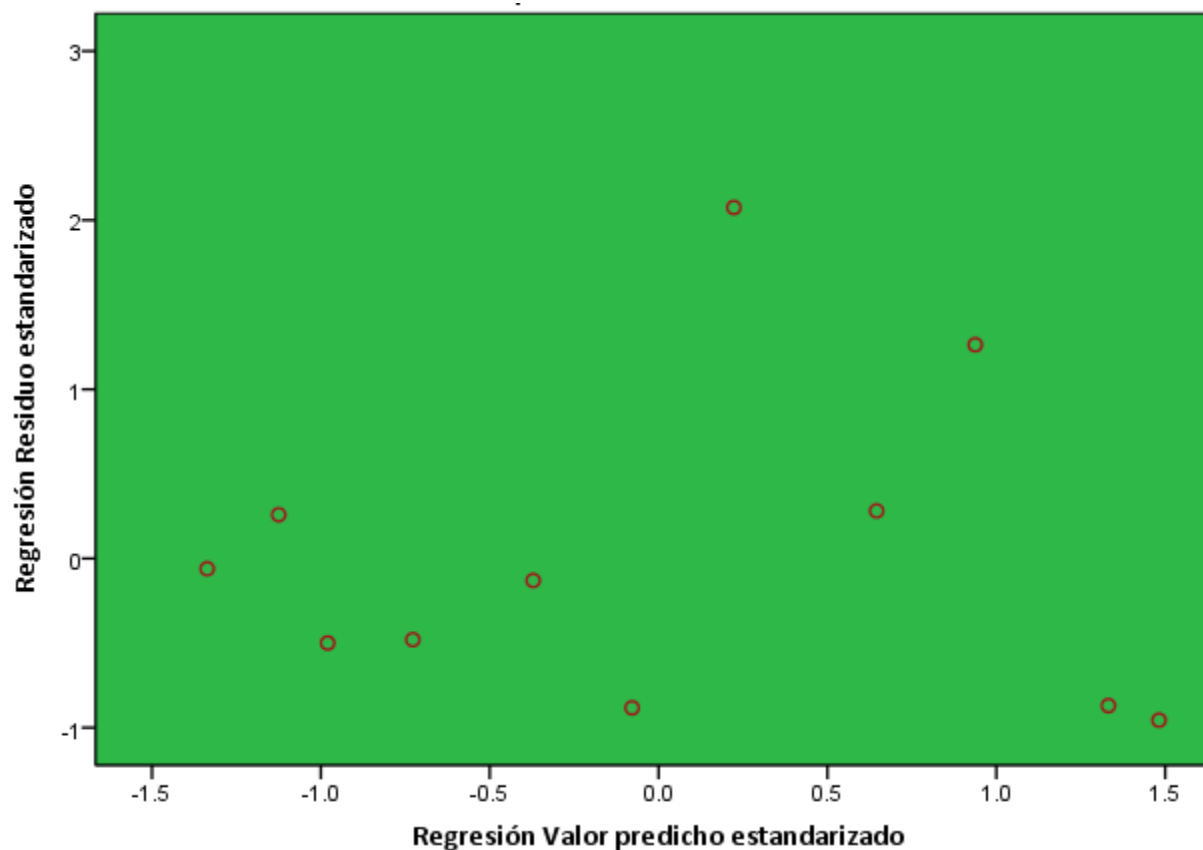
Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Análisis de datos en IBM Statistics SPSS 22.0

Gráfica 4. Gráfico de probabilidad normal de regresión residuo estandarizado para la recta de calibración.



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Análisis de datos en IBM Statistics SPSS 22.0.

Gráfica 5. Diagrama de dispersión de *pronósticos tipificados* por *residuos tipificados* de la recta de calibración con estándares acuosos de plomo.



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Análisis de datos en IBM Statistics SPSS 22.0.

Seguidamente se evaluaron muestras biológicas fortificadas con distintas concentraciones de plomo, tomando en cuenta los valores normales de plomo en sangre 4 – 30  $\mu\text{g}/\text{dL}$  (Repetto, 2013) para adultos expuestos y  $\leq$  a 10  $\mu\text{g}/\text{dL}$  para niños, realizando tres niveles por debajo y dos niveles por arriba de lo normal con 3 réplicas de cada concentración (tabla 5). Los resultados de las muestras fortificadas fueron corregidos previamente por la recta de calibración con acuosos. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de regresión lineal (gráfica 6) obteniendo un coeficiente de correlación  $R = 0.9999$ , una pendiente ( $m$ ) = 0.00427 y un intercepto ( $\beta$ ) de 0.00414, con un valor de  $p = 5.15011\text{E}-25$  según el análisis de varianza de un solo factor (tabla 6). La incidencia de los puntos de influencia sobre la ecuación de regresión lineal de las muestras fortificadas se evaluó a través de las distancias de Mahalanobis, Cook y valores de influencia (tabla 7). También se muestra un análisis gráfico de los residuales (gráfica 7), observándose una distribución normal de los mismos, a parte de la útil inspección visual de los gráficos de residuales, hemos aplicado el estadístico de Durbin-Watson que examina los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en que se han introducido los datos (tabla 8).

**Tabla 5. Valores medios de la concentración y absorbancia de las muestras fortificadas corregidas por la recta de calibración con estándares acuosos.**

<i>Muestra (sangre + Std de Pb)</i>	$\bar{x}$ <i>Concentración <math>\mu\text{g}\%</math></i>	$\bar{x}$ <i>Absorbancia</i>
Blanco	0.074	0.0045
Sangre + Std 2 $\mu\text{g}\%$	2.167	0.0133
Sangre + Std 4 $\mu\text{g}\%$	4.481	0.0233
Sangre + Std 8 $\mu\text{g}\%$	8.169	0.0393
Sangre + Std 12 $\mu\text{g}\%$	13.147	0.0603
Sangre + Std 16 $\mu\text{g}\%$	17.513	0.0787
Sangre + Std 20 $\mu\text{g}\%$	20.807	0.0930
Sangre + Std 26 $\mu\text{g}\%$	27.843	0.1233
Sangre + Std 30 $\mu\text{g}\%$	30.407	0.1340
Sangre + Std 36 $\mu\text{g}\%$	37.827	0.1657
Sangre + Std 40 $\mu\text{g}\%$	41.140	0.1800

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

Tabla 6. Análisis de varianza de la regresión lineal de las muestras fortificadas con plomo y sus residuos

<i>Origen de las Variaciones</i>	<i>SC</i>	<i>g.L</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad*</i>
Regresión	0.037600553	1	0.037600553	1663876	5.15011E-25
Residuales	2.03384E-07	9	2.25982E-08		
Total	0.037600756	10			

\*  $\alpha = 0.05$  SC = suma de cuadrados, g.L = grados de libertad, CM = cuadrado medio, F = F de Fisher.

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Análisis de datos en IBM Statistics SPSS 22.0

Tabla 7. Puntos de influencia (distancias) de las muestras de sangre fortificadas con estándares acuosos de plomo.

	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Media</i>	<i>SD</i>	<i>N</i>
<i>Valor pronosticado</i>	0.00446	0.17994	0.083209	0.061311	1
<i>Valor pronosticado estándar</i>	-1.284	1.578	0	1	11
<i>Error estándar de valor pronosticado</i>	0	0	0	0	11
<i>Valor predicho corregido</i>	0.004446	0.179909	0.083207	0.0613099	11
<i>Residuo</i>	-0.0002787	0.0002493	0	0.0001409	11
<i>Residuo estándar</i>	-1.876	1.679	0	0.949	11
<i>Residuo estudentizado</i>	-1.968	1.813	0.006	1.021	11
<i>Residuo eliminado</i>	-0.0003067	0.0002909	0.0000018	0.0001637	11
<i>Residuo estudentizado suprimido</i>	-2.459	2.145	-0.001	1.182	11
<i>Distancia de Mahal.</i>	0.005	2.489	0.909	0.815	11
<i>Distancia de Cook</i>	0	0.274	0.078	0.09	11
<i>Valor de influencia centrado</i>	0	0.249	0.091	0.082	11

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Análisis de datos en IBM Statistics SPSS 22.0

**Tabla 8. Prueba de Durbin-Watson**

<b>Estándar de Plomo (<math>\mu\text{g/dL}</math>)</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>Residuales</b>
<b>0.074</b>	0.0045	3.90211E-05
<b>2.167</b>	0.0133	-0.000103661
<b>4.481</b>	0.0233	9.39938E-06
<b>8.169</b>	0.0393	0.000251822
<b>13.147</b>	0.0603	-1.749E-05
<b>17.513</b>	0.0787	-0.000271933
<b>20.807</b>	0.0930	-4.60814E-05
<b>27.843</b>	0.1233	0.000191468
<b>30.407</b>	0.1340	-6.36372E-05
<b>37.827</b>	0.1657	-6.67897E-05
<b>41.140</b>	0.1800	7.78809E-05
<b>DW*</b>	1.989	
<b>valor-p</b>	0.679	
<b>Alfa</b>	0.05	

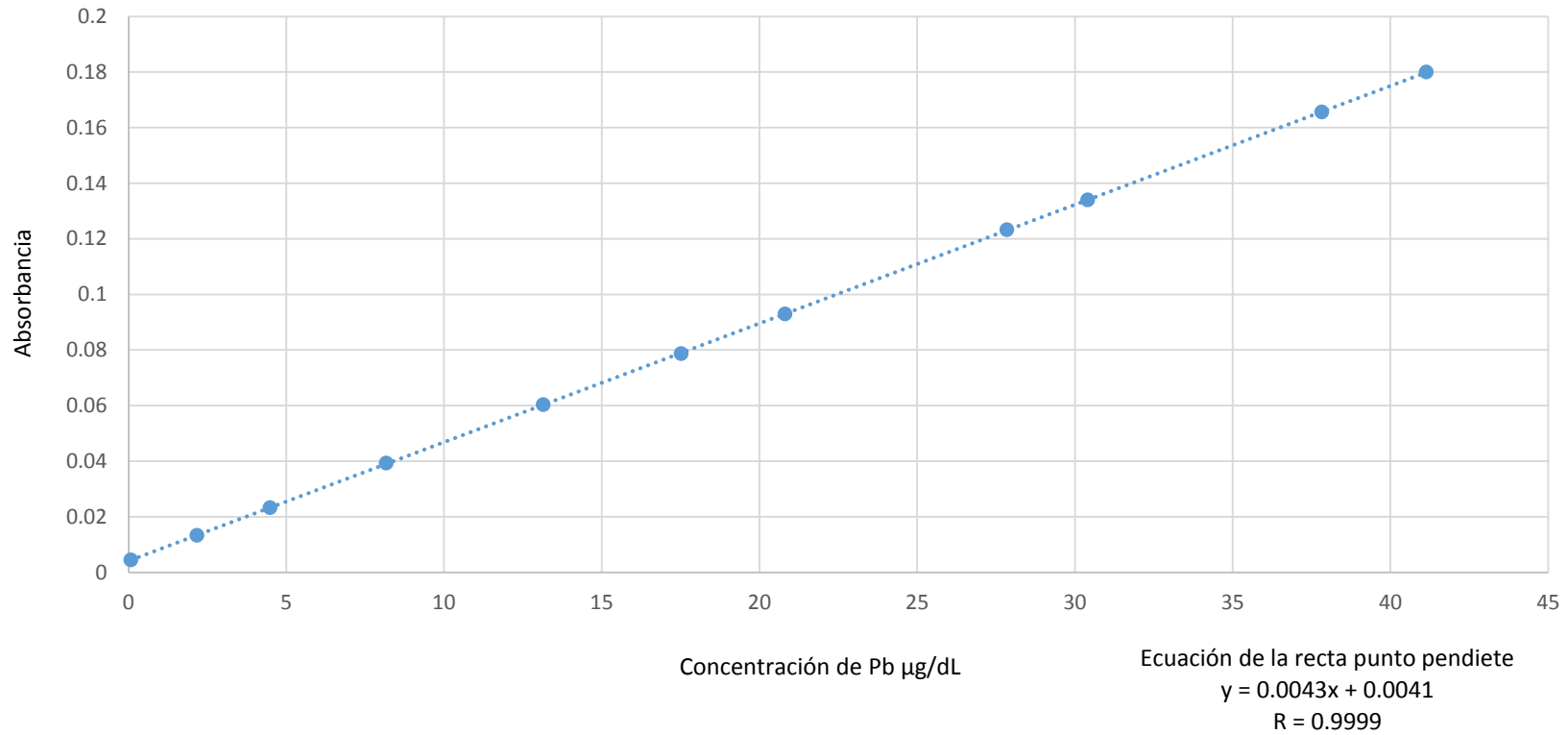
\* DW = Estadístico de Durbin-Watson.

**Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Análisis de datos en xlstat.**

La normalidad de los datos para la curva de regresión lineal de las muestras contaminadas se evaluó a través de un Histograma y un Gráfico de probabilidad normal (gráfica 8 y 9). La homocedasticidad o igualdad de varianzas se comprobó a través de una gráfica de dispersión entre los pronósticos tipificados y los residuos tipificados (gráfica 10).

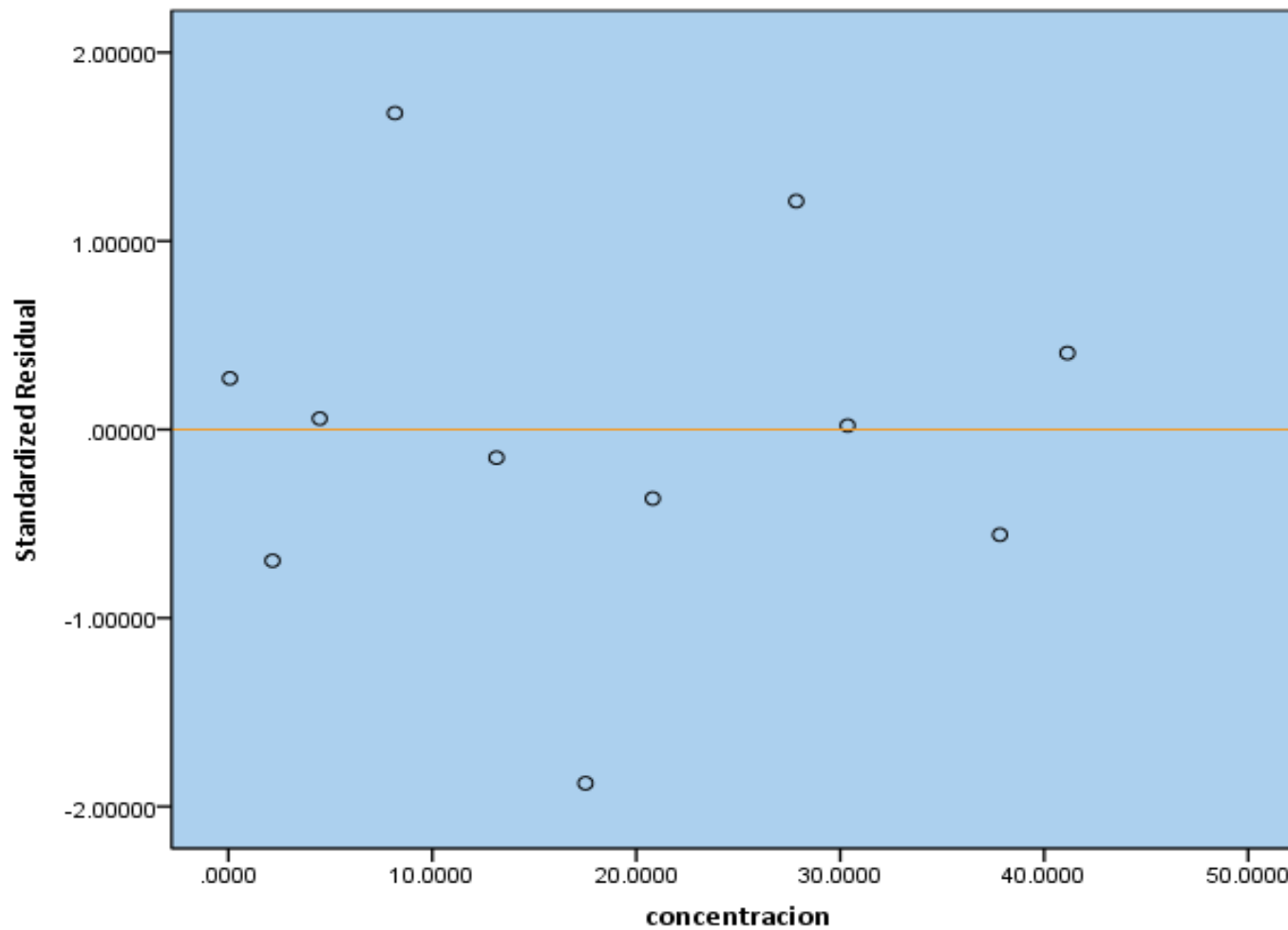


Gráfica 6. Evaluación de la linealidad en muestras de sangre fortificadas con estándares de Plomo



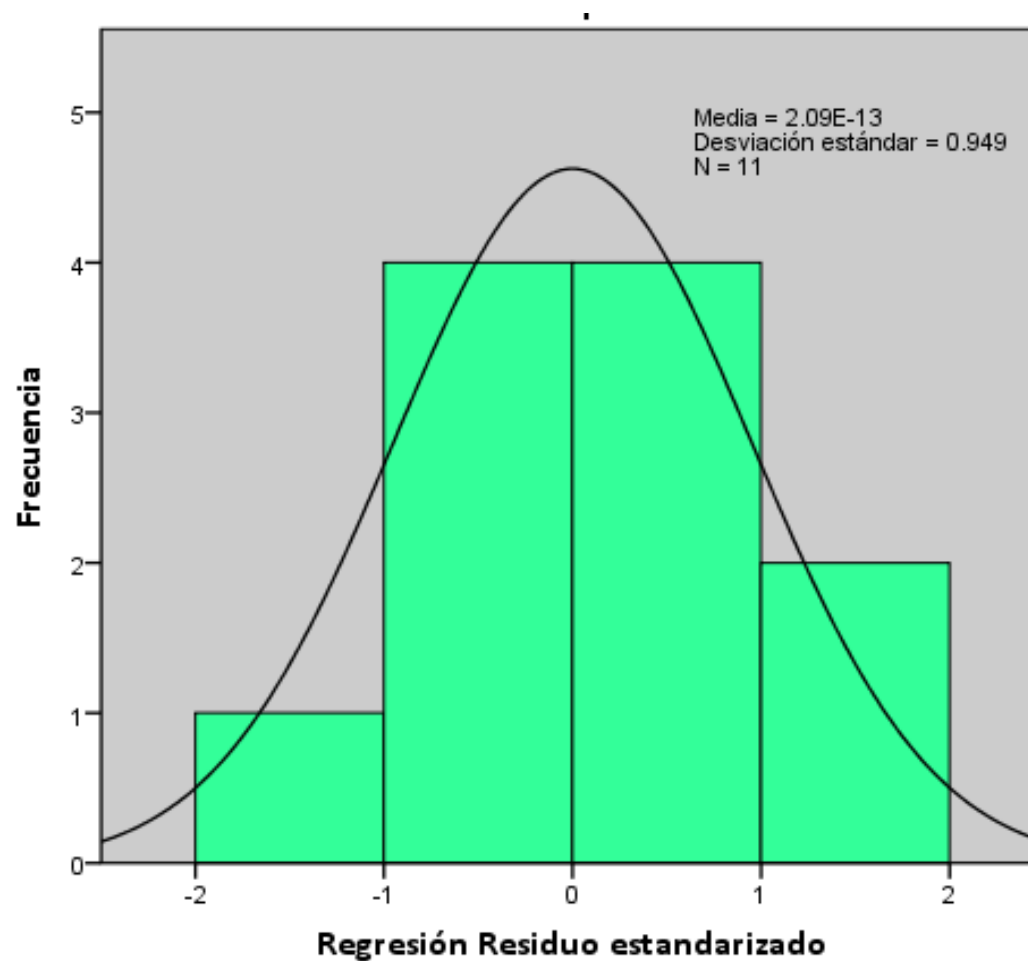
Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

Gráfica 7. Dispersión de los *residuales tipificados* de las muestras de sangre fortificadas vs. las *concentraciones de plomo*.



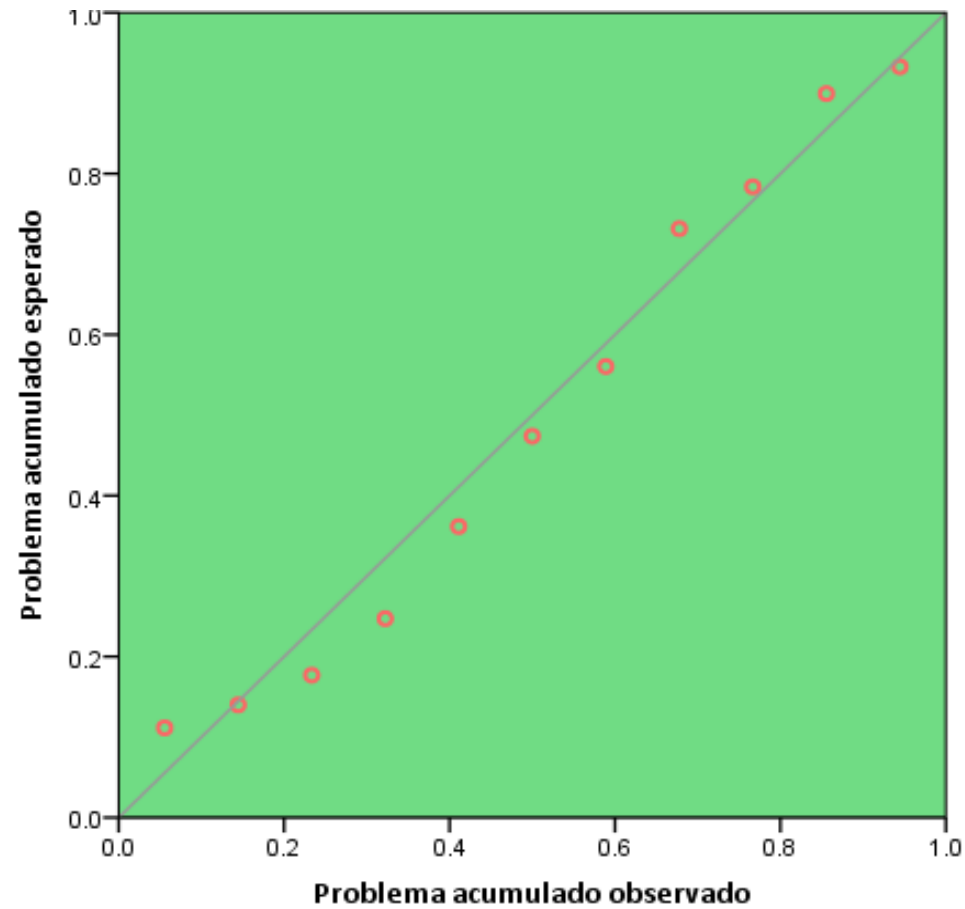
Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Análisis de datos en IBM Statistics SPSS 22.0

Gráfica 3. Histograma de los residuos tipificados de la recta de muestras de sangre fortificadas con estándares acuosos de plomo.



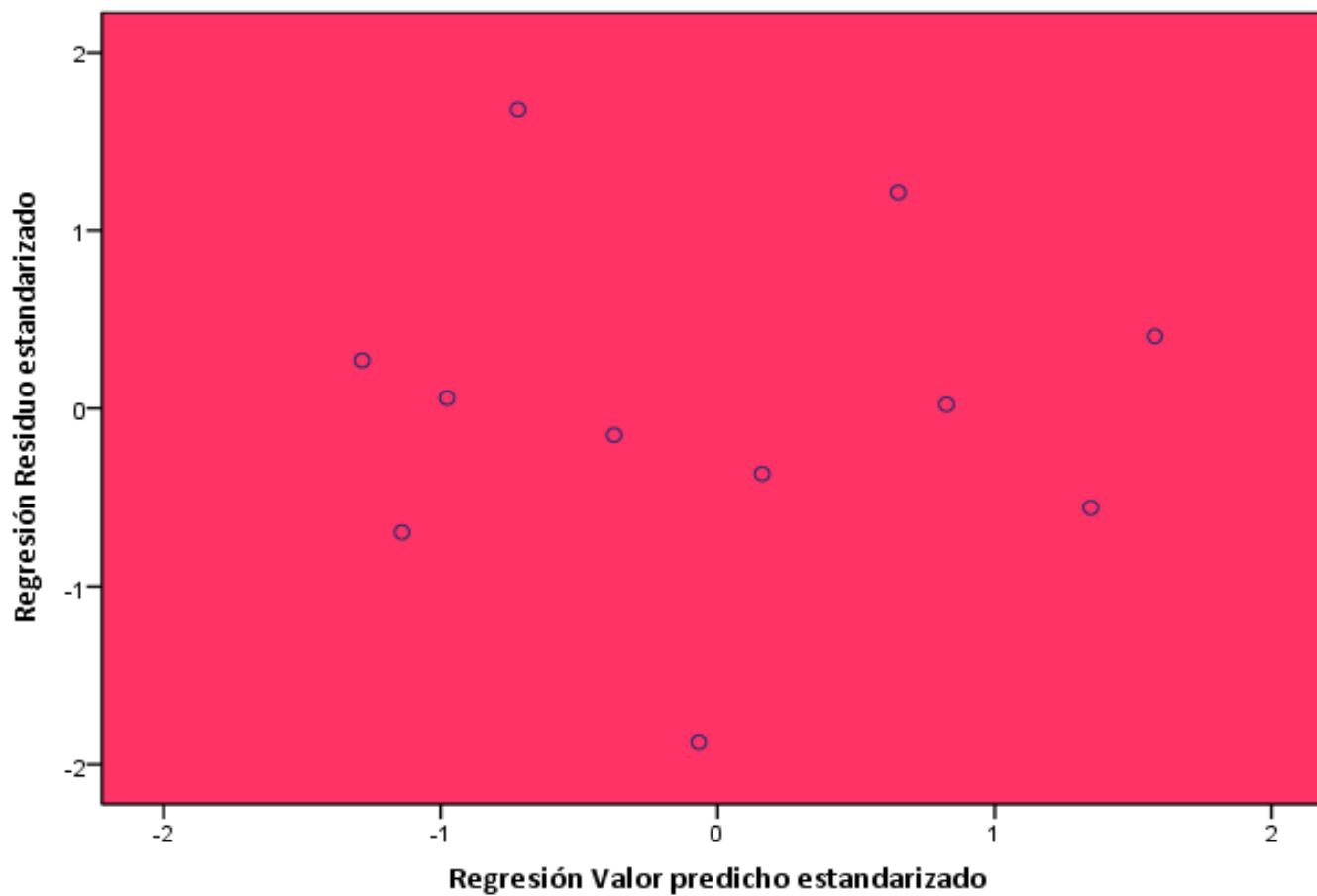
Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Análisis de datos en IBM Statistics SPSS 22.0

Gráfica 4. Gráfico de probabilidad normal de regresión residuo estandarizado para muestras de sangre fortificadas con estándares de plomo.



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Análisis de datos en IBM Statistics SPSS 22.0

Gráfica 10. Diagrama de dispersión de *pronósticos tipificados* por *residuos tipificados* para la regresión lineal de muestras de sangre fortificadas con estándares de plomo



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Análisis de datos en IBM Statistics SPSS 22.0

## 8.2 EXACTITUD Y PRECISIÓN

Para evaluar la exactitud del método se calculó el % de recuperación de cada repetición obteniéndose un rango de 100.18% a 103.51% (tabla 9), con una media para todos los niveles de concentraciones de 100.83%.

Se obtuvieron desviaciones estándar de 0.04 a 4.36 y coeficientes de variación en un rango de 0.04% a 4.21%. También se pudo determinar la exactitud del método en términos de veracidad a través del sesgo absoluto en un rango de 0.17 % para la concentración de 40  $\mu\text{g/dL}$  y de 3.55% para la concentración de 2  $\mu\text{g/dL}$ .

Utilizando un análisis t-student se obtuvieron los intervalos de confianza al 95% (inferior y superior) para cada uno de los porcentajes de recuperación obtenidos según los distintos niveles de concentración (tabla 10)

Se aplicó además un análisis de varianza a fin de comprobar que no existe diferencia estadísticamente significativa entre el porcentaje de recuperación de plomo a distintas concentraciones y su variación entre grupos, encontrándose un valor de  $p = 0.66645$  (tabla 10 y 11).

**Tabla 9: Parámetros de calidad para la exactitud y precisión según el método analítico propuesto.**

<b># Replicas</b>	<b>STD [2 µg%]</b>	<b>STD [4 µg%]</b>	<b>STD [8 µg%]</b>	<b>STD [12 µg%]</b>	<b>STD [ 16 µg%]</b>	<b>STD [20 µg%]</b>	<b>STD [26 µg%]</b>	<b>STD [30 µg%]</b>	<b>STD [36 µg%]</b>	<b>STD [40 µg%]</b>
<b>1</b>	2.250	4.392	8.032	13.11	17.75	20.41	27.99	30.36	38.19	41.13
<b>2</b>	2.182	4.708	8.409	13.28	17.40	20.99	27.70	30.39	37.69	41.14
<b>3</b>	2.070	4.343	8.067	13.05	17.39	21.02	27.84	30.47	37.60	41.16
<b>[ <math>\bar{X}</math> ]</b>	2.167	4.481	8.169	13.147	17.513	20.807	27.843	30.407	37.827	41.140
<b>Valor diana</b>	2.09	4.41	8.09	13.07	17.44	20.73	27.77	30.33	37.75	41.07
<b>SD</b>	0.0909	0.1981	0.2083	0.1193	0.2050	0.3438	0.1450	0.0569	0.3178	0.0153
<b>CV%</b>	4.19	4.42	2.55	0.91	1.17	1.65	0.52	0.19	0.84	0.04
<b>SESGO</b>	3.55%	1.58%	0.96%	0.58%	0.42%	0.37%	0.26%	0.25%	0.20%	0.17%
<b>Recuperación (%)*</b>	<b>103.51%</b> SD: 4.36 CV:4.21%	<b>101.61%</b> SD: 4.49 CV:4.42%	<b>100.97%</b> SD: 2.57 CV:2.55%	<b>100.56%</b> SD: 0.91 CV:0.90%	<b>100.42%</b> SD: 1.18 CV:1.17%	<b>100.35%</b> SD: 1.69 CV:1.68%	<b>100.26%</b> SD: 0.52 CV: 0.52%	<b>100.24%</b> SD: 0.19 CV:0.20%	<b>100.19%</b> SD: 0.85 CV:0.84%	<b>100.18%</b> SD:0.04 CV:0.04%

\* Nota: El porcentaje de recuperación para concentraciones de analito de 100 ppb-1ppm es de 80-110% según la AOAC Internacional (Asociación de Químicos Analíticos Oficiales). SD = Desviación estándar. CV% = Coeficiente de variación

**Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.**

**Tabla 10. Porcentajes de recuperación según los distintos niveles de concentración de plomo**

Réplica	2 µg/dL	4 µg/dL	8 µg/dL	12 µg/dL	16 µg/dL	20 µg/dL	26 µg/dL	30 µg/dL	36 µg/dL	40 µg/dL
1	107.67	99.59	99.28	100.31	100.41	98.45	100.90	100.09	101.17	100.15
2	104.40	106.76	103.94	101.61	99.77	101.25	99.86	100.19	99.84	100.17
3	99.04	98.48	99.72	99.85	99.71	101.39	100.36	100.46	99.60	100.22
<b>IC 95%</b>	<b>103.51</b> <b>± 8.01</b>	<b>101.61</b> <b>± 8.25</b>	<b>100.97</b> <b>± 4.72</b>	<b>100.56</b> <b>± 1.67</b>	<b>100.42</b> <b>± 2.17</b>	<b>100.35</b> <b>± 3.10</b>	<b>100.26</b> <b>± 0.96</b>	<b>100.24</b> <b>± 0.35</b>	<b>100.19</b> <b>± 1.56</b>	<b>100.18</b> <b>± 0.073</b>

\* Nota: Los resultados se expresan en %

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

**Tabla 11. Análisis de varianza para contrastar el porcentaje de recuperación a diferentes niveles de concentración.**

Origen de las variaciones	SC	g.L	CM	F	Probabilidad	F crit
Entre grupos	0.003383	9	0.000376	0.743444	0.66645	2.392814
Dentro de los grupos	0.010112	20	0.000506			
<b>Total</b>	<b>0.013495</b>	<b>29</b>				

\*  $\alpha = 0.05$  SC = suma de cuadrados, g.L = grados de libertad, CM = cuadrado medio, F = F de Fisher.

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Análisis de datos por IBM Statistics SPSS 22.0

Para evaluar el perfil de precisión se determinaron los parámetros de calidad como la desviación estándar en un rango de 0.015 a 0.34 y para el coeficiente de variación un rango de 0.04% a 4.19%, tomando en cuenta para ambos casos todas las concentraciones (tabla 9), sin embargo también se determinó la repetibilidad del método realizando 10 repeticiones del estándar de 30 µg/dL, se obtuvo un valor medio de 30.4 µg/dL, con una desviación estándar de 0.2352 y un CV de 0.77% (tabla 12).



**Tabla 12: Evaluación de la repetibilidad del método analítico para el STD [30 µg/dL]**

<b>Repetición</b>	<b>Concentración (Mx + STD 30 µg/dL)</b>	<b>Absorbancia</b>
1	30.36	0.134
2	30.39	0.134
3	30.47	0.134
4	30.26	0.133
5	30.89	0.136
6	30.23	0.133
7	30.28	0.134
8	30.56	0.135
9	30.13	0.133
10	30.08	0.133
<b><math>\bar{X}</math></b>	<b>30.365 µg/dL</b>	<b>0.1339</b>
<b>SD</b>	<b>0.2352</b>	<b>0.0009944</b>
<b>CV</b>	<b>0.77%</b>	<b>0.74%</b>

\* SD = Desviación estándar. CV% = Coeficiente de variación

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

### 8.3 LÍMITE DE DETECCIÓN DEL MÉTODO (LD)

Dada la gran dificultad de disponer de una sangre libre de plomo se procedió a estimar el límite de detección con un blanco de calibración, para calcularlo se toman no menos de 10 réplicas del blanco de calibración, los resultados obtenidos se observan en la tabla 13. Así el LD que se obtuvo luego de analizar los datos es de 0.657 µg/dL (tabla 14). Las muestras por debajo del LD se corrigen asignando un valor igual al LD dividido la  $\sqrt{2}$  (Departamento de salud ambiental y servicios humanos de Atlanta, 2003).

### 8.4 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN DEL MÉTODO (LC)

El LC es estrictamente la menor concentración del analito que puede ser determinada con un aceptable nivel de repetibilidad y exactitud. El límite de cuantificación que se obtuvo para este modelo fue de 1.990 µg/dL (tabla 14).

**Tabla 13: Valores de las absorbancias de 10 réplicas de un blanco de calibración para las muestras de sangre fortificadas**

Absorbancia del Blanco
0.005
0.003
0.005
0.005
0.006
0.004
0.004
0.004
0.004
0.004
0.005
$\bar{x} = 0.0045$
$SD = 0.00085$

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

**Tabla 14: Límite de detección y Límite de cuantificación para la determinación de Pb en sangre por GFAA.**

<b>LD</b>	<b>0.657 <math>\mu\text{g/dL}</math></b>
<b>LC</b>	<b>1.990 <math>\mu\text{g/dL}</math></b>

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

### 8.5 ESPECIFICIDAD

Los resultados de la mezcla de 3 sangres se muestran en la tabla 16. En los datos obtenidos no se observan diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes en ninguna de las tres adiciones estándar en relación a la calibración con acuosos ese mismo día, por lo que parece no existir efecto matriz en el método. Para el análisis se utilizó el estadístico F de Fisher y una probabilidad  $p = 0.999$  (tabla 16).

**Tabla 15: Absorbancia de la muestra y de los estándares acuosos con sus correspondientes adiciones**

<b># STD</b>	<b>Adición STD</b>	<b>Absorbancia1</b>	<b>Absorbancia 2</b>	<b>Absorbancia 3</b>	<b>Absorbancia. STD acuosos</b>
<b>Blanco</b>	0 µg/dL	0.005	0.003	0.005	0.0000
<b>1</b>	2 µg/dL	0.014	0.014	0.013	0.0126
<b>2</b>	4 µg/dL	0.023	0.024	0.023	0.0212
<b>3</b>	8 µg/dL	0.039	0.040	0.039	0.0362
<b>4</b>	12 µg/dL	0.060	0.061	0.060	0.0574
<b>5</b>	16 µg/dL	0.080	0.078	0.078	0.0748
<b>6</b>	20 µg/dL	0.091	0.094	0.094	0.0928
<b>7</b>	26 µg/dL	0.124	0.123	0.123	0.1179
<b>8</b>	30 µg/dL	0.134	0.134	0.133	0.1353
<b>9</b>	36 µg/dL	0.167	0.165	0.165	0.1587
<b>10</b>	40 µg/dL	0.191	0.191	0.180	0.1676
	<b>pendiente</b>	<b>0.00438</b>	<b>0.00443</b>	<b>0.00426</b>	<b>0.00427</b>

**Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.**

**Tabla No. 16: Análisis de varianza de un factor para las absorbancias de las rectas de regresión lineal de las muestras de sangre fortificadas y las absorbancias de la recta de regresión lineal de los estándares acuosos.**

<i>Origen de las Variaciones</i>	<i>SC</i>	<i>g.L</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad*</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0.000171	3	5.07E-05	0.014951845	0.997463228	2.838745398
Dentro de los grupos	0.152464	40	0.003812			
Total	0.152635	43				

\*  $\alpha = 0.05$  SC = suma de cuadrados, g.L = grados de libertad, CM = cuadrado medio, F = F de Fisher.

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Análisis de datos por IBM Statistics SPSS 22.0

### 8.6 RANGO DEL MÉTODO

El rango o intervalo de trabajo se determinó a partir de la concentración de plomo más pequeña 2 µg/dL a la concentración más grande 40 µg/dL. Sin embargo para ser más específicos el intervalo de trabajo es el intervalo de concentraciones de analito en el que puede obtenerse una exactitud, precisión y linealidad adecuadas al objetivo del método, es decir desde el límite de cuantificación hasta el límite de linealidad, como se observa a continuación.

**Tabla 17. Intervalo de trabajo según el Método analítico propuesto**

<b>Intervalo de Trabajo</b>	<b>1.99 µg/dL – 40 µg/dL</b>
-----------------------------	------------------------------

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmaci

## 9. DISCUSIÓN

La validación del método analítico para la determinación de plomo en sangre por espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito es de importancia significativa, debido a las aplicaciones y fundamentos que pueden desarrollarse en el área de la Toxicología ambiental, Toxicología clínica, Toxicología analítica y Toxicología Forense, pues a través de este estudio se proporcionan resultados basados en evidencia científica comprobable.

Beneficiando de esta manera tanto al Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia como a los individuos que directa o indirectamente necesitan una respuesta fiable y segura del análisis de plomo en sangre.

Ahora bien, se sabe que todas las operaciones de un procedimiento de medida suponen introducir errores aleatorios y puede que también sistemáticos. Por tanto sólo la utilización de un método validado permite al analista garantizar una respuesta fiable al problema analítico planteado, en este caso la determinación de plomo presente en muestras de sangre.

En este caso el Laboratorio de Toxicología desarrolló el método para la determinación de plomo en sangre por lo cual se justifica su validación. Dicha validación garantizará la *calidad* de la información analítica, la *trazabilidad* de las medidas y la *comparabilidad* de los resultados, con otros laboratorios de análisis.

Validar un método analítico en términos de calidad es establecer la evidencia documental de que un método conducirá a la obtención de resultados aceptables dentro de las especificaciones de calidad previamente establecidas.

Para llevar a cabo la validación de este método, se evaluaron parámetros de calidad como *linealidad*, *exactitud*, *precisión*, *repetibilidad* y se establecieron el *límite de detección*, el *límite de cuantificación* y el *rango de trabajo* del modelo analítico, a fin de cumplir con los objetivos y la finalidad de esta investigación.

Sin embargo antes de evaluar cada uno de los parámetros de calidad establecidos, es importante mencionar brevemente el fundamento de la técnica instrumental utilizada en la validación del modelo analítico (ver anexos).

Para evaluar la **linealidad**, se preparó una curva de calibración con estándares acuosos de plomo a distintos niveles de concentración desde 2 µg/dL a 40 µg/dL, cubriendo de esta manera el intervalo de concentraciones a evaluar posteriormente en muestras de sangre fortificadas. Sin embargo antes de utilizar niveles de concentración dentro del rango de trabajo requerido por el método propuesto, se evaluó la linealidad con un rango de concentraciones más amplio desde 2 µg/dL hasta 100 µg/dL, con la finalidad de comprobar hasta que concentración la determinación de plomo en sangre por GFAAS (Espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito) es lineal, en este caso se observó linealidad hasta 100 µg/dL. No es necesario utilizar un rango tan amplio de concentraciones durante el análisis rutinario para evaluar la linealidad del modelo de regresión, debido a que el plomo es un metal tóxico que a niveles incluso inferiores a los 10 µg/dL ya es posible observar daños en la salud, por lo que internacionalmente se habla hoy de niveles de plomo en sangre normales menores que 15-20 µg/dL en la población no expuesta (WHO, 1996 ; Ewers, Krause, Schulz, and Wilhelm, 1999), otros como la CDC indica valores < a 10 µg/dL; y de hasta 30-40 µg/dL como límite de tolerancia biológica recomendado para el control de personas expuestas ocupacionalmente (WHO, 1995-1996; ACGH, 2001). Por lo cual se justifica que en la validación del método analítico propuesto se utilicen concentraciones de 2 a 40 µg/dL. Ciertos autores indican que aún este rango es demasiado generoso dada la capacidad de la técnicas espectroscópicas modernas (Palmer, et al, 2006)

El análisis de regresión lineal se utilizó para explorar y cuantificar la relación entre la absorbancia y la concentración desarrollando una ecuación lineal con fines predictivos.

Así la ecuación  $y = 0.0043x + 0.0042$  es la mejor recta de regresión que expresa la mínima distancia vertical que existe en la suma de los cuadrados de las distancias verticales entre cada punto y la recta correspondiente a los estándares acuosos de plomo utilizados en la recta de calibración.

En la gráfica 1 se puede observar con claridad como los puntos evaluados se ajustan perfectamente sobre la recta, sin embargo un análisis gráfico no explica del todo la relación real entre la absorbancia y la concentración de plomo, por lo cual es necesario hacer un análisis estadístico más profundo.

La tabla 1 presenta los estadísticos del modelo de regresión de la recta de calibrado, al analizar el coeficiente de correlación (R) de 0.99842, nos podemos dar cuenta que su cercanía a +1 indica una perfecta relación positiva (creciente) entre la señal y la concentración de plomo. El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) se utiliza para medir la bondad de ajuste lineal, además mide la proporción de variabilidad total de la variable dependiente respecto a su medida que es explicada por el modelo de regresión. El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) obtenido fue de 0.996826, este valor en porcentaje expresa que el 99.7% de la variación de la absorbancia (variable dependiente) esta explicada por la concentración de plomo. Fabrino, et al (2010) determinó un coeficiente de determinación de 0.995.

También fue útil realizar un análisis de varianza (ANOVA) como se observa en la tabla 2, dicha tabla informa sobre si existe o no relación significativa entre las variables.

El estadístico F permite evaluar la hipótesis nula ( $H_0$ ) que expresa que el valor poblacional de la pendiente ( $\beta_1$ ) de la recta de regresión vale cero [ $H_0: \beta_1 = 0$ ]. Por tanto es improbable que  $\beta_1$ , para este caso, tome el valor de 0 debido a que  $p < 0.05$ . Dadas estas circunstancias se rechazó la hipótesis nula, lo cual implica que el coeficiente de regresión ( $\beta_1$ ) es distinto de cero, permitiendo concluir que entre absorbancia y concentración existe relación lineal estadísticamente significativa.

Como parte del análisis gráfico de la regresión lineal, se construyó un gráfico de residuales (gráfica 2), observando que la calibración es lineal ya que los residuales representados frente a la concentración se distribuyen de forma aleatoria a un lado y otro de la línea que representa la desviación cero con respecto al dato esperado de la recta de regresión, ningún residuo tipificado se aleja de cero más de 3 desviaciones estándar, en otras palabras el 99.9% de ellos se encuentra en el rango  $[-3, +3]$ .

En la tabla 4 se muestra un análisis estadístico de los residuales de la regresión lineal con estándares de plomo, es fácil identificar que ningún valor se aleja a  $\pm 3$  desviaciones estándar. Los residuos tipificados indican un valor mínimo de -0.956 y un valor máximo de 2.075.

Existen otros supuestos del modelo estadístico que se refieren a una serie de condiciones que deben darse para garantizar la validez del modelo de regresión lineal. Es importante mencionar que el verdadero interés de los residuos hay que buscarlo en el hecho de que el análisis de los mismos nos proporciona información crucial sobre el cumplimiento de varios supuestos del modelo de regresión lineal. Por tanto se determinó la *independencia*, la *normalidad* y la *homocedasticidad* de los datos obtenidos.

Para evaluar la *independencia* de los datos es necesario hacer uso del estadístico de Durbin-Watson, dicho valor se puede observar en la tabla 1, su interpretación indica la autocorrelación de los residuos cuando se trabaja con series temporales. Además proporciona información sobre el grado de independencia existente entre ellos. El resultado de este estadístico ha sido de 2.096; como este valor se halla entre 1.5-2.5, se pudo determinar independencia entre los residuos, por lo que no se puede descartar estadísticamente la linealidad del modelo.

Trasobares (2010) en su trabajo de tesis encontró un valor para el estadístico de Durbin-Watson de 1.86 y una probabilidad de  $p = 0.179$ . Un valor de Durbin-Watson aproximado a 2 indica que se cumple correctamente el principio de que los términos de los residuos NO están correlacionados entre sí (Pedroza y Dicoovsky, 2006), como sucedió durante la validación del método analítico propuesto.

Al momento de evaluar el supuesto de *normalidad* se utilizó un histograma y un gráfico de probabilidad de normalidad de los residuos tipificados (grafica 3 y 4), estos diagramas informan sobre el grado en el que los residuos tipificados se aproximan a una distribución normal.

En el histograma de los residuos tipificados se observa una curva normal superpuesta, la curva se construyó tomando una media de 0 y una desviación típica de 1, es decir, la misma media y la



misma desviación típica que los residuos tipificados. Observando como la frecuencia acumulada se encuentra por debajo de la campana de distribución normal además existe simetría dentro de la curva. La distribución de los residuos, por tanto, parece seguir el modelo de probabilidad normal.

El gráfico de probabilidad de normalidad permite obtener un diagrama de probabilidad normal, cuando los residuos se distribuyen normalmente la nube de puntos se encuentra alineada sobre la diagonal del gráfico, dicha alineación puede ser observada en la gráfica 4, aunque pueden detectarse ciertos puntos que no están del todo alineados sobre la diagonal, sin embargo no son estadísticamente significativos para rechazar el supuesto de normalidad del modelo de regresión lineal.

Para evaluar el supuesto de *homocedasticidad* se utilizó un gráfico de dispersión en el cual se evalúan los pronósticos tipificados y los residuos tipificados como se observa en la gráfica 5. El supuesto de homocedasticidad o igualdad de varianzas implica que la variación de los residuos debe ser uniforme en todo el rango de valores pronosticados, situación que se observa perfectamente en el gráfico. O, lo que es lo mismo, que el tamaño de los residuos sea independiente del tamaño de los pronósticos, así se observa que el rango de los pronósticos es de  $[-1, 3.0]$  mientras que para los residuos el rango es de  $[-1.5, 1.5]$ , de donde se puede afirmar que el diagrama de dispersión no muestra ninguna pauta de asociación entre los pronósticos y los residuos, ambos parecen ser independientes.

De esta forma queda demostrada la validez del modelo de regresión lineal. Los resultados estadísticos indican que se cumplen los supuestos de linealidad demostrando que no existen diferencias significativas en la recta de calibrado acuoso, por lo tanto, las determinaciones de muestras biológicas se pueden realizar a través de dicha recta.

Para las determinaciones en sangre se realizaron lecturas tomando en cuenta los valores normales de plomo para personas expuestas y no expuestas. Evaluando concentraciones dentro de este rango se construyó una recta de regresión lineal para muestras biológicas contaminadas

con estándares de plomo, cabe mencionar que los valores que se observan en la tabla 5 fueron corregidos por la recta de calibración previamente evaluada.

En la gráfica 6 se muestra como los puntos evaluados se distribuyen sobre la recta de regresión lineal, además se obtuvo un  $R = 0.999$  y un  $R^2 = 0.9998$ . La interpretación de estos valores demuestra correlación positiva perfecta, además a través del valor de  $R^2$  obtenido se indica que el 99.9% de la variabilidad de la “absorbancia”, se debe o se explica por la influencia de la variable “concentración de plomo”.

También se realizó una prueba de hipótesis utilizando el estadístico F, los resultados se observan en la tabla 6. Se estableció la hipótesis nula indicando que la pendiente de la recta de regresión lineal para muestras de sangre fortificada es igual a cero [ $H_0: \beta_1 = 0$ ]. Debido a que  $p < \alpha$  ( $p = 0.0000'$ ) se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa [ $H_a: \beta_1 \neq 0$ ]. Afirmando que no existe diferencia entre la regresión y sus residuos. Por tanto se acepta que el efecto de regresión de la variable independiente “concentración de plomo” es significativo sobre la variable dependiente “absorbancia”.

La gráfica 7 muestra el diagrama de dispersión de residuos tipificados frente a las concentraciones de plomo, se observa que los puntos se distribuyen aleatoriamente a un lado y otro de la desviación cero, confirmando que la recta de regresión para muestras biológicas es lineal. De igual forma que en la recta de calibración de estándares acuosos de plomo, se evaluó la *independencia, normalidad y homocedasticidad*.

La hipótesis nula para evaluar la *independencia* de los residuos se evaluó de la siguiente manera [ $H_0: \rho = 0$ ] indicando que los residuos no son autocorrelacionados.

El estadístico de Durbin-Watson (DW) encontrado fue de 1.989 (tabla 8) del cual se deduce que los residuos son independientes. Debido a que  $p > 0.05$  no se puede rechazar la hipótesis nula, utilizando la tabla de significancia de Durbin-Watson donde  $n = 10$  y  $k = 1$  se pudo determinar un  $d_L = 0.879$  y un  $d_U = 1.320$ , puesto que el estadístico  $DW > d_U$  no se puede rechazar la hipótesis nula. Concluyendo que los residuos no presentan autocorrelación de primer orden, sino más bien

los residuos son independientes entre sí, por lo cual no se puede descartar la linealidad del método analítico propuesto.

La *normalidad* de los residuos se evaluó a través de un histograma y de un gráfico de probabilidad de normalidad (gráfica 8 y 9). En el histograma se puede observar una distribución normal de los residuos, es decir que para cada valor de la concentración de plomo, los residuos se distribuyen normalmente con media cero, además se puede observar simetría para ambas colas de la campana.

El gráfico de probabilidad normal de los residuos para muestras de sangre fortificadas indica que los residuos se distribuyen normalmente, ya que los puntos se encuentran alineados sobre la diagonal del gráfico.

Al momento de evaluar el supuesto de *homocedasticidad* de las muestras biológicas se pudo observar que el tamaño de los residuos es independiente del tamaño de los pronósticos, la inspección visual de la gráfica 9 demuestra que la dispersión de los puntos no muestra ninguna pauta de asociación entre los pronósticos y los residuos. Por lo cual se asume que la varianza de los residuos es constante.

Por último se evaluaron los puntos de influencia del modelo lineal para las muestras de sangre fortificadas con estándares de plomo. Todos los puntos evaluados contribuyen a la obtención de la ecuación de regresión, pero no todos lo hacen con la misma fuerza. Los puntos de influencia son casos que afectan de forma importante al valor de la ecuación de regresión aun así la presencia de estos puntos no tiene por qué constituir un problema en regresión: de hecho, lo normal es que en un análisis de regresión no todos los casos tengan la misma importancia, claro desde el punto de vista estadístico.

La tabla 7 muestra las “distancias” del modelo de regresión lineal, la distancia de *Mahalanobis* mide el grado de distanciamiento de cada caso respecto de los promedios del conjunto de la variable independiente, en este caso, la concentración de plomo. Los valores obtenidos para

dicha distancia fueron, un valor mínimo de 0.005 y máximo de 2.489, con un valor medio de 0.909.

También se determinó la distancia de Cook la cual mide el cambio que se produce en las estimaciones de los coeficientes de regresión al ir eliminando cada caso de la ecuación de regresión. El rango obtenido para la distancia de Cook fue de 0 – 0.274, con una media de 0.078, por lo general una distancia de *Cook* superior a 1 debe ser revisado.

En cuanto al análisis de *valores de influencia* se observa un valor mínimo igual a 0 y un valor máximo de 0.249 con un valor medio de 0.090. Para su interpretación se sabe que valores menores que 0.2 se consideran poco problemáticos; los valores comprendidos entre 0.2 y 0.5 se consideran arriesgados. No se observaron valores mayores que 0.5 los cuales deberían evitarse. Luego del análisis de los puntos de influencia sobre la recta de regresión lineal para muestras de sangre fortificadas con estándares de plomo, podemos afirmar que estos no se alejan de los valores establecidos estadísticamente como aceptables.

Por tanto luego de analizar los resultados, se considera que la linealidad es adecuada para el método analítico validado, ya que tanto la recta de calibración en donde se evaluaron concentraciones de 2 a 40  $\mu\text{g}/\text{dL}$ , como las determinaciones en muestras de sangre cumplen con los requisitos necesarios para alcanzar una adecuada linealidad. Santiago (2007) determinó la presencia de plomo en biomarcadores afirmando que no existen diferencias significativas, por tanto la determinación se pudo realizar a través de la recta de calibrado.

La **exactitud** se determinó a partir del porcentaje de recuperación obtenido en cada muestra de sangre contaminada con plomo. Los resultados obtenidos para cada nivel de concentración se muestran en la tabla 9.

Se puede observar un valor mínimo de 100.18%, que corresponde a la concentración de 40  $\mu\text{g}/\text{dL}$  y un máximo de 103.51%, que corresponde a la concentración de 2  $\mu\text{g}/\text{dL}$ . Al comparar estos valores con otros estudios se encontró que Santiago (2007) evaluó el porcentaje de recuperación utilizando para el análisis materiales de referencia certificados, los porcentajes obtenidos fueron 86.5%, 100.96% y 103.06 %, valores similares a los determinados en esta investigación.

Trasobares (2010) en su investigación de plomo en sangre utilizando la misma técnica instrumental, encontró un valor medio de recuperación de 101%. Para la validación del método analítico propuesto este valor fue de 100.83%.

También fue posible evaluar la exactitud del método a partir de la medición del sesgo, reportando en términos absolutos, se encontraron sesgos con valores desde 0.17% a 3.55% dichos valores no sobrepasan el 5% del error establecido para un nivel de confianza del 95%, como lo propone el método analítico a validar.

Con el objetivo de evaluar la variabilidad de cada una de las lecturas del porcentaje de recuperación (tabla 10) se realizó una prueba de hipótesis a través de un análisis de varianza (tabla 11) utilizando el estadístico F para rechazar o aceptar la hipótesis.

Se establecieron la hipótesis nula [ $H_0: \mu \% \text{ recuperación} = 100\%$ ] y la alternativa [ $H_a: \mu \% \text{ recuperación} \neq 100\%$ ], se determinó que el valor p observado = 0.66645, es mayor que  $\alpha$ , por tanto no se rechaza la hipótesis nula, lo cual indica que el valor medio del % de recuperación es igual al 100%, es decir que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los porcentajes de recuperación obtenidos durante la validación del método. El porcentaje de recuperación para concentraciones de analito de 0.1 ppm-1ppm es de 80-110% según la AOAC.

En la tabla 10 se resumen los intervalos de confianza al 95% para cada uno de los distintos niveles de concentración evaluados.

En cuanto a la **precisión** de los datos analíticos, el objetivo consistió en evaluar el grado de concordancia mutua entre los datos que se han obtenido de una misma forma, la precisión indica la medida del error aleatorio, o indeterminado del análisis. Los parámetros de calidad para la precisión evaluados fueron la desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV%), estos términos se describen en la tabla 9.

Los resultados obtenidos se encuentran dentro de los límites permitidos para la interpretación del coeficiente de variación (< 5%) según (Daniel, 2002) sin embargo otros autores mencionan que una precisión aceptable puede tener valores hasta del 8% (DANE, 2008). El valor mínimo fue de 0.04% y el máximo de 4.19%. En otros estudios se determinaron valores del 8% como mínimo

aplicando corrección de fondo Zeeman con modulación de alta frecuencia polarizada (Ivanenko, Solovgev, Ivanenko y Ganeev, 2012). Santiago (2007), determino un CV% = 8% utilizando ETASS en digeridos de mejillón. Trasobares (2010) encontró valores desde 0.3 a 3.6% para muestras de sangre.

Existe otro parámetro por el cual se puede expresar la precisión del método, para este caso se evaluó la **repetibilidad**, siendo esta una medida de la precisión obtenida bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo, por lo que se realizaron las mediciones en el mismo día, por un mismo analista, en la misma muestra homogénea y en el mismo equipo obteniéndose los resultados observados en la tabla 13, para el estándar de 30 µg/dL, con una media de 30.37 µg/dL, una desviación estándar de 0.2352 y un coeficiente de variación de 0.77%. Otros estudios evaluaron la repetibilidad en materiales de referencia certificados con concentraciones de  $23.7 \pm 3.6$  µg/dL (Fabrino, et al, 2010).

Para establecer el **límite de detección (LD)**, se realizaron los cálculos, utilizando datos de la desviación estándar y la pendiente con respecto a la recta de regresión lineal para muestras con sangre. Así se obtuvo el límite de detección a una concentración de 0.66 µg/dL (tabla 14), es decir que esta es la mínima concentración que el equipo puede detectar según el método analítico utilizado para la validación. Ivanenko, Solovgev, Ivanenko y Ganeev (2012) publicaron un estudio en el cual determinaron un límite de detección de 0.034 µg/dL utilizando corrección de Zeeman polarizada con modulación de alta frecuencia, por lo cual el LD es menor que el obtenido por nuestro método. Trasobares (2010), encontró un valor de 0.043 µg/dL. Fabrino, et al (2010) determino un límite de detección de 0.21 µg/dL. Todos los estudios utilizaron sangre como matriz. Hsieh, et al, (2011) utilizando ablación laser con ICP-MS pudo determinar un LD de 0.013 µg/dL. Otros utilizaron como técnica instrumental la voltamperometría detectando concentraciones de plomo hasta 1.0 µg/dL. Amore (1974) utilizo FAAS y a pesar que la preparación de la muestra fue bastante compleja pues utilizo Triton X-100 para hemolizar, DDC para extraer y MIBK para acomplejar, solo obtuvo un LD de 8.0 µg/dL, confirmando de nuevo que el GFAAS es mucho más sensible.

Para establecer el **límite de cuantificación (LC)** se determinó la desviación estándar del blanco y la pendiente de la recta de regresión lineal, obteniéndose una concentración de 1.99 µg/dL (tabla 14). Es decir que esta es la mínima concentración que el equipo puede determinar con exactitud y precisión. Como se puede observar el valor es muy cercano a la concentración de 2 µg/dL, por lo cual el CV% es muy cercanos a 5%. Por lo que a concentraciones menores al límite de cuantificación, no se puede dar certeza de resultados precisos y exactos.

De hecho en este punto se observa el % de recuperación más alto para los distintos niveles de concentración. Un estudio para determinar plomo en mejillones encontró un LC de 0.20 µg/g (Santiago, 2007). Otros estudios que utilizaron sangre como matriz, determinaron un LC de 0.70 µg/dL y 0.130 µg/dL (Fabrino, et al, 2010; Trasobares, 2010).

La **especificidad** se define como la propiedad de un método de responder exclusivamente al analito definido (Duffau, et al 2010). Muy frecuentemente la eficacia de los métodos depende de la ausencia de interferencias que determina la especificidad. Para verificar la ausencia de interferencias provocadas por la matriz se realizó un análisis de varianza (tabla 15 y 16) indicando que las pendientes de las rectas de regresión por el método de adiciones estándar no difiere estadísticamente de la obtenida con los patrones acuosos. Debido a que el valor de p es mayor que el error  $\alpha$ , no se puede rechazar la hipótesis nula que las pendientes de la rectas de regresión y de calibración son iguales entre sí, y no se observan diferencias significativas por lo que parece no existir efecto matriz en el método.

Con el objetivo de determinar el alcance del método y por lo tanto el **rango** de concentraciones de plomo que pueden detectarse a través de él, se realizaron determinaciones de estándares de plomo a concentraciones mayores a las establecidas dentro de la metodología de trabajo llegando hasta 100 µg/dL con el objetivo de determinar el límite de linealidad del método. Así el intervalo de trabajo para la validación del método analítico con exactitud, precisión y linealidad es de 2.0 – 40 µg/dL.

Por todo lo anterior se puede afirmar **aplicabilidad**, debido a que el método de análisis validado puede utilizarse satisfactoriamente para determinar plomo en sangre en un intervalo de concentraciones de 2 a 40  $\mu\text{g/dL}$ , según las condiciones del equipo y las especificaciones y lineamientos establecidos por el método propuesto. Así se demuestra que el método es apto para su aplicación obteniendo datos válidos, confiables y seguros; garantizando de esta forma la calidad de los resultados del análisis de plomo en sangre y de esta forma contribuir así en el diagnóstico diferencial de una intoxicación por plomo.



## 10. CONCLUSIONES

- 10.1** La validación del método analítico propuesto presentó una adecuada linealidad tanto para la recta de calibración como en las lecturas de las muestras con sangre obteniéndose un R de 0.998 con un  $R^2$  de 0.996 para la recta con estándares acuosos y un R de 0.999 con un  $R^2$  de 0.999 para la recta con muestras fortificadas representando una excelente relación entre la concentración y la absorbancia.
- 10.2** Se evaluaron los supuestos del modelo de regresión lineal observándose independencia, normalidad y homocedasticidad de los residuos tipificados tanto para la recta de calibración como para la recta con muestras fortificadas.
- 10.3** Se determinó la exactitud del método a partir del porcentaje de recuperación en muestras de sangre obteniendo valores de 100.18% a 103.51% con un valor promedio de 100.83% por lo que el método es exacto para el rango de concentraciones establecido.
- 10.4** Se determinó a través de un análisis de varianza con  $\alpha = 0.05$  que no existe diferencia significativa entre los porcentajes de recuperación obtenidos durante la validación del método analítico.
- 10.5** El método cumple con el parámetro de precisión para concentraciones de 2  $\mu\text{g/dL}$  a 40  $\mu\text{g/dL}$  en donde se obtuvieron coeficientes de variación en un rango de 0.04% a 4.19%.
- 10.6** Existe repetibilidad para una concentración de 30  $\mu\text{g/dL}$  de plomo encontrado una media de 30.37  $\mu\text{g/dL}$ , una desviación estándar de 0.24 y un coeficiente de variación de 0.77%.
- 10.7** Se determinó un Límite de detección de 0.66  $\mu\text{g/dL}$  y un Límite de cuantificación de 1.99  $\mu\text{g/dL}$  donde se puede dar certeza de resultados exactos y precisos hasta 2.0  $\mu\text{g/dL}$  para el modelo analítico propuesto.

- 10.8** Se evaluó que no existe interferencia de matriz a través de un análisis de varianza donde se acepta que las pendientes de las rectas de regresión lineal de las muestras biológicas no difieren estadísticamente de la pendiente de la recta de calibración confirmando que el método es específico y selectivo para la determinación de plomo en sangre.
- 10.9** El rango del método se estableció en concentraciones de 2  $\mu\text{g/dL}$  a 40  $\mu\text{g/dL}$  desde la mínima concentración detectada hasta donde se presenta adecuada linealidad, exactitud y precisión.
- 10.10** Se determinó que el método evaluado funciona adecuadamente bajo las siguientes condiciones establecidas: un programa de temperaturas optimizado con temperaturas de atomización para el plomo de 1800 °C y de limpieza de 2600 °C, a una longitud de onda de 283.3 nm, con ancho de rendija de 0.7 L, lámpara de plomo de cátodo hueco con una energía de 48-50 mA y corriente de 10 mA.
- 10.11** El método cumple efectivamente con los parámetros de calidad: linealidad, exactitud, precisión, repetibilidad y especificidad para ser considerado como un método de análisis válido que garantiza la confiabilidad y seguridad de los resultados al momento de un diagnóstico de intoxicación por plomo.

## 11. RECOMENDACIONES

- 11.1** El método, técnica y reactivos utilizados en este estudio dieron resultados confiables y seguros, sin embargo se considera recomendable hacer un estudio utilizando extractores de plomo como el DDC (diethyl- di-tiocarbamato) y formadores de complejos como el MIBK (metil isobutil cetona), además de utilizar sales de paladio y magnesio como modificadores de matriz, con la finalidad de comparar ambos resultados y establecer analíticamente con cuál de las dos metodologías se obtiene un mejor análisis de plomo en sangre.
- 11.2** Realizar otro estudio para evaluar la reproducibilidad del método analítico propuesto en esta investigación, es decir en distintos laboratorios, con diferentes equipos y operarios y además establecer la robustez del mismo.

## 12. REFERENCIAS

- ACGIH. (2004). TLVs and BEIs based on the documentation of the threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices. Cincinnati: ACGIH.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for lead. U S Department of Health and Human Services, Public Health Service 2011. Disponible en URL: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp13.html> [Consultado 3 Octubre 2014].
- Álvarez R. (2007). Estadística aplicada a las ciencias de la salud. Madrid: Ed. Ediciones Días de Santos.
- Amore F. (1974). Determination of cadmium, lead, thallium, and nickel in blood by atomic absorption spectrometry. *Anal Chem*, 46 (1), 1597-1599.
- Aragón C, Ponce C, Coronado V y Giáncoman, G. (2011). Evaluación de un método analítico para la determinación de níquel y plomo en sedimento de mar por espectroscopia de absorción atómica. *Rev Acad FI-UADY*, 15 (1), 1-8.
- Bellinger DC, Bellinger AM. (2006). Childhood lead poisoning: the torturous path from science to policy. *J Clin Invest*, 116(4), 853-7.
- Castro C y Sobrano F. (2010). Detección y Cuantificación de plomo en muestras de sangre venosa de escolares de 12 a 17 años de la urbanización La Primavera del distrito del Agustino mediante el método de espectrofotometría de absorción atómica. Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico. Departamento Académico de Farmacología, Bromatología y Toxicología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
- CITAC (The Cooperation on International Traceability in Analytical Chemistry) and EUACHEM (A focus for Analytical Chemistry in Europe). (1998). the Fitness for Purpose of Analytical Methods. Teddington: EURACHEM Guide.

- CDC. Preventing lead poisoning in young children. A statement by the Centers for Disease Control. U S Department of Health and Human Services 1985. Disponible en URL: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00000659.htm> [Consultado 3 Junio 2014]
- CDC. Preventing lead poisoning in young children. A statement by the Centers for Disease Control. U S Department of Health and Human Services, Public Health Service 1991 Oct. Disponible en URL: <http://www.cdc.gov/nceh/Lead/Publications/books/plpyc/contents.htm> [Consultado 3 Junio 2014]
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Third national report on human exposure to environmental chemicals. Atlanta: CDC 2005. Disponible en URL: <http://www.cdc.gov/exposurereport/report.htm> [Consultado 5 Junio 2014]
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Preventing lead poisoning in young children. U S Department of Health and Human Services, Public Health Service 2005. Disponible en URL: <http://www.cdc.gov/nceh/lead/publications/PrevLeadPoisoning.pdf> [Consultado 5 Junio 2014]
- Cedano, K y Requena, L. (2007). Estudio Toxicológico de los Niveles de Concentración de Cadmio, Manganeso y Plomo, en sangre y/u orina en personas expuestas en las Avs. Abacay y Alfonso Ugarte de la Ciudad de Lima. Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico. Departamento Académico de Farmacología, Bromatología y Toxicología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Corey, G y Galvao, L. (1989). Plomo Serie Vigilancia 8. Metepec, México: OPS/OMS.
- Daniel, W. (2002). *Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud*. (4ta edición). México: Ed. Limusa-Wiley.
- Departamento Administrativo Nacional de Estadística. (2008). Estimación e interpretación del coeficiente de variación de la encuesta cocensal. Colombia: DANE.

- Duffau, et al. (2010). *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: Aspectos generales sobre la validación de métodos*. Chile: Ed. ISPCH
- Ekong EB, Jaar BG, Weaver VM. (2006). Lead-related nephrotoxicity: a review of the epidemiologic evidence. *Kidney Int*, 70(12), 2074-84.
- España, Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (2001). *Determinación de plomo en sangre- Método Delves/Espectrofotometría de absorción atómica*. Vizcaya: Autor.
- España, Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (2001). *Determinación de plomo en sangre-Método de cámara de grafito/Espectrofotometría de absorción atómica*. Vizcaya: Autor.
- España, Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (2001). *Determinación de plomo en sangre-Método de quelación-extracción/Espectrofotometría de absorción atómica*. Vizcaya: Autor.
- Ettinger AS, Tellez-Rojo MM, Amarasiriwardena C, Peterson KE, Schwartz J, Aro A, et al. (2006) Influence of maternal bone lead burden and calcium intake on levels of lead in breast milk over the course of lactation. *Am J Epidemiol*, 163(1), 48-56.
- Ettinger AS, Lamadrid-Figueroa H, Tellez-Rojo MM, Mercado-Garcia A, Peterson KE, Schwartz J, et al. (2009). Effect of calcium supplementation on blood lead levels in pregnancy: a randomized placebo-controlled trial. *Environ Health Perspect*, 117(1), 26-31.
- Ewers U, Krause C, Schulz C, Wilhelm M. (1999). Reference values and human biological monitoring values for environmental toxins. Report on the work and recommendations of the Commission on Human Biological Monitoring of the German Federal Environmental Agency. *Int Arch Occup Environ Health*, 72 (4), 255-60.
- Fabrino H, Silveira J, Neto W, Borba da Silva J. (2010). Factorial and doehlert desing used as optimization procedures for the direct determination of Lead in whole blood samples by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. *Analytical Letters*, 43(1), 508-519.

- Fuller, C. (1977). *Electrothermal Atomization of Atomic Absorption Spectrometry*. Londres: Ed. The Chemical Society.
- Garrido LF, Hernandez-Avila M, Tamayo OJ, bores Medina CA, Aro A, Palazuelos E, et al. (2003). Relationship of blood and bone lead to menopause and bone mineral density among middle-age women in Mexico City. *Environ Health Perspect*, 111(4), 631-6.
- Gulson BL, Mizon KJ, Korsch MJ, Palmer JM, Donnelly JB. (2003). Mobilization of lead from human bone tissue during pregnancy and lactation--a summary of long-term research. *Sci Total Environ*, 303(1-2), 79- 104.
- Haeflinger, P. (2013). *Guía breve de métodos analíticos para determinar las concentraciones de plomo en la sangre*. Ginebra: OMS
- Harris, D. (2007). *Análisis Químico Cuantitativo*. España: Editorial Reverté.
- Hsieh H, Chang W, Hsieh Y y Wang C. (2011). Using dried droplet laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry to quantify multiple elements in whole blood. *Anal Chim Acta*, 699 (1), 6-10.
- Hubert P, Nguyen-Huu J, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, et al. (2007). Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal- *Part II. J Pharm Biomed Anal*, 45(1), 70-78.
- International Conference on Harmonisation of Technical Requeriments for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) (2005). *Validation of Analytical Procedures: Text an Methodology Q2 (R1)*. ICH Harmonized Tripartite Guideline.
- International Organization for Standardization (ISO). (2005). *General requirements for the competence of testing an calibration laboratories*. International Standard ISO/IEC 17025:2005. (2a edition). Suiza: Autor.

International Organization for Standardization (ISO). (2003). Capability of detection Part 1: Terms and definition. International Standard ISO 11843:1997 Technical Corrigendum 1: 2003. Geneva: Autor.

International Organization for Standardization (ISO). (2003). Capability of detection Part 4: Terms and definition. Methodology for determination of critical value for the response variable when no calibration data are used. International Standard ISO 11843-3: 2003 ISO. Geneva: Autor.

International Organization for Standardization (ISO). (1994). International Standard ISO 5725 Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results. Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method. Geneva: ISO

International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). (2002). Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis. *IUPAC Technical Report Pure and Appl Chem*, 74(1), 835-855.

International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). (1995). Nomenclature in Evaluation of Analytical methods including Detection and Quantification Capabilities. *IUPAC Recommendations Pure and Appl Chem*, 67(1), 1699-723.

Ivanenko N, Solovyev N, Ivanenko A y Ganeev A. (2012). Application of Zeeman Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry with High-Frequency Modulation Polarization for the Direct Determination of Aluminum, Beryllium, Cadmium, Chromium, Mercury, Manganese, Nickel, Lead, and Thallium in Human Blood. *Arch Environ Contam Toxicol*, 8 (1), 1690-1700.

Lajunen L y Peramaki P. (2004). Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and Emission. (2a edición). Cambridge: Ed. The Royal Society of Chemistry.

Lauwerys, R. (1992). Toxicología industrial e intoxicaciones profesionales. Barcelona: Editorial Massons



- Lewis J. Lead poisoning: a historical perspective. U S Environmental Protection Agency 1985; Disponible en URL: <http://www.epa.gov/history/topics/perspect/lead.htm> [Consultado 3 de Junio 2014]
- Lidsky T y Scheider J, (2003). Lead neurotoxicity in children: basic mechanisms and clinical correlates. *Brain*, 126 (1), 5-19.
- Lin JL, Lin-Tan D, Hsu K, Yu, C. (2003). Environmental lead exposure and progression of chronic renal diseases in patients without diabetes. *N Engl J Med*, 348 (4), 277-86.
- Mahaffey KR. (1995). Nutrition and lead: strategies for public health. *Environ Health Perspect*, 103 (6), 191-6.
- Markowitz G, Rosner D. (2000). "Cater to the Children". The Role of the Lead Industry in a Public Health Tragedy, 1900-1955. *Am J Public Health*, 90(1), 36-45
- Martínez, A. (2002). *Plomo en suelo y su asociación con los niveles sanguíneos en niños y mujeres embarazadas*. Tesis para obtener el Título de Magister en Ciencias área de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Colima, Tecomán, Colima, México.
- Menke A, Muntner P, Batuman V, Silbergeld EK, Guallar E. (2006). Blood lead below 0.48 micromol/L (10 microg/dL) and mortality among US adults. *Circulation*, 114(13), 1388-94
- Ministerio de Sanidad y Consumo. Grupo de trabajo de salud laboral de la comisión de salud pública del consejo interterritorial del sistema nacional de salud. Protocolos Sanitarios Específicos de Vigilancia Médica de Trabajadores (II). Exposición a Metales: Plomo. Documentos Técnicos de Salud Pública nº 16 1999.
- Molina, L *et al.* (2007). Determinación y estandarización de plomo en sangre en operarios de estaciones de servicio del estado de Mérida. *Act Bioquím Clín Latinoa*, 41(2), 229-236.

- Muntner P, He J, Vupputuri S, Coresh J, Batuman V. (2003). Blood lead and chronic kidney disease in the general United States population: results from NHANES III. *Kidney Int*, 63(3), 1044-50.
- National Committee for clinical Laboratory Standard (NCCLS). (2004). Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation Approved Guideline NCCLS document EP 17-A. Pennsylvania: Autor.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). (2004). Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods. Approved Guideline Second Edition NCCLS document EP 5-A2. Pennsylvania: Autor.
- Navas-Acien A, Guallar E, Silbergeld EK, Rothenberg SJ. (2007). Lead exposure and cardiovascular disease--a systematic review. *Environ Health Perspect*, 115(3), 472-82.
- Pedroza H y Dicovsky L. (2007). *Sistema de análisis estadístico con SPSS*. Managua: Editorial IICA.
- Pérez, C. (2001). *Técnicas estadísticas con SPSS*. México: Editorial Prentice-Hall.
- Rabinowitz M, Wetherill G, Kopple J. (1976). Kinetic analysis of lead metabolism in healthy humans. *J Clin Invest*, 58 (2), 260-70.
- REAL DECRETO 374/2001, de 6 de abril, sobre la protección de la salud y seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo. BOE Nº 104 2001 May 1; 15893-9.
- Rubinson J y Rubinson K. (1998). *Contemporary Chemical Analysis*. Nueva Jersey: Ed. Prentice-Hall.
- Sánchez, J. (2010). *Metodologías analíticas para la determinación de metales tóxicos en muestras de interés ambiental*. Tesis para Obtener el Título de Magister en Ciencias Químicas, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

- Santiago, S. (2007). Contribución a la determinación de la fracción de metales traza ligados a las proteínas similares a las metalotioneínas en muestras de mejillón. Tesis para optar al Grado de Doctor en Química, Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Química, Universidad de Santiago de Compostela, España
- Sanz P, Nogue S, Corbella J. (1987). Alteración hepatológica en una intoxicación crónica por plomo. *An Med Int*, 4(1), 475-6.
- Seijas V, Trasobares E, Lopez-Colon J. (2009). *Capacidades de detección. Límite de blanco. Límite de detección. Límite de cuantificación. Especificidad. Validación Metodológica y Cálculo de Incertidumbres. Aplicación práctica en el caso de Elementos Trazas*. España: SEQC.
- Shih RA, Glass TA, Bandeen-Roche K, Carlson MC, Bolla KI, Todd AC, et al. (2006). Environmental lead exposure and cognitive function in community-dwelling older adults. *Neurology*, 67(9), 1556-62
- Shih RA, Hu H, Weisskopf MG, Schwartz BS. (2007). Cumulative lead dose and cognitive function in adults: a review of studies that measured both blood lead and bone lead. *Environ Health Perspect*, 115(3), 483- 92.
- Skoog D, Holler F, Crouch, S. (2008). Principios de análisis instrumental. (6ta edición). México: Cengage Learning.
- Skoog D y Leary J. (1994). Análisis Instrumental. (4ta edición). Madrid: Mc Graw Hill Interamericana.
- Smith DR, Osterloh JD, Flegal AR. (1996). Use of endogenous, stable lead isotopes to determine release of lead from the skeleton. *Environ Health Perspect*, 104(1), 60-6.
- Trasobares E. (2010). Plomo Mercurio en Sangre en una Población Laboral Hospitalaria y su Población con Factores de Exposición. Memoria para optar al grado de Doctor. Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid, España.

Trasobares E, Seijas V, López-Colón J. (2009). *Exactitud y Precisión. Validación Metodológica y Cálculo de Incertidumbres. Aplicación Práctica en el caso de Elementos Traza*. España: SEIQC.

Vaziri, N. (2008). Mechanisms of lead-induced hypertension and cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 295(2), 454-465.

Willard H, Merritt L, Dean J y Settle F. (1998). *Instrumental Methods of Analysis*. (6ta edición). California: Ed. Wadsworth.

World Health Organization. (1995). *Environmental criteria 165 Lead inorganic*. Geneva: WHO.

World Health Organization. (1996). *Biological monitoring of chemical exposure in the work places* Vol. 1. Geneva: WHO.

## 13. ANEXOS

### 13.1 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL PLOMO

<b>Símbolo químico</b>	Pb
<b>Número atómico</b>	82
<b>Grupo</b>	14
<b>Periodo</b>	6
<b>Aspecto</b>	gris azulado
<b>Bloque</b>	p
<b>Densidad</b>	11340 kg/m <sup>3</sup>
<b>Masa atómica</b>	207.2 u
<b>Radio medio</b>	180 pm
<b>Radio atómico</b>	154
<b>Radio covalente</b>	147 pm
<b>Radio de van der Waals</b>	202 pm
<b>Configuración electrónica</b>	[Xe]4f <sup>14</sup> 5d <sup>10</sup> 6s <sup>2</sup> 6p <sup>2</sup>
<b>Estados de oxidación</b>	4, 2 (anfótero)
<b>Estructura cristalina</b>	cúbica centrada en las caras
<b>Estado</b>	sólido
<b>Punto de fusión</b>	600.61 K
<b>Punto de ebullición</b>	2022 K
<b>Calor de fusión</b>	4.799 kJ/mol
<b>Presión de vapor</b>	4,21 × 10 <sup>-7</sup> Pa a 600 K
<b>Electronegatividad</b>	2,33 (Pauling)
<b>Calor específico</b>	129 J/(kg·K)
<b>Conductividad eléctrica</b>	4,81 × 10 <sup>6</sup> m <sup>-1</sup> ·Ω <sup>-1</sup>
<b>Conductividad térmica</b>	35,3 W/(m·K)

## 13.2 GENERALIDADES DEL PLOMO

En su forma elemental es de color blanco plateado y se vuelve color gris azulada cuando se expone al aire. Pertenece al Grupo IVA de la tabla periódica. Sus propiedades incluyen: un bajo punto de fusión, alta densidad, facilidad de fundición, baja resistencia, maleabilidad, facilidad de fabricación, resistencia a los ácidos y resistencia a la corrosión.

En la naturaleza el plomo se encuentra con el mineral de zinc, plata y cobre y se extrae junto con estos metales. La minería produce más del 90% del consumo mundial actual y el reciclaje representa alrededor del 10% del total del consumo mundial de plomo.

Aproximadamente tres cuartas partes del consumo de plomo se utilizan principalmente en la fabricación de baterías, mientras que un quinto en láminas de plomo para el techado de viviendas, para la fabricación de municiones, balas de plomo para escopetas, en aleaciones metálicas, revestimientos de cables y para los aditivos de la gasolina (Real Decreto 374, 2001), aunque cada vez menos.

La toxicidad del plomo sobre la salud es conocida desde la antigüedad, no obstante, el uso indiscriminado del plomo durante el siglo pasado ilustra como el camino que va de la ciencia a las políticas de Salud Pública es a veces largo y tortuoso (Trasobares, 2010).

En el siglo XX, EEUU se convirtió en el principal productor y consumidor de plomo; los dos usos que constituían la principal vía de exposición en la población general eran la adición de plomo en la gasolina y la utilización de plomo en pinturas (Lewis, 1985). Muchas compañías como la General Motors contribuyeron por años a la toxicidad tanto aguda como crónica del plomo, ya que descubrieron que el plomo era un detonante y mejoraba el octanaje de la gasolina. En cuanto a la toxicidad resultante de la utilización de plomo en las pinturas, muchos pediatras relacionaron y documentaron sistemáticamente los peligros del plomo relacionando directamente la pintura a base de plomo con la intoxicación por plomo en los niños.

Así, tras la publicación de varios de estos estudios, en 1978 el CDC establece el nivel de toxicidad en 30 µg/dL en adultos. En 1985 reduce el nivel a 25 µg/dL (CDC, 1985). En 1991 el CDC lleva a cabo una reevaluación minuciosa de la literatura existente y reduce nuevamente el nivel tóxico a 10 µg/dL y además elabora guías de prevención e intervención (CDC, 1991). En agosto del 2005 el CDC establece que existe evidencia de que niveles de plomo en sangre inferiores a 10 µg/dL también se asocian a efectos adversos en los niños como déficit intelectual, trastornos en la audición, lenguaje, déficit de atención y comportamiento antisocial, aunque decide mantener el nivel de 10 µg/dL como nivel de actuación, ya que considera que no existen intervenciones clínicas que disminuyan los niveles de plomo en los niños con concentraciones de plomo por debajo de 10 µg/dL o que reduzcan el riesgo de efectos adversos en el desarrollo. Además, la diferente metodología que se utiliza en la medición del plomo, aumenta la inexactitud cuando las concentraciones de plomo son inferiores a 10 µg/dL, aparte que no existe evidencia de que exista un umbral seguro para el plomo (CDC, 2005).

También en adultos, estudios realizados por la Third Nacional Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) revelaron una asociación significativa entre mortalidad por infarto de miocardio e ictus y niveles de plomo  $\geq 2$  µg/dL, además de una asociación significativa con mortalidad por causas generales por lo que la exposición ambiental al plomo incluso a niveles bajos es un determinante de mortalidad cardiovascular en la población general (Menke, et al, 2006). Además del riesgo cardiovascular numerosos estudios han manifestado la preocupación de que el plomo a dosis relativamente bajas pueda afectar la función cognitiva en adultos (Shih, et al, 2007).

El plomo se acumula principalmente en los huesos y puede constituir una fuente de exposición endógena. Cualquier situación que curse con un aumento de la resorción ósea, como la osteoporosis (Garrido, et al, 2003) el embarazo o la lactancia (Gulson, et al, 2003), provocaría la consiguiente liberación de plomo del hueso que pasaría a la sangre. Un grupo especialmente vulnerable, serían las personas mayores de 65 en las que la

exposición ambiental al plomo ha sido continua y elevada durante casi 50 años (Shih, et al, 2007).

Todos estos datos sugieren que probablemente no exista un umbral de plomo seguro para la salud y debido a la múltiples fuentes de exposición al plomo todavía existentes en la población general, sigue siendo un problema de salud pública.

### **13.3 FUENTES DE EXPOSICIÓN**

Las condiciones de ductilidad y maleabilidad del plomo han hecho que este metal haya sido utilizado por el hombre desde la más remota antigüedad. Sin embargo, la amplia utilización del plomo en el ámbito del trabajo constituye la principal fuente de exposición al plomo y comporta un grave e importante riesgo para la salud de los trabajadores.

No obstante, la toxicidad del plomo no sólo se extiende a los ambientes laborales en que se utiliza este metal, sino que llega también a ser un elemento importante de contaminación ambiental y de exposición en la población general.

Los compuestos de plomo pueden ser inorgánicos u orgánicos. El plomo inorgánico lo forman diversas sales y óxidos del metal, siendo la principal fuente de plomo industrial y comercial, el carbonato, el sulfuro, el sulfato y el óxido de plomo. Entre los compuestos orgánicos, el más importante desde el punto de vista epidemiológico es el plomo tetraetilo y el plomo tetrametilo.

#### **13.3.1 CONTAMINACIÓN INDUSTRIAL U OCUPACIONAL**

Hoy en día las principales fuentes industriales que emiten plomo al medio ambiente son las plantas de metálica básica como fundidoras (66% de las emisiones industriales al aire) y las centrales eléctricas (26% de las descargas de la industria en aguas superficiales). La exposición no solo es importante para los mineros que trabajan en las mismas instalaciones, sino para otros trabajadores, principalmente los del proceso de fundición, el cual es el que presenta el mayor riesgo, ya que durante la fundición el plomo calentado



desprende vapores con partículas de tamaño respirable ( $< 5 \mu\text{m}$ ) a concentraciones altas, tales como 200 a 300  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  de aire (Kosnett, *et al*, 2007).

Según el riesgo de intoxicación, las actividades industriales se pueden clasificar en operaciones de elevado riesgo y de riesgo moderado, tomando en consideración: las características fisicoquímicas del plomo, vías de entrada, intensidad de exposición, duración. Así se puede considerar que las actividades de mayor riesgo son aquellas en las que el plomo metálico o inorgánico es calentado y se forman aerosoles y humos en grandes cantidades. La norma para Plomo de la (OSHA) define cuál es el Límite de Exposición Permisible (PEL) para el plomo en el lugar de trabajo, así como la frecuencia y alcance de la vigilancia médica y demás responsabilidades del empleador. La administración para la Salud y la Seguridad Ocupacional (OSHA) ha establecido un PEL ejecutable para el plomo en el lugar de trabajo de 50  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  promediado sobre una jornada de 8-horas de trabajo, para trabajadores de la industria general.

Actividades de elevado riesgo:

- Metalurgia del plomo. Fundición y refinado.
- Recuperación de plomo y de residuos metálicos que lo contengan.
- Industrias de la construcción.
- Fabricación y reciclado de acumuladores eléctricos (baterías).
- Soldaduras de objetos y aleaciones de plomo.
- Tratamientos térmicos en baños de plomo.
- Fabricación de explosivos.
- Fabricación y manipulación de arseniato de plomo como insecticida.
- Fabricación y utilización de pinturas, esmaltes y barnices compuestos de sales y óxidos de plomo.
- Industrias del plástico que utilicen aditivos a base de plomo.

Actividades de riesgo moderado.

- Fabricación de municiones de plomo y su utilización en locales cerrados.
- Trabajos de demolición, especialmente raspado, quemado y oxicorte de materiales recubiertos con pintura de plomo.
- Fabricación de cables.
- Fabricación de tipos de imprenta.

### **13.3.2 CONTAMINACIÓN ALIMENTARIA**

Además de la acumulación de plomo por causas naturales, existe aquella por causas antropogénicas, como por ejemplo las emisiones provenientes de la combustión de gasolina. La contaminación por partículas en suspensión atmosférica también puede alcanzar el suelo por deposición seca o por arrastre. El plomo depositado en el suelo es almacenado en las raíces de las plantas debido a su poca movilidad; la contaminación atmosférica, en cambio, daña las partes aéreas de las plantas. Se necesitan concentraciones relativamente altas para producir toxicidad, por ejemplo valores como 1000 mg/dm de plomo en el suelo (Trasobares, 2010).

En los animales sucede algo similar a lo que ocurre a las plantas con respecto al plomo. EL mecanismo químico de inhibición de la clorofila en las plantas tiene su homólogo en los animales, en la síntesis de la hemoglobina, al inhibir procesos enzimáticos que hacen que se formen protoporfirinas (Harold, et al, 2005).

El plomo también puede entrar a los alimentos si éstos se colocan en envases de alfarería o cerámica que han sido barnizados en forma inapropiada o desde cristalería con plomo. El humo de cigarrillo también puede contener pequeñas cantidades de plomo.

La FDA ha adoptado un cierto número de niveles de acción (ejecutables) y de niveles de preocupación para la presencia del plomo en varios alimentos. Tales niveles se basan en

los cálculos que ha hecho la FDA para determinar qué cantidad de plomo puede consumir una persona sin que tenga efectos adversos en su salud.

Por ejemplo, la FDA ha establecido un nivel de acción de 0.5 µg/mL de plomo en productos que sean consumidos por infantes y niños. Así mismo, ha prohibido el uso de latas de comida que tengan soldadura de plomo (FDA 1994 y FDA 1995, citadas en ATSDR 1999).

### **13.3.3 CONTAMINACIÓN AMBIENTAL**

La población está expuesta al plomo por la ingestión de alimentos y líquidos contaminados, por inhalación de humos y polvos y por la absorción dérmica en el caso particular de los compuestos orgánicos. Aunque el sector industrial contribuye con la emisión de plomo al ambiente, en nuestros países latinoamericanos se calcula que el 80% de la contaminación, es debida a la combustión y transformación del tetraetilo de plomo proveniente de los combustibles.

A mayor carga de trabajo, mayor absorción. Una mala higiene en el trabajo, el hábito de fumar durante el mismo, aumenta la absorción por vía oral.

#### ***Suelo***

El suelo contaminado con plomo puede ser un riesgo debido a su ingesta directa, a su incorporación a las cosechas, o a su entrada directa a los hogares.

- El suelo no contaminado tiene concentraciones de plomo menores a 50 ppm, pero hay áreas urbanas en las que éstos llegan a exceder las 200 ppm (AAP 1993).
- La norma de la EPA para plomo en el suelo de áreas de juego es de 400 ppm. Para áreas que no son de juegos la norma es de 1200 ppm. Esta regulación es aplicable a los proyectos de limpieza que utilizan fondos federales.

El nivel de análisis de plomo en suelo (SSL) representa un estimado conservador para un nivel que sería protector de la salud pública. Está basado en el análisis de la ruta de ingestión directa para niños. Tal valor es una guía y no es obligatorio.

### ***Agua potable***

La EPA ha elaborado la norma para el agua potable con dos niveles de protección.

- La meta de Nivel Máximo Contaminante (MCLG) es cero. Este es el nivel que se considera seguro, independientemente de la viabilidad de conseguirlo.
- La determinación final de la EPA marca un nivel de acción de 15 µg/L.

El uso de soldadura de plomo y de otros materiales que contienen plomo y que se usan para conectar tuberías al suministro público de agua fue prohibido por la EPA a partir de junio de 1988. Muchas estructuras antiguas todavía están hechas de tubos con plomo, o tienen internamente soldadura con plomo. Esto puede incrementar sustancialmente el contenido de plomo del agua que sale del grifo.

En 1989 entraron en vigencia las regulaciones para controlar los niveles de plomo en el agua de los bebederos escolares.

## **13.4 LÍMITES DE EXPOSICIÓN**

Los niveles de plomo en sangre que se admiten como aceptables han sido reformulados a medida que se ha ampliado el conocimiento de los trastornos que produce este metal en el hombre, conllevando a una reducción gradual de los niveles normales de plomo sanguíneo, así se presenta: : 60 ug/dL (1960), 40 ug/dL (1971), 30 ug/dL (1975), 25 ug/dL (1985), 15 ug/dL (1990), y finalmente 10ug/dL (1991), según CDC.

Sin embargo los niveles de plomo en sangre oscilan entre 15 y 40 ug/dL de sangre. La OMS considera como límite aceptable hasta 40 ug/dL en adultos, inaceptable de 41 a 60 ug/dL y peligroso cuando rebasa los 60 ug/dL de sangre (Corey y Galvao, 1989).

El índice de Exposición Biológica (BEI) es una guía que evalúa los resultados del monitoreo biológico. El BEI para plomo en sangre es de 30 µg/dL (ACGIH, 2005).

**Tabla 1. Normas y regulaciones para el plomo**

Agencia	Medio	Nivel
CDC	Sangre	10 µg/dL
OSHA	Sangre	40 µg/dL 60 µg/dL
ACGIH	Sangre	30 µg/dL
OSHA	Aire (lugar de trabajo)	50 µg/m <sup>3</sup> 30 µg/m <sup>3</sup>
CDC/NIOSH	Aire (lugar de trabajo)	100 µg/m <sup>3</sup>
ACGIH	Aire (lugar de trabajo)	150 µg/m <sup>3</sup> 50 µg/m <sup>3</sup>
EPA	Aire (ambiente)	0.15 µg/m <sup>3</sup>
EPA	Suelo (residencial)	400 ppm (áreas de juego) 1200 ppm (no juego)
EPA	Agua (de bebida)	15 µg/L 0 µg/L
CPSC	Pintura	600 ppm (0.06%)

Fuente: Shia, RA et al, (2006)

## 13.5 TOXICOCINÉTICA

### 13.5.1 ABSORCIÓN

El plomo es absorbido por inhalación, por ingestión y a través de la piel. La vía de ingreso, el tamaño de la partícula y el tipo de compuesto de plomo (orgánico o inorgánico), determinan la concentración y la posibilidad de difusión del plomo hacia el organismo. Además, la absorción del plomo depende de factores propios del organismo tales como la edad, el estado fisiológico y la integridad de los tejidos (Trasobares, 2010).

#### *a) Inhalación*

El plomo inorgánico presente en el aire ambiental consiste en aerosoles de partículas que pueden depositarse en el tracto respiratorio al inhalarse. La cantidad y los patrones de deposición de las partículas de los aerosoles en las vías respiratorias van a depender del tamaño de las partículas inhaladas, el patrón de respiración (por la nariz o por la boca) y de la velocidad del flujo del aire en tracto respiratorio. A su vez, la absorción del plomo depositado depende también del tamaño de las partículas su solubilidad y su localización dentro del tracto respiratorio. Así, las partículas con un diámetro mayor a 2.5  $\mu\text{m}$  se depositan en las vías respiratorias recubiertas de células ciliadas (región nasofaríngea y traqueobranquial) y el sistema mucociliar puede transportarlo hacia la faringe y ser deglutido. Las partículas pequeñas (menor a 1  $\mu\text{m}$ ), pueden alcanzar la región alveolar y ser absorbidas y pasar a la sangre tras su disolución en líquido extracelular o ingeridos por las células fagocíticas (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2011).

Tras la inhalación de tetraetilo de plomo, el 37% se deposita inicialmente en tracto respiratorio, de los cuales el 20% es exhalado en las siguientes 24 horas. Una hora después de la exposición, aproximadamente el 50% se encuentra en hígado, el 5% en el riñón y el resto se distribuye ampliamente por todo el organismo (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2011).

## **b) Ingestión**

Las partículas de polvo de plomo son ingeridas directamente a través de las manos, alimentos, bebidas o cigarrillos contaminados. En la población en general, constituyen la principal vía de entrada de plomo en el organismo. Hay también un porcentaje de plomo que después de haber sido inhalado es posteriormente vertido al tubo digestivo por los mecanismos de aclaramiento pulmonar.

La absorción gastrointestinal del plomo inorgánico tiene lugar principalmente en el duodeno y se halla influenciada por estatus fisiológico del individuo expuesto (edad, ayuno, niveles de calcio y hierro) y por las características fisicoquímicas del plomo ingerido (tamaño de las partículas, solubilidad, especie, etc). La absorción de plomo también varía en función de la dosis de plomo ingerida (Trasobares, 2010).

Los principales factores que influyen en la absorción de plomo a nivel gastrointestinal son:

- **Edad**

La absorción gastrointestinal de compuestos de plomo solubles (cloruro, acetato o nitrato de plomo) parece ser que es mayor en niños que en adultos. En estudios realizados se ha estimado que en los niños la absorción es aproximadamente del 40-50 % de plomo ingerido, mientras que en adultos el porcentaje de absorción oscila entre 3-10% (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2011). Esta diferencia puede deberse a la mayor densidad de transportadores de proteínas a nivel intestinal durante los períodos de crecimiento (Peraza, et al, 1998).

- **Ayuno**

La presencia de alimentos en el tracto gastrointestinal disminuye la absorción de plomo. En adultos, la absorción de plomo puede aumentar hasta un 63% si es ingerido en situación de ayuno (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2011). En niños este aumento puede ser incluso mayor en períodos de ayuno más

cortos, ya que tienen un vaciamiento gástrico más rápido que los adultos, por lo que es importante que los niños no espacien mucho las comidas (Mahaffey, 2005).

- **Nutrición**

La absorción gastrointestinal de plomo depende del estatus de micronutrientes en el lumen intestinal. La deficiencia de calcio aumenta la absorción intestinal de plomo, ya que ambos compiten por sitios de unión similares en las proteínas de la mucosa intestinal. Además, existe otro mecanismo por el que la absorción de plomo se puede incrementar cuando hay una deficiencia de calcio. Cuando los niveles de calcio están bajos, aumenta la concentración de 1,25-dihidroxitamina D, para estimular la absorción intestinal de calcio y la síntesis de calbindina-D, que es una proteína de unión al calcio y el plomo. De manera que la vitamina D no sólo incrementa la absorción de calcio y fósforo, sino que también aumenta la absorción del plomo (Peraza, et al, 1998).

La deficiencia de hierro durante períodos de rápido crecimiento como en la infancia también aumenta la absorción gastrointestinal de plomo. El zinc también parece tener cierta influencia sobre la absorción del plomo ya que varios estudios han mostrado que a medida que el contenido en zinc de la dieta aumenta, la absorción de plomo y su consiguiente toxicidad disminuyen, lo que indica que el zinc ejerce su efecto con relación al plomo a nivel gastrointestinal (Peraza, et al, 1998).

- **Dosis ingerida**

Se ha observado en numerosas ocasiones que existe una relación no lineal entre la concentración de plomo en la sangre y la ingesta de plomo en humanos lo que sugiere la existencia de un mecanismo de absorción saturable en el proceso de distribución de plomo en los seres humanos. Sin embargo, se desconoce la dosis a partir de la cual la absorción se ve limitada (Peraza, et al, 1998).



### ***c) A través de la piel***

La absorción a través de la piel de los compuestos de plomo inorgánico es mucho menos importante que la vía inhalatoria y oral. Aunque algunos estudios han cuantificado la absorción dérmica de plomo inorgánico, su contribución a la sobrecarga corporal de plomo en los humanos aún se desconoce.

El plomo tetraetilo y el plomo tetrametilo, debido a su carácter hidro y liposoluble penetran con facilidad a través de la piel, siendo una importante vía de entrada del plomo en el organismo (Ministerio de Sanidad y Consumo, 1999).

### **13.5.2 DISTRIBUCIÓN**

El patrón de distribución de plomo es independiente de la ruta de absorción, siendo además similar en los niños que en los adultos, excepto que en estos últimos la cantidad de plomo acumulada en el hueso es mayor.

La concentración de plomo en sangre varía considerablemente con la edad, el estado fisiológico (embarazo, lactancia, menopausia) y los factores de exposición al plomo. La vida media del plomo en sangre, en adultos, es aproximadamente 30 días. El plomo en sangre se halla principalmente en los hematíes (99%), unido más a las proteínas intraeritocitarias que en la membrana del hematíe. Aproximadamente el 40-75% del plomo en el plasma se halla unida a proteínas plasmáticas, especialmente a la albúmina. También puede unirse a la gammaglobulina y a compuestos sulfídricos de bajo peso molecular (cisteína, homocisteína).

EL contenido de plomo en hueso aumenta con la edad a lo largo de la vida. En los niños aproximadamente un 73% del contenido de plomo en el organismo se halla en el hueso, aumentando este porcentaje al 94% en la edad adulta. Este depósito de plomo en los huesos colabora en el mantenimiento de las concentraciones de plomo en sangre mucho tiempo después de que haya cesado la exposición. El plomo no se distribuye uniformemente en el hueso. Se acumula principalmente en las regiones que tienen

mayor calcificación activa en el momento de la exposición. Durante la infancia y la niñez, la calcificación más activa tiene lugar en el hueso trabecular, mientras que en la edad adulta la calcificación se produce en los sitios de remodelación ósea tanto en hueso trabecular como cortical. Además dentro del hueso trabecular y cortical existen dos compartimientos fisiológicos. En uno de los compartimientos el plomo es inerte y tiene una vida media de varias décadas y el otro compartimiento, lábil, permite el mantenimiento del equilibrio del plomo entre el hueso y la sangre y los tejidos blandos. El contenido de plomo en el hueso contribuye en 40-70% al plomo presente en la sangre (Smith, et al, 1996).

Aunque en los niños la tasa de formación ósea es muy elevada y la captación de plomo circulante muy rápida, el contenido de plomo en el hueso es menos que en los adultos (73% del plomo del organismo) porque la tasa de resorción ósea también es más alta y se recicla otros compartimientos con más facilidad. En general, la tasa de recambio óseo disminuye con la edad dando lugar a un aumento de la concentración de plomo en los adultos. Sin embargo, en algunos huesos, como el fémur y la cadera, el incremento del contenido de plomo alcanza una meseta en la edad media de la vida para ir disminuyendo posteriormente. Esta reducción es más pronunciada en las mujeres asociándose a la menopausia. Se ha observado en estudios epidemiológicos un aumento de la concentración de plomo en sangre tras la menopausia asociándose a una disminución de la densidad ósea. La osteoporosis produce un aumento de la resorción ósea con la consiguiente liberación del plomo del hueso (Garrido, et al, 2003).

Además, durante el embarazo y la lactancia, la resorción ósea temporal constituye una fuente de exposición endógena significativa para la madre, el feto en desarrollo, ya que atraviese la barrera placentaria, y pasa a la leche materna exponiendo al lactante a plomo (Gulson, et al, 2003; Ettinger, et al, 2006). Sin embargo la suplementación con calcio se ha asociado con una reducción moderada de la concentración de plomo, cuando se administra durante el embarazo y la lactancia (Ettinger, et al, 2009). Este efecto probablemente se deba a una disminución de la absorción intestinal del plomo ingerido.

Además, el plomo se distribuye ampliamente en los tejidos blandos. El contenido relativo de plomo en los tejidos blandos, expresado como porcentaje del contenido total de plomo en los tejidos blandos es: hígado (33%), músculo esquelético (18%), piel (16%), tejido conectivo (11%), grasa (6.4%), riñón (4%), pulmón (4%), aorta (2%) y cerebro (2%) y otros tejidos (<1%) (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2011).

### **13.5.3 EXCRECIÓN**

Independientemente de la ruta de exposición, el plomo absorbido se excreta principalmente en orina y heces y en menor cantidad por sudor, saliva, pelo, uñas y leche materna.

### **13.5.4 MODELO FARMACOCINÉTICO DEL PLOMO**

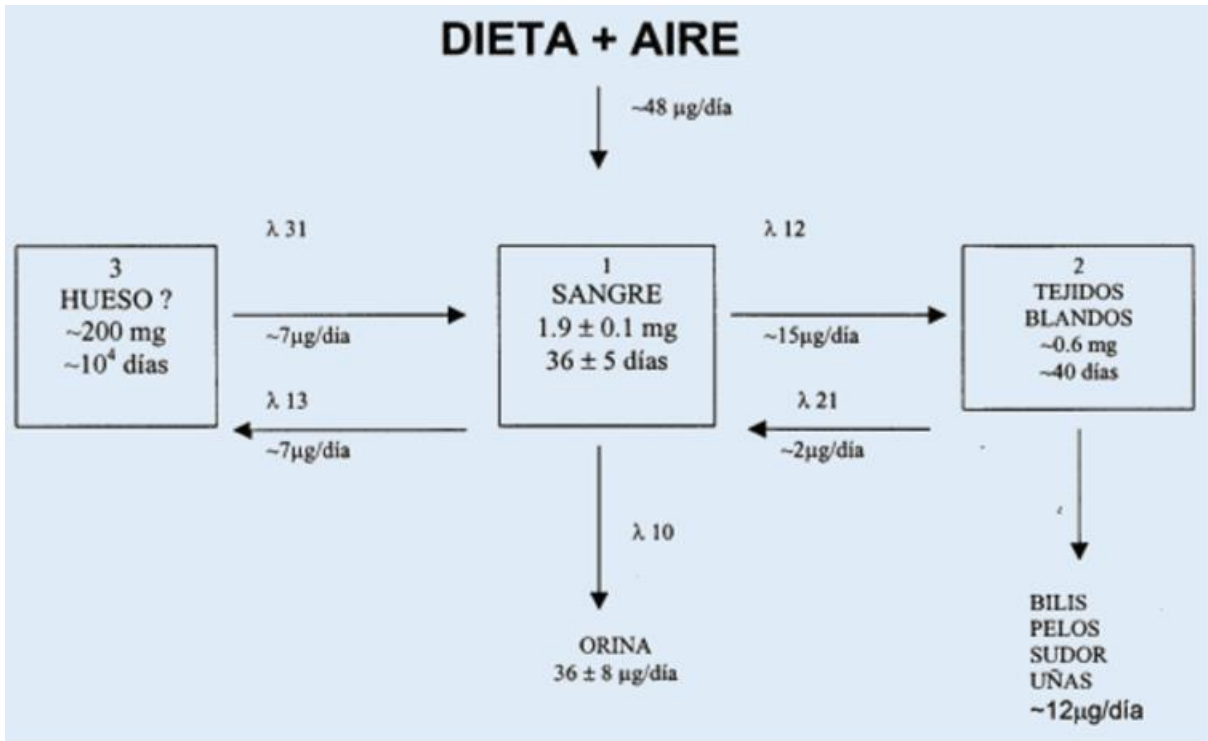
El plomo absorbido se distribuye y acumula en el organismo siguiendo distintos esquemas según los autores que se estudien. De todos los modelos propuestos el más aceptado es el sistema de intercambio del plomo en el organismo propuesto por Rabinowitz et al, en 1976 (Rabinowitz, et al, 1976), que sigue vigente, en el que se propone un modelo tricompartmental: sangre, tejidos blandos y esqueleto, que se muestra en la Figura 1.

Una vez absorbido el plomo, éste pasa a la sangre dónde está representado el 2% de contenido total de plomo en el organismo. En las personas no expuestas, este plomo puede alcanzar cifras de 1.7-2 mg, con una vida media de aproximadamente 28-38 días. Este compartimiento se encuentra en contacto directo con las vías de absorción comentadas, y con los otros compartimentos, con los que mantiene una situación de equilibrio.

El segundo de los compartimentos se encuentra representado por los tejidos blandos. El plomo presente en estos órganos puede alcanzar valores de 0.3-0.9 mg, con una vida media algo superior al que se encuentra en el compartimiento sanguíneo.

El tercer compartimento lo constituye el hueso, en donde prácticamente se encuentra el 90% del plomo almacenado en el organismo y tiene una vida media de unos 30 años.

Figura 1: Modelo tricompartmental de distribución del plomo.



Fuente: Rabinowitz et al (1976)

## 13.6 TOXICODINÁMICA (MECANISMOS DE ACCIÓN)

### 13.6.1 NEUROTOXICIDAD

El plomo puede afectar al sistema nervioso a través de muchos mecanismos, siendo uno de los más importantes la suplantación de cationes polivalentes (esencialmente calcio y zinc) en los sitios celulares de unión a iones. Entre los sitios proteicos para cationes polivalentes que ocupa el plomo podemos mencionar los de unión a zinc, por los que el plomo tiene una afinidad muy elevada, y los de calcio, por lo que si bien tiene afinidad menor, es más alta que la del propio calcio. Dada la amplia distribución e importancia que tienen estos últimos en la fisiología celular, actualmente se considera la sustitución de iones calcio en la maquinaria proteica como el principal mecanismo patogénico del plomo (Garza, et al, 2005). La unión del catión calcio a los sitios de unión de las proteínas se traduce en la adopción de una conformación determinada. Las características iónicas del plomo le permiten formar interacciones con los sitios de unión para calcio de manera similar a como lo haría el ion nativo, pero ocasionando conformaciones no fisiológicas, alterando de esta manera el funcionamiento de las proteínas y perturbando la homeostasis del calcio.

En la membrana citoplasmática, además de causar daños peroxidativos en lípidos y proteínas, el plomo afecta funcionalmente a proteínas extracelulares de unión a calcio. Diversos intercambiadores y transportadores para calcio y otros metales divalentes son afectados en mayor o menor medida por el plomo entre ellos varios canales tanto activados por voltaje como por ligando. Al ser estos canales la base de la excitabilidad celular, constituyen uno de los blancos patogénicos de mayor importancia para el organismo. Los canales de calcio regulados por voltaje permiten una gran diversidad de cationes mono o polivalentes. Cuanto mayor es la afinidad del catión, más rápida será su entrada al poro del canal y más lenta su salida por el extremo intracelular del mismo. Al ser competitivas las interacciones entre los diferentes cationes normalmente es el catión con más afinidad el que se une y desplaza los demás iones del interior del canal. Por esta

razón en condiciones fisiológicas, dichos canales conducen fundamentalmente iones calcio, catión por lo que tiene una gran afinidad (Shih, et al 2006). Pese a ello, el plomo tiene mayor afinidad que el calcio, lo que hace que su tránsito por el poro sea más lento que el del calcio, con lo que actúan como bloqueadores del canal, además de ser una de las principales vías de entrada de los metales pesados hacia el espacio intracelular en células excitables.

En neuronas y células excitables la activación de los canales de calcio determinan un aumento intracelular de este ion, señal que dispara procesos entre los que destaca la liberación de neurotransmisores como la dopamina y acetilcolina, que se ve suprimida por los efectos del plomo sobre estos canales. Además de producir alteración en la liberación de los neurotransmisores también afecta los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) (Lidsky and Schneider, 2003).

A nivel intracelular, el plomo es un activador más potente que el calcio para la calmodulina, la proteína kinasa C (PKC) y la sinaptotagmina I todas ellas involucradas de forma importante en la señalización intra e intercelular (Garza, et al, 2005). La alteración que el mal funcionamiento de estas proteínas provoca en los sistemas de segundos mensajeros y procesos exocíticos contribuyen en gran medida a la neurotoxicidad del plomo. Numerosas cascadas de fosforilación y defosforilación, así como la generación /degradación de diversas moléculas señalizadoras como el AMPc o el óxido nítrico dependen de la activación correcta de la calmodulina y su interacción con proteínas a las cuales regula. Un caso similar al de la calmodulina y su interacción con proteínas a las cuales regula. Un caso similar al de la calmodulina es el de la PKC, proteína activada anormalmente por el plomo aún a concentraciones aún menores que las requeridas por la calmodulina y que participa en diversos sistemas reguladores de la célula, estando también implicada en la potenciación a largo plazo, una forma de plasticidad neuronal que está involucrada en la memoria y el aprendizaje.

Acorde con la presencia, función, ubicación de las distintas proteínas de unión a cationes, el plomo afecta en forma distinta los diferentes organelos celulares, hay algunos que tienden a acumularlo. El plomo se concentra y produce daños en la mitocondria, reduciendo el metabolismo energético celular y favoreciendo la generación de radicales libres. También inhibe la captura mitocondrial del calcio citoplasmático a la vez que favorece la liberación del calcio contenido en este organelo. Al promover la apertura del poro de transición mitocondrial, con la consiguiente liberación de citocromo C al citoplasma, induce la muerte celular por apoptosis.

Además, como actúa sobre la síntesis del grupo inhibiendo la enzima ácido  $\delta$ -aminolevulínico deshidratasa (ALA-D) se produce un aumento de la concentración de su precursor ácido aminolevulínico (ALA) que inhibe la neurotransmisión mediada por GABA inhibiendo su liberación y también posiblemente compitiendo con los receptores GABA (Lidsky and Schneider, 2003).

Otro efecto indirecto del plomo es que a concentraciones elevadas produce encefalopatía, alteración de la barrera hematoencefálica y edema. Pero además, incluso a concentraciones bajas, el plomo también altera el funcionamiento de la barrera hematoencefálica, lo que resulta en incrementos específicos regionales de la permeabilidad a proteínas plasmáticas sin producir edema (Trasobares, 2010).

Resumiendo, entre los mecanismos por los que el plomo causa daños en el sistema nervioso, podemos mencionar la peroxidación de lípidos, la excitotoxicidad, las alteraciones en la síntesis, el almacenamiento y la liberación de neurotransmisores, en la expresión y el funcionamiento de receptores, las alteraciones en el metabolismo mitocondrial, la interferencia con los sistemas de segundos mensajeros, los daños a las células cerebrovasculares, la astrogliosis y la oligodendrogliosis, que causan defectos en la mielinización, la interferencia con los receptores NMDA (receptor glutamatérgico N-metil-D-Aspártico) y de forma indirecta, la formación de ácido  $\delta$ -aminolevulínico ( $\delta$ -ALA), que inhibe la neurotransmisión por GABA (Garza, et al, 2005). Aunque el plomo llega a

todos los tejidos del organismo, algunos componentes del Sistema Nervioso Central exhiben un mayor daño tras la exposición y el hipocampo es una de las áreas más afectadas.

### **13.6.2 TOXICIDAD CARDIOVASCULAR/RENAL**

Los mecanismos por los que el plomo produce los efectos cardiovasculares descritos se han intentado explicar mediante estudios realizados en animales, tejidos aislados y cultivos celulares. Estos estudios han mostrado que la exposición crónica al plomo causa estrés oxidativo, disminuyendo la disponibilidad de óxido nítrico (NO), altera los sistemas de transducción de señales en los que interviene el NO, promueve la inflamación, aumenta la actividad del sistema nervioso simpático, incrementa la producción de endelina, altera el sistema renina-angiotensina, aumenta la producción de prostaglandinas vasoconstrictoras, disminuye la producción de prostaglandinas vasodilatadores, altera los mecanismos de transducción de la señal en los que interviene el calcio en el músculo liso vascular y disminuye la relajación vascular mediada por el endotelio. Además, el plomo puede causar daño endotelial, impedir su reparación, inhibir la angiogénesis, reducir el crecimiento celular endotelial, suprimir la producción de proteoglicanos, estimular la proliferación de células del músculo liso vascular (VSCM), disminuir la producción del activador del plasminógeno tisular y aumentar la producción del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1). De esta manera, la exposición al plomo puede promover la aparición de hipertensión, arteriosclerosis, aterosclerosis, trombosis y enfermedad cardiovascular (Vaziri, 2008).

El plomo actúa sobre la producción de especies reactivas de oxígeno y sobre la vía del óxido nítrico (NO).

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) se producen normalmente en las células como producto del metabolismo celular. La concentración de EROs es finamente controlada por los sistemas de defensa antioxidantes. Si un agente estresante induce un aumento en la producción de EROs, este equilibrio puede romperse produciéndose alteraciones en las



estructuras celulares. Si no se recupera el equilibrio se produce disfunciones que pueden desembocar en la muerte celular. De manera que un compuesto o situación puede producir estrés oxidativo mediante un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno, una disminución en los sistemas de defensa antioxidantes de las células o mediante una combinación de ambos factores. Parece ser que el mecanismo por el que el plomo induce estrés oxidativo es este último (Navas-Acien, *et al*, 2007).

La exposición al plomo se asocia con un aumento en la producción de EROs, y estrés oxidativo que se confirma con la elevación de malondialdehído en plasma, producto final de la peroxidación lipídica. También provoca una disminución de la disponibilidad de óxido nítrico (NO) por su interacción con el radical superóxido (Gurer and Ercal, 2000).

El NO es generado por la oxidación del grupo guanidino del aminoácido L-arginina catalizada por enzimas de la familia de las NO Sintetas que utilizan O<sub>2</sub> y NADPH como cosubstratos y generan L-citrulina y NADP<sup>+</sup> como coproductos. La mayoría de las acciones biológicas del NO están mediadas por su activación de la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs) que resulta en la formación de GMPc. EL GMPc promueve la vasodilatación disminuyendo la concentración de Ca<sup>2+</sup> citosólico en las células del músculo liso vascular e inhibiendo a su vez la entrada de Ca<sup>2+</sup> (Navas-Acien, *et al*, 2007).

El NO es una molécula pequeña, no cargada y con un electrón desapareado. Debido a su condición de radical libre, el NO reacciona rápidamente con otras moléculas que contiene electrones no apareados, como son los radicales libres. La reacción del NO con el anión superóxido producido por la exposición al plomo da lugar por un lado, a la formación de peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) que es una molécula muy reactiva capaz de oxidar irreversiblemente a prácticamente todas las biomoléculas y por otra parte a una disminución de la biodisponibilidad del NO, lo que junto a la observación de una disminución de la expresión de GCs resulta en un aumento de la resistencia vascular sistémica y en consecuencia a un aumento de la presión arterial (Navas-Acien, *et al*, 2007).

Además, la exposición al plomo provoca un aumento de la actividad de la SOD (superóxido dismutasa) y de la NADPH oxidasa, no observándose ningún cambio en la actividad de la catalasa o de la glutatión peroxidasa lo que genera la acumulación de peróxido de hidrógeno a partir del anión superóxido. El aumento de peróxido de hidrógeno provoca por un lado la activación de transcripción nuclear-kappaB (NF-kB) que el factor de transcripción general para numerosas citoquinas, quemoquinas y moléculas de adhesión promoviendo inflamación, fibrosis y apoptosis y por otro, al ser sustrato de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss, aumenta la producción de radical hidroxilo, que es la especie reactiva de oxígeno más reactiva (Navas-Acien, *et al*, 2007).

La disminución en la biodisponibilidad de NO aumenta la actividad del sistema nervioso simpático, observándose niveles elevados de norepinefrina en plasma y una disminución del receptor  $\beta$ -adrenérgico vascular lo que provoca vasoconstricción y contribuye al desarrollo y mantenimiento de la hipertensión. (Vaziri, 2008). La exposición crónica al plomo aumenta la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), y eleva las concentraciones de renina y aldosterona plasmática (Lin, *et al*, 2003).

### **13.6.3 TOXICIDAD HEMATOLÓGICA**

El plomo inhibe la síntesis del grupo hemo y en consecuencia de la hemoglobina. En la síntesis del grupo hemo, la enzima que es más sensible a los efectos tóxico del plomo es el ácido  $\delta$ -aminolevulínico deshidratasa (ALA-D). A partir de concentraciones de plomo superiores a 15  $\mu\text{g}/\text{dl}$ , se produce la inhibición de este enzima citosólico, al unirse a sus grupos SH que son esenciales para su actividad catalítica, además de disminuir la actividad de la ferroquelatasa mitocondrial, lo que conduce a una disminución en la síntesis del grupo hemo, que por un mecanismo feedback estimula la actividad de la ácido  $\delta$ -aminolevulínico tanto en sangre como en orina.

El plomo también produce alteraciones morfológicas de los precursores de los hematíes. Su acción inhibitoria sobre la pirimidín-5'-nucleotidasa, enzima que cataliza la hidrólisis desfosforilativa de los nucleótidos pirimidínicos, produce un acúmulo de nucleótidos

fosforilados en los reticulocitos alterándose la degradación del RNA y observándose el característico punteado basófilo (Muntner, et al, 2003).

Debido a que el plomo provoca un aumento de la peroxidación lipídica de los ácidos grasos de la membrana del hematíe, disminuye la capacidad de deformabilidad de éstos y aumenta la hemólisis (Gurer y Ercal, 2000).

De manera que la inhibición de la síntesis del grupo hemo conduce a una disminución de la concentración de hemoglobina en sangre que junto con el incremento en la destrucción de los hematíes, resulta en una anemia hipocrómica normocítica asociada con reticulocitosis.

La inhibición de la enzima ferroquelatasa resulta en la acumulación de la protoporfirina IX, que se encuentra en los eritrocitos circulantes como protoporfirina zinc (ZPP), ya que el zinc ha sustituido al hierro. Sin embargo, no es una determinación adecuada si los niveles de plomo se hallan por debajo de 25 µg/dL.

#### **13.6.4 MANIFESTACIONES CLÍNICAS**

Los efectos tóxicos que el plomo produce en el organismo humano son diversos y de cierta gravedad, si el nivel de intoxicación es elevado. Figura 2. Presentando dos tipos marcados de intoxicación (Castro y Sobrano, 2010).

##### **13.6.4.1 INTOXICACIÓN AGUDA**

Los síntomas son:

- A nivel del aparato digestivo: cólico saturnino con dolor, vómitos y estreñimiento.
- A nivel del sistema nervioso: encefalopatía saturnina con convulsiones y coma que conduce a la muerte en dos o tres días. También puede presentarse en forma de delirio o psicosis tóxica.
- A nivel renal: albuminuria, cilindruria u oliguria.

- A nivel hepático: pudiendo aparecer desde una necrosis hepática hasta una ligera citólisis (Sanz, et al 1987).

#### 13.6.4.2 INTOXICACIÓN CRÓNICA

Pueden distinguirse tres fases (Lauwerys, 1992):

##### **a) Fase de impregnación:**

Caracterizada por una plumbemia menor de 70ug/100ml. Es en esta fase cuando la acción de prevención del saturnismo es clave. No se trata todavía de una enfermedad establecida, pero existen ya datos indicadores de alteraciones metabólicas acompañadas de una sintomatología vaga e imprecisa que nos indican los primeros efectos del plomo. Puede haber estreñimiento y molestias gastrointestinales, fatiga, modificaciones del humor, pérdida de memoria y, de la capacidad de atención, dolores musculares y articulares e insomnio. Actualmente, el ribete gingival de Burton se ve muy raramente. En cuanto a las alteraciones biológicas, en esta fase comienzan a evidenciarse los efectos sobre el tejido hematopoyético.

##### **b) Fase de intoxicación franca:**

Las manifestaciones pueden ser:

- Alteraciones del estado general.
- Cólico saturnino.
- Polineuritis motora: Se trata de una afección motora que atañe en general a los músculos más activos de las extremidades superiores.
- Parálisis flácida y progresiva sin alteraciones sensitivas.
- Hipertensión paroxística.
- Encefalopatía saturnina.

- Afectación tiroidea: disminución de la captación de yodo por la glándula tiroides.
- Afectación testicular: hipoespermia.
- Las formas más agudas pueden variar del delirio y la psicosis tóxica, a las convulsiones, coma y muerte. La forma crónica consiste en pérdida de capacidad intelectual y de rendimiento psicomotriz e incluso afasia transitoria y hemianopsia.

***c) Fase de impregnación antigua:***

La absorción prolongada de plomo puede tener como consecuencia hipertensión permanente, nefritis crónica a menudo asociada a gota y alteraciones cardíacas (Lauwerys, 1992).

**Figura 2: Principales efectos adversos en Adultos en condiciones de exposición estable a largo plazo al plomo, según las concentraciones sanguíneas alcanzadas por el metal.**

<i>Ug Pb/100 ml de sangre</i>	<i>Efecto adverso que puede aparecer a la concentración de plomo señalada</i>
10	➤ Inhibición de la actividad de la enzima AAL-D
15-20	➤ Elevación de protoporfirinas eritrocitarias en mujeres.
20-30	➤ Elevación de protoporfirinas eritrocitarias en hombres.
30	➤ Disminución en la conducción de nervios periféricos. ➤ Respuestas electrofisiológicas alteradas en el sistema nervioso central. ➤ Elevación de la presión arterial en hombres mayores de 40 años. ➤ ¿aberraciones cromosómicas?
40	➤ Aumento del AAL en suero y de AAL-U ➤ Aumento de las CP-U ➤ Marcado aumento de las protoporfirinas eritrocitarias. ➤ Disfunción nerviosa periférica. ➤ Alteración de función visual-motriz (coordinación ojo-mano). ➤ Alteraciones psicosensoriales (sueño, estado de ánimo, memoria, atención). ➤ NEFROPATÍA. ➤ Síntomas gastrointestinales. ➤ Alteraciones espermáticas.
50	➤ Disminución en la producción de hemoglobina. ➤ Alteraciones morfológicas de los eritocitos. ➤ Parestesias en miembros superiores. ➤ Debilidad en miembros inferiores. ➤ Fatiga, olvido, distracción. ➤ Subencefalopatía. ➤ Alteración de la función testicular.
60	➤ Acortamiento en la vida de hematíes. ➤ Aumento exponencial de protoporfirinas eritrocitarias. ➤ Efectos reproductivos en la mujer. ➤ Alteraciones patológicas del electromiograma.
80	➤ Anemia franca.
100	➤ Encefalopatía grave. ➤ Neuropatía crónica.

Fuente: Cedano, K y Requena, L. (2007).

## **13.7 DIAGNÓSTICO**

### **13.7.1 RECONOCIMIENTO MÉDICO**

Para diagnosticar correctamente a un sujeto con intoxicación por plomo son necesarios: entrenamiento clínico adecuado; la elaboración de una historia clínica completa desde el punto de vista ocupacional y ambiental; los laboratorios deben ser especializados y contar con instalaciones que permitan determinar la existencia y cuantificación de plomo; y los profesionales de la salud deben estar conscientes del problema

#### **13.7.1.1 *Reconocimiento de ingreso***

Debe incluir los antecedentes médicos y una exploración física, que comprenda en especial los sistemas Hematopoyético, nervioso y renal. También se debe medir la hemoglobina de la sangre (Cedano y Requena, 2007).

#### **13.7.1.2 *Reconocimiento paródico***

Es habitual efectuarlo anualmente. Se debe examinar a los trabajadores en función de los signos y síntomas clínicos bien conocidos de exposición al plomo habrá que realizar pruebas de laboratorio que midan la absorción excesiva de plomo y otras que confirmen la acción tóxica del metal.

La OMS ha establecido en los países industrializados, plomo normal en sangre promedio 17  $\mu\text{g}/\text{dL}$  sobre un rango de 15-40  $\mu\text{g}/\text{dL}$ .

Por esto en 1986 la OPS establece que el efecto precoz se inicia por arriba de los 40  $\mu\text{g}/\text{dL}$  de plomo en sangre, y la intoxicación con efectos reversibles en los 50  $\mu\text{g}/\text{dL}$  y las secuelas clínicas cuando rebasa los 100  $\mu\text{g}/\text{dL}$ , aclarándose que existe un amplio margen en la respuesta individual (Cedano y Requena, 2007).

## 13.7.2 PRUEBAS CLÍNICAS

### 13.7.2.1 En orina

- Plomo (PbU)
- Ácido d-Aminolevulínico (ALA U)
- Coproporfina (CPU)

### 13.7.2.2 En sangre

- ALA-Dehidrasa (ALA-D)
- Protoporfirina eritrocitaria (PPE) y Zinc (PPZ)
- Plomo eritrocitario (PE)

Figura 3. Valores normales de plomo en muestras de sangre y/u orina.

<i>EXAMEN DE LABORATORIO</i>	<i>VALOR NORMAL</i>
Pb U	Menos de 80 ug/L
ALA U	Menos de 6mg/L
ALA-D	Mas de 21 ug/mL
PE	Menos de 40 ug / 100mLI
CPU	Menos de 80 ug /Hb 14-16 g/100mL

Fuente: Cedano, K y Requena, L. (2007).



## 13.7 TRATAMIENTO

En caso de ingesta oral reciente habrá que tomar medidas de descontaminación digestiva habituales (vaciado gástrico, carbón activado, etc). En la mayoría de los casos la intoxicación es del tipo crónica y el tratamiento fundamental es retirar al paciente de la fuente de exposición al tóxico (Trasobares, 2010).

En las intoxicaciones por plomo metal o sus compuestos inorgánicos debe decidirse si se aplica tratamiento quelante con EDTA cálcico disódico, D-penicilamina o dimercaprol (BAL). Los quelantes forman complejos inertes y estables con el plomo, que son excretados por la orina (Cedano y Requena, 2007).

En las intoxicaciones agudas o en las agudizaciones de intoxicaciones crónicas, en las que el enfermo esté sintomático, con signos de toxicidad biológica o con plumbemias superiores a 70  $\mu\text{g/dL}$  debe instaurarse tratamiento quelante. El EDTA cálcico disódico es el quelante de elección. En general se utilizan tres compuestos para quelar plomo:

- Edetato-Disódico-Cálcico (EDTA Ca) a dosis de 30-50 mg/Kg/día.
- Dimercaprol (BAL) en casos de encefalopatía o plumbemia mayor a 100 mg/dL en adultos y mayor a 60 mg/dl en niños a dosis de 3 a 5 mg/Kg/dosis.
- Ácido dimercaptosuccínico (DMSA), tiene la ventaja de que provoca pocos efectos adversos y de que se usa por vía oral a dosis de 10 mg/kg/dosis (Cedano y Requena, 2007).

## 14. DETERMINACIÓN DE PLOMO EN SANGRE MEDIANTE GFAAS

### 14.1 FUNDAMENTO

La absorción atómica es el proceso que tiene lugar cuando átomos de un elemento en estado fundamental absorben energía radiante a una longitud de onda específica y pasan al estado excitado. La cantidad de radiación absorbida aumenta al hacerlo el número de átomos del elemento presentes en el camino óptico. La ley de Beer, que establece una proporcionalidad directa entre la absorbancia y la concentración, se observa en absorción atómica. Por ello se puede realizar una curva de calibración con estándares de concentración conocida en la que la parte lineal sigue la ley de Beer y realizar una determinación cuantitativa del analito presente.

La determinación de plomo en sangre se ha realizado con llama, horno de grafito y generador de hidruros que son atomizadores, también se ha determinado utilizando técnicas analíticas como la voltamperometría entre otras, no obstante la espectrofotometría de absorción atómica con atomización en horno de grafito, corrección de fondo por efecto Zeeman y bajo condiciones STPF ha dado muy buenos resultados según los diferentes estudios realizados.

El horno de plataforma con temperatura estabilizada (STPF) es un concepto que hace uso correcto de la instrumentación existente para maximizar la señal del analito y minimizar las interferencias Figura 4. Este concepto fue propuesto por W. Slavin, D. Mannin y G. Carnrick e incluye las siguientes condiciones.

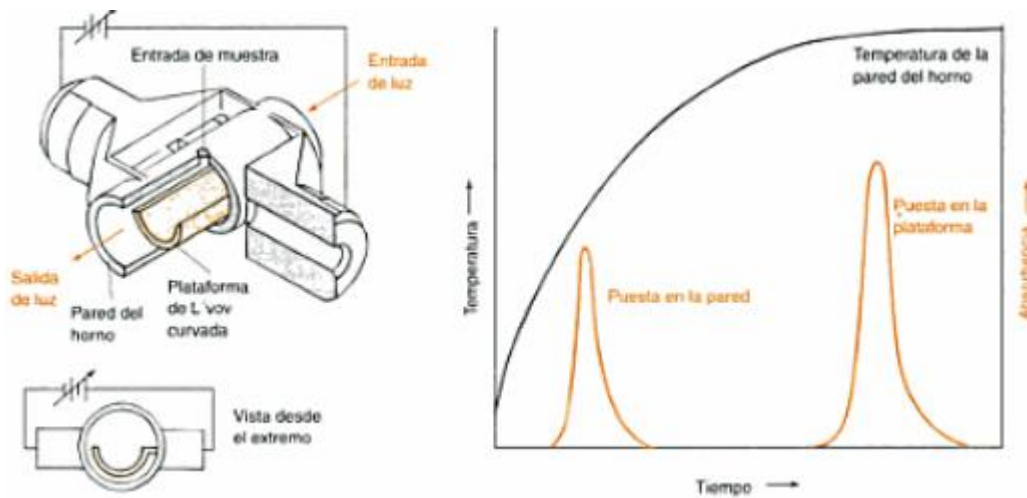
#### **a. Electrónica rápida**

Debido a la rapidez con que se producen las señales del horno se requiere una electrónica digital rápida para seguir los perfiles de las absorbancias.

### b. Integración de señal

La velocidad de vaporización de un analito depende a menudo de la matriz. Así, cuando la matriz de los patrones y de las muestras difiere, las absorbancias de altura de pico pueden ser diferentes. El empleo de absorbancia integrada ayuda a corregir las diferentes velocidades de vaporización.

**Figura 4. Horno de Grafito calentado transversalmente**



Fuente: Harris, D. (2007)

### c. Exacta corrección de fondo (efecto Zeeman)

La corrección de fondo es necesaria para eliminar las señales de absorción que no son debidas al analito de interés. Los dos tipos de corrección de fondo principales son la corrección por fuente continua y la corrección por efecto Zeeman. Los sistemas de corrección de fondo miden la señal de absorción de fondo y la restan de la señal de absorción total (absorción atómica + fondo), dando una señal corregida. Cuando se somete un átomo a un campo magnético intenso, las líneas de emisión o absorción se desdoblarán en tres o más componentes polarizados. Este fenómeno se conoce como efecto Zeeman. Debido a que sólo afecta a los átomos se puede emplear para separar la absorción atómica de la señal de fondo. En el caso más simple este desdoblamiento origina tres líneas, el componente  $\pi$  es polarizado linealmente con el vector eléctrico

paralelo al campo magnético y dos líneas desplazadas que están polarizadas circularmente, en direcciones opuestas, con los ejes de polarización paralelos al campo magnético. En los instrumentos Zeeman la diferencia entre las medidas realizadas con el campo magnético apagado y encendido da lugar a la señal de absorción atómica del analito. Esta técnica proporciona la corrección de fondo exactamente a la longitud de onda en que se mide la absorción atómica, a diferencia de la corrección de fondo por fuente continua (lámpara de Deuterio), permitiendo en muchos casos eliminar el efecto de matriz, junto con el resto de condiciones STPF.

***d. Calentamiento rápido del horno (200°/seg)***

La elevada velocidad de calentamiento permite una mayor estabilización térmica hasta que el elemento es volatilizado, permitiendo menores temperaturas de atomización.

***e. Plataforma de L'vov y tubos de grafito con recubrimiento pirolítico***

La Plataforma L'vov permite que el sistema alcance el equilibrio térmico antes de la atomización. El recubrimiento pirolítico minimiza la reacción del analito con la superficie de grafito.

***f. Parada de gas durante la atomización***

La interrupción de la corriente de gas en el interior del tubo es importante para la estabilización térmica, ofreciendo una mayor sensibilidad para todos los elementos.

***g. Empleo de modificadores de matriz***

Los modificadores de matriz reaccionan con el analito formando un compuesto más estable térmicamente, pudiendo aumentar la temperatura de mineralización.

Todos estos parámetros están en cierta manera relacionados entre sí y se deben usar en conjunto para obtener el mayor beneficio a las condiciones STPF, que idealmente elimina las interferencias (Trasobares, 2010).

La espectrofotometría de absorción atómica es una técnica que se usa mayoritariamente para la determinación de metales traza, con la única variación del atomizador. Para fines de la investigación se utilizó la atomización electrotrémica aunque también existe la atomización en llama y la atomización vía formación de hidruros covalentes del metal (Santiago, 2007).

La espectrofotometría de absorción atómica se basa en la absorción de la radiación por parte de átomos o iones elementales. Las regiones del espectro que proporcionan más información atómica son la ultravioleta/visible y la de rayos X (Skoog, Holler y Crouch, 2008).

Para esta validación se trabajó en la región UV-visible, a una longitud de onda de 283.3 nm, que es la zona en la que van a absorber los átomos o iones gaseosos de la muestra a analizar, dando lugar a lo que se denomina espectros atómicos que sirven para la determinación tanto cualitativa como cuantitativa de los elementos de interés, en este caso plomo.

En espectrofotometría atómica lo ideal es que los átomos estén libres de la influencia de la matriz, lo cual implica que no estén formando enlaces con otros átomos, de modo que todas las partículas, moléculas y compuestos deben estar disociados (Santiago, 2007).

Esto se consiguió en la práctica experimental atomizando correctamente la muestra a analizar con un horno de grafito. Este tipo de atomización proporciona mayor sensibilidad que otras técnicas debido a que toda la muestra se atomiza en un período muy breve y el tiempo promedio de los átomos en el camino óptico es de un segundo o más (Skoog y Leary, 1994), esto se pudo comprobar al observar el tiempo transcurrido durante la rampa de temperaturas al momento de realizar cada lectura.

El mecanismo de formación de los átomos de plomo depende de numerosos factores como los compuestos presentes en el tubo de grafito a la temperatura de atomización, la atmósfera dentro del horno, la velocidad de calentamiento del horno o la temperatura de operación del mismo (Rubinson, J y Rubinson, K; 1998), factores que el modelo analítico propuesto pretende minimizar.

El horno de grafito consiste en un cilindro abierto en los dos extremos y que tiene un orificio central para la introducción de la muestra, en el interior del cilindro se encuentra una plataforma, de *L'Vov*, también de grafito, situada justo debajo del orificio de entrada. En esta plataforma es donde se evapora y calcina la muestra (Fuller, 1977). Utilizar esta plataforma fue muy importante al momento de la determinación de plomo, debido a que su uso, hace que cuando se produce el calentamiento rápido en el proceso de atomización, el aumento de temperatura en la plataforma sea más lento, y cuando el tubo y la fase gas alcanzan la temperatura de atomización y permanecen en equilibrio, la plataforma se calienta rápidamente. Esto provoca que la muestra de sangre depositada en la plataforma sea atomizada en un ambiente en el cual la temperatura no cambia, produciendo que apenas se encuentren interferencias de tipo químico (Willard, et al, 1988).

El material con el cual debe ser fabricado un tubo debe ser inerte, debe poseer buena conductividad eléctrica y térmica, además de ser de alta pureza y poseer un coeficiente de expansión bajo y además tener baja porosidad, el grafito presenta todas estas cualidades, a pesar de ello durante la validación del método analítico se utilizaron tubos de grafito pirolítico, debido a que el grafito normal es poroso por naturaleza y esta porosidad se ve aumentada con la aplicación de altas temperaturas, además de provocar efecto memoria ya que el vapor atómico tiende a difundirse por el tubo de grafito (Santiago, 2007).

Utilizando un tubo de grafito pirolítico con plataforma de *L'Vov* durante el análisis se disminuyeron los efectos tipo matriz y problemas de reproducibilidad y se aumentó la sensibilidad del modelo analítico para la determinación de plomo.

Así, las etapas de atomización electrotérmica, previamente optimizadas y utilizadas en la validación del método analítico para determinar plomo en muestras de sangre fueron las siguientes, para la *etapa de secado* 140 °C en el cual se elimina el disolvente, para la *etapa de mineralización* 700 °C en esta etapa se destruye la matriz de la muestra, para la *etapa de atomización* 1800 °C y para la *etapa de limpieza* 2600 °C, esta última se realizó con el

objetivo de evitar efectos de memoria, de modo que no se produzcan interferencias en análisis posteriores.

A pesar de las obvias ventajas de la espectrofotometría de absorción atómica electrotrémica con horno de grafito, existen interferencias espectrales, físicas y químicas que resultan en un problema al momento de realizar el análisis, sin embargo el método analítico planteado para la validación, reduce al mínimo las posibles interferencias.

Los efectos de memoria por incompleta atomización o la limpieza inefectiva se minimizaron utilizando temperaturas de atomización y limpieza elevadas como se mencionó anteriormente en el programa de temperaturas.

Trasobares, E en su investigación utiliza temperaturas de 1700 °C para atomizar la muestra y 2400 °C para la etapa de limpieza. Otro estudio con biomarcadores para tóxicos metálicos utiliza una temperatura de atomización para el plomo de 1800 °C, igual a la temperatura utilizada durante la validación del método y una temperatura de limpieza de 2200 °C (Santiago, 2007), similar a la temperatura de limpieza utilizada.

Las interferencias de tipo físico por corrección de fondo se disminuyeron utilizando el método de adición estándar (Fuller, 1977), ya que el equipo no cuenta con corrección de fondo *Zeeman* o una lámpara de deuterio.

La lámpara utilizada durante la validación del método fue una lámpara de plomo de cátodo hueco con una energía entre 48-50 mA y una corriente de 10 mA para su funcionamiento.

Las interferencias químicas potenciales que se pudieron producir durante el análisis es que el plomo reaccionara con elementos de la matriz, componentes del tubo de grafito o con el gas inerte (Lajunen y Peramaki, 2004), para evitar este tipo de interferencias se utilizan modificadores de matriz, que son tanto sales orgánicas como inorgánicas, el objetivo es aumentar la volatilidad de la muestra y disminuir la volatilidad del analito por formación de sales, óxidos y otros compuestos de altos punto de fusión (Harris, 2007).

Durante la investigación se utilizó fosfato monobásico de amonio como *modificador de matriz*. Otros estudios para la determinación de plomo en sangre utilizaron Pd (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> y

Mg (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> como modificadores de matriz (Trasobares, 2010), en general los modificadores más utilizados son sales de paladio y magnesio, este último denominado comúnmente modificador universal (Lajunen y Peramaki, 2004).

Otro estudio realizado para la determinación y estandarización de plomo en sangre en operarios de estaciones de servicio, indica que se utilizaron como *modificadores de matriz* fosfato monobásico y dibásico de amonio (Molina, et al, 2007). También un estudio publicado en Perú que determinó la cantidad de plomo en escolares, utilizó como *modificador de matriz* fosfato monobásico de amonio al 10% (Cedano y Requena, 2010), respaldando de esta manera el uso de dicho reactivo en el modelo analítico propuesto.

Es así como con esta técnica se alcanzan mejores límites de detección y sensibilidad, debido a que como ya se indicó, en los hornos de grafito la concentración atómica es mayor y además se evita la dilución del analito con el disolvente (Willard, et al, 1988).

La aseveración anterior resulta verdadera si y solo si las condiciones instrumentales del equipo se encuentren optimizadas y hayan sido calibradas previamente, la base de una buena validación analítica es una excelente calibración instrumental.

Es importante analizar las especificaciones y condiciones del espectrofotómetro de absorción atómica utilizado durante la investigación pues los parámetros de calidad obtenidos son válidos y garantizan fiabilidad únicamente bajo las especificaciones establecidas en el modelo analítico propuesto por el Laboratorio de Toxicología.



## 15. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Para demostrar la validez de un método la norma UNE-EN-ISO 15189 propone una serie de parámetros a determinar: límite de detección y de cuantificación, especificidad, precisión, exactitud, linealidad, intervalo y masa característica.

La Norma UNE-EN ISO/IEC 17025 indica que un laboratorio de análisis no debe validar los métodos normalizados (métodos oficiales y métodos de referencia) y sí debe validar los métodos que no han sido normalizados, es decir los métodos desarrollados en el laboratorio, los métodos normalizados utilizados fuera de su campo de aplicación previsto, y las ampliaciones o modificaciones de métodos normalizados (ISO 17025, 2005).

### 15.1 *Límite de detección y límite de cuantificación:*

El límite de detección se define como la cantidad o concentración mínima de analito que puede ser distinguida con fiabilidad de cero. Se encuentra ampliamente aceptado, para la validación de un método, que se estime multiplicando por 3 la desviación estándar de al menos 6 (se recomiendan 20) determinaciones independientes y completas del procedimiento analítico de blancos de una matriz lo más similar posible a las muestras, teniendo en cuenta los valores cero o negativos.

Sin embargo, al tratarse de un elemento tóxico con un intervalo de referencia que sólo tiene límite superior, es importante determinar con más exactitud el límite de detección. Por lo cual científicos de la ISO y de la IUPAC se introdujeron dos conceptos relacionados con la capacidad de detección.

Límite de blanco: Valor crítico por encima del cual, con una probabilidad  $1-\alpha$  determinada, se encuentra diferenciado del estado básico (ISO, 2003) o valor sin presencia del analito, ruido o señal de fondo (ISO, 2003).

Límite de detección o concentración mínima detectable: es aquella concentración que, dado una probabilidad  $1-\alpha$  de no confundirse con el blanco, tiene una probabilidad  $1-\beta$  de no ser tomado como un falso negativo (NCCLS, 2004). Los valores por defecto recomendados por la IUPAC son  $\alpha=\beta=0.05$  (IUPAC, 1995).

Asumiendo una distribución gaussiana, el límite de blanco (LB) para una probabilidad del 95% correspondería a:

$$LB = z_{1-\alpha} \cdot \sigma_B$$

Donde  $Z_{1-\alpha}$  es el factor correspondiente a una probabilidad  $1-\alpha$  en una distribución normal de una sola cola con una desviación estándar  $\sigma_B$ . Sin embargo, si queremos mantener un riesgo beta pequeño de cometer un falso negativo, el LD del método debe ser mayor. Así pues, tomando en consideración ambas probabilidades de error, el límite de detección (LD) es:

$$LD = LB + z_{1-\beta} \cdot \sigma_B$$

Si  $\alpha=\beta=0.05$

$$LD = 3,29 \cdot \sigma_B$$

La ICH (Internacional Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) indica directamente este valor "3.3" como factor por el que hay que multiplicar la desviación estándar para determinar el LD (ICH, 2005).

Si no se conocen las desviaciones estándares poblacionales y deben estimarse a partir de análisis replicados, entonces los valores de  $\sigma_{\beta}$  deben ser reemplazados por sus correspondientes estimaciones,  $S_{\beta}$ . De la misma forma, los valores de  $Z$ , basados en distribuciones normales deben ser reemplazados por los correspondientes valores t de una distribución t-Student con  $n$  grados de libertad (df).

Tomando  $\alpha=\beta$  las expresiones para LB y LD (asumiendo varianza constante) son:

$$LB = t_{1-\alpha, df} \cdot S_B$$
$$LD = 2 \cdot t_{1-\alpha, df} \cdot S_B$$

$$df = N - 1$$

Alrededor de 30 replicados generalmente aseguran que la desviación estándar estimada no difiera más de un 30 % de la desviación estándar poblacional.

El límite de cuantificación se define como la mínima concentración de analito que puede ser determinado en un tipo de muestra determinada con una determinada precisión y exactitud (ICH, 2005) o con una determinada incertidumbre (IUPAC, 2002).

Su estimación se realiza generalmente multiplicando por 10 la desviación estándar del blanco (IUPAC, 1995; ICH, 2005). Dada la gran dificultad de disponer de una sangre libre de plomo se procederá a estimar el límite de detección con un blanco de calibración.

## 15.2 **Especificidad**

La especificidad se define como la propiedad de un método de responder exclusivamente al analito definido. Muy frecuentemente la eficacia de los métodos depende de la ausencia de interferencias que determinan la especificidad.

Las interferencias en espectrofotometría de absorción atómica pueden ser físicas, espectrales o químicas aunque también se tiene que tener en cuenta la reactividad de los diferentes compuestos o especies químicas y estados de oxidación del analito (Trasobares, 2010).

Para evitar las interferencias de absorción moleculares estos métodos utilizan una longitud de onda específica del elemento a analizar junto con un corrector de fondo. En cuanto a las interferencias espectrales, la existencia de otro elemento químico con una línea de absorción solapada de intensidad significativa no es frecuente.

### **15.3 Linealidad**

Un método analítico cuantitativo es lineal cuando existe una relación de línea recta, verificada matemáticamente, entre el valor producido por método y la verdadera concentración o actividad del analítico.

Para comprobar la linealidad se examinan los residuales de la regresión lineal, es decir, las diferencias, en tanta por uno, del dato experimental con respecto al dato teórico obtenido en la recta de regresión (IUPAC, 2002; CITAC, 1998).

Si la calibración es lineal, los residuales representados frente a la concentración se distribuirán de forma aleatoria a un lado y otro de la línea que representa la desviación cero con respecto al dato esperado de la recta de regresión. Sin embargo, si no hay linealidad, se podrá percibir una tendencia en la gráfica de los residuales.

Aparte de la útil inspección visual de los gráficos de residuales se recomienda aplicar el análisis de la varianza de los residuales (o test de ANOVA) para comprobar si la diferencia entre los residuales es estadísticamente significativa.

También se puede aplicar el estadístico de Durbin-Watson, que examina los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en que se han introducido los datos, proporcionándonos un valor objetivo de si existe una tendencia en los puntos de calibración (Seijas, eta al, 2009).

## 15.4 **Exactitud y Precisión**

Todo método analítico lleva implícito un error sistemático y un error aleatorio. Sin embargo, todavía no existe un consenso global entre los documentos reguladores de los diferentes organismos (ISO, SFSTP, ICH, EURACHEM, CLSI, IUPAC, AOAC, FDA.) en cuanto a los términos exactitud, veracidad y precisión (Trasobares, et al, 2009).

La SFSTP, ICH y EURACHEM, incorporan la terminología de la ISO, que define el término exactitud como el grado de concordancia entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado. El término exactitud cuando se aplica a un conjunto de resultados (lo más habitual) implica la combinación de componentes aleatorios y de un error sistemático o sesgo por lo que la definición de exactitud (accuracy) incluiría el término veracidad (trueness), que se define como el grado de concordancia entre la media obtenida de una serie de mediciones y el valor de referencia aceptado y refleja el error sistemático total. El término precisión, que se define como el grado de concordancia entre los resultados obtenidos en mediciones repetidas de un mismo mensurando bajo condiciones establecidas y que depende únicamente de la distribución de los errores aleatorios y no del valor verdadero o especificado (Hubert, et al, 2007; ISO, 1994). Esencialmente la exactitud es la ausencia de error. Un método no es exacto si los resultados que proporciona no son precisos. En conjunto ambos términos, precisión y veracidad, describen la exactitud de un método.

Sin embargo, clásicamente no se mide en un único parámetro la diferencia existente con respecto al valor de referencia aceptado y la dispersión de los resultados, por lo que se determina por separado la veracidad y la precisión.

### **a. Precisión**

La precisión se define como el grado de concordancia entre los resultados obtenidos en mediciones repetidas de un mismo mensurado bajo unas condiciones establecidas. La precisión se expresa habitualmente en términos de imprecisión y se computa como la desviación estándar de los resultados de la prueba.

La Precisión puede estudiarse bajo condiciones de repetibilidad, de reproducibilidad e intermedias. Las condiciones de *repetibilidad* son aquellas condiciones en las que los resultados de una medición se obtienen con el mismo método, en muestras idénticas, con el mismo operador, utilizando el mismo instrumento de medida, durante un corto intervalos de tiempo y sin calibraciones entre las mediciones (Trasobares, 2010). Las condiciones de *reproducibilidad*, son aquellas condiciones bajo las que los resultados se obtienen con el mismo método, la misma muestra, en laboratorios diferentes, en diferentes equipos y con operarios distintos y las condiciones *intermedias*, son las condiciones, que como su nombre indica, se encuentran entre las de repetibilidad y las de reproducibilidad.

De manera que repetibilidad y reproducibilidad son dos condiciones extremas de la precisión. La primera describe la mínima y la segunda la máxima variabilidad en los resultados.

Tanto la repetibilidad como la reproducibilidad son heterocedásticas, es decir, dependientes de la concentración del analito, por lo que se debe evaluar la precisión a distintos niveles de concentración, que deben estar cercanos o incluir los niveles de decisión clínicos (IUPAC, 2002; CITAC, 1998;).

En la validación de un método mediante un estudio intralaboratorio se va a estimar la precisión intermedia y la repetibilidad.

### **Precisión intermedia y repetibilidad**

Existen muchos factores que pueden contribuir a la variabilidad de los resultados de un método de medida, sin embargo los cuatro factores que más influyen en la precisión son:

- a. Tiempo: el intervalo de tiempo existente entre las mediciones.
- b. Calibración: si se ha calibrado entre las mediciones.
- c. Operador: si siempre es el mismo operador o son diferentes operadores los que llevan a cabo las mediciones.

d. Equipo: si se utilizada el mismo equipo (o el mismo o diferentes lotes de reactivos) en las mediciones.

El objetivo de la determinación de la precisión intermedia es medir la capacidad del método de medida para repetir los resultados de la prueba bajo condiciones definidas.

Es importante definir las condiciones en las que se va a realizar la medición de la precisión intermedia indicando qué factores se han variado mediante sufijos:

- $S_{(\tau)}$ : Desviación estándar de la precisión intermedia obtenida de la realización de las mediciones en tiempos diferentes.
- $S_{(o)}$ : Desviación estándar de la precisión intermedia obtenida con diferentes operadores.
- $S_{(\tau o)}$ : Desviación estándar de la precisión intermedia obtenida en diferentes tiempos con diferentes operadores.
- $S_{(c)}$ : Desviación estándar de la precisión intermedia variando la calibración del equipo.

Para determinar la repetibilidad, los cuatro factores permanecen constantes, se realizarán 15 mediciones como mínimo de la misma muestra (misma concentración) el mismo día. Otros organismos como por ejemplo EUROCHEM consideran que 10 mediciones son suficientes (CITAC, 1998) y el CLSI11 recomienda 20 (NCCLS, 2004).

La estimación de la desviación estándar de la precisión intermedia está dada por:

$$S_{()} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (y^k - \bar{y})^2}$$

donde  $y^k$  es cada uno de los resultados de los  $n$  replicados y  $\bar{y}$  es la media del total de los  $n$  replicados. Se indicará entre paréntesis con símbolos las condiciones en las que se ha realizado la medición.

Antes de la aplicación de la fórmula, se recomienda que se identifiquen los valores alejados con la prueba de Grubbs.

Como en el caso de la reproducibilidad, la imprecisión intermedia y la repetibilidad, se pueden expresar como desviación estándar o como coeficiente de variación (también llamado desviación estándar relativa (%RSD)).

## **b. Veracidad**

La evaluación de la veracidad del procedimiento analítico del laboratorio se realiza normalmente utilizando materiales de referencia y aplicando pruebas de significación, aunque también se puede realizar a partir de la comparación (Trasobares, 2009).

La veracidad se expresa en términos de sesgo o inexactitud y se calcula hallando la diferencia entre la media aritmética de las concentraciones  $\bar{x}_j$  y el valor de referencia aceptado  $\mu$ . El sesgo se puede expresar en términos absolutos o relativos (Hubert, et al, 2007).

$$\text{Sesgo} = \hat{\mu}_j - \bar{x}_j$$
$$\text{Sesgo}_j(\%) = 100 \times \frac{\hat{\mu}_j - \bar{x}_j}{\bar{x}_j}$$

También se puede utilizar la prueba t de Student-Fisher con n-1 grados de libertad, para ver si existen diferencias estadísticamente significativas entre la media hallada y el valor teórico, siempre y cuando el número de determinaciones, n, sea  $\geq 30$ .

$$t = \frac{\bar{x}_j - \hat{\mu}_j}{s/\sqrt{n}}$$



La desviación estándar,  $s$ , es la desviación estándar de la precisión media en condiciones de repetibilidad. Como la prueba es bilateral el valor  $p$  se obtiene multiplicando por 2 el área de la cola derecha:

$$P_{bi} = 2 \times \Pr(t_{n-1} \geq t)$$

Si  $p$  es menor de 0.05 la diferencia es estadísticamente significativa y si  $p$  es mayor de 0.05 la diferencia no es estadísticamente significativa y si  $p$  es mayor de 0.05 la diferencia no es estadísticamente significativa.

También se puede calcular el intervalo de confianza  $1 - \alpha$  de la diferencia:

$$\text{IC 95\% de } \delta: \quad \bar{x}_j - \mu_j \pm t_{\alpha/2, n-1} \times \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Si el intervalo de confianza incluye el valor 0, la diferencia no es estadísticamente significativa.

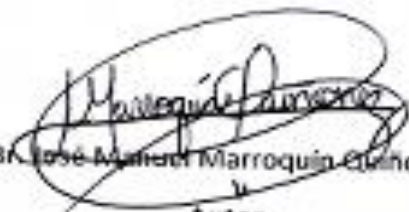
### c. Estudio o Porcentaje de recuperación

Es un método útil cuando no se dispone de materiales de referencia o en este caso como complemento en la evaluación de la veracidad. Para ello se añade a una muestra de concentración conocida, diferentes cantidades de estándar, por lo menos 3 concentraciones diferentes, que cubran todo el rango de medida, y se halla la diferencia entre la muestra analizada sin la adición de estándar y las muestras a las que se ha añadido estándar.

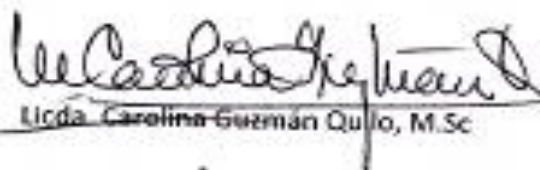
Para estimar el sesgo expresado en términos de recuperación se calcula la media teórica, que tendría que dar dependiendo de la cantidad de estándar añadida y se aplica la fórmula siguiente

$$\text{recuperación}(\%) = 100 \times \frac{\bar{x}_j}{\rho_j}$$

Aunque teóricamente los estudios de recuperación únicamente evalúan el sesgo debido a los efectos que se producen sobre el analito añadido y no necesariamente sobre el presente en la muestra, tiene la gran ventaja de que la matriz es representativa de las muestras auténticas y se puede evaluar la existencia de interferencias de matriz. Además, son de gran utilidad ya que aunque el hallazgo de una recuperación adecuada no es garantía de una buena veracidad, una recuperación baja indica claramente una falta de veracidad (IUPAC, 2002).



BK. José Manuel Marroquín Guzmón  
Autor



Licda. Carolina Guzmán Quillo, M.Sc  
Asesora



Licda. Mayté Donis de Recinos, M.Sc  
Revisora



Licda. Hada Maciela Alvarado Beteta, MA  
Directora Escuela de Química Farmacéutica



Dr. Rubén Daríel Velásquez Miranda  
Decano Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia