

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUIMICA



**EFFECTO DEL METODO DE LAVADO EN LA DETERMINACION DE METALES EN
MUESTRAS DE CABELLO POR ICP OES**

Trabajo Especial de Grado presentado ante
la ilustre Universidad Central de Venezuela,
por el **Br, Rilso Fernan Rojas Mora**, para
optar al titulo de licenciado en Química.

Caracas, Octubre de 2008

ACTA

Los abajo firmantes designados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: **“Efecto del método de lavado en la determinación de metales en muestras de cabello por espectroscopia de emisión óptica con plasma inductivamente acoplado (ICP-OES)”**. Presentado por el Br. Rilso Fernan Rojas Mora, certificamos que este trabajo cumple con lo requisitos exigidos por el reglamento de Trabajo Especial de Grado de la Escuela de Química:

Dr. José Chirinos
(Director)

Dr. Alberto Fernández
(Jurado)

Dr. Luis Gómez
(Jurado)

Resumen

Primero se validó de la metodología utilizada para la determinación de elementos trazas en muestras cabello por espectrometría de emisión óptica con plasma inductivamente acoplado. Luego se determinó la cantidad de metal adsorbida por el cabello para ello se impregnó el cabello con sudor artificial y posteriormente, se realizó el estudio de remoción con los diferentes agentes de lavado estudiados, para determinar la cantidad de metal que es removido por los diferentes agentes de lavado. Los agentes de lavado estudiados fueron el EDTA (1-7%), acetona, agua, etanol, éter, y hexano.

Se encontró que, el EDTA a concentraciones mayores al 5% ataca el contenido endógeno del cabello. Para los lavados de cabello, utilizando solventes orgánicos se halló que solo algunos de los metales estudiados son removidos, y se obtuvo una capacidad de remoción similar, el solvente orgánico con que se encontró una capacidad de remoción ligeramente mejor fue con la mezcla hexano-etanol. Además se estudiaron, lavados de cabello utilizando la combinación **EDTA / Solventes orgánicos / Agua**, con la cual se obtuvo mejores resultados (mayor poder de remoción) que al utilizar cualquier solvente, por lo que se puede concluir que la forma más eficiente para remover el contenido exógeno del cabello es utilizando cualquiera de las combinaciones propuestas.

Finalmente se determinó el contenido de elementos trazas en muestras de cabello para habitantes de la ciudad de Los Teques, son similares con los niveles normales reportados en otros estudios.

INDICE

CONTENIDO

CAPÍTULO I

I. INTRODUCCIÓN	1
-----------------	---

CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1. Los Elementos Biogénicos (bioelementos)	3
II.2.Determinación de elementos traza en muestras biológicas	5
II.3.Descripción del cabello como muestra biológica	6
II.4. Elementos trazas en cabello	9
II.5.Determinacion de elementos trazas en cabello	10
II.6.Limitaciones del análisis que se deben considerar para la determinación de bioelementos en cabello	12
II.7.Tratamiento pre-analítico	
II.7.1Toma, recolección y conservación de las muestras de cabello	15
II.8. Tratamiento analítico	
II.8.1 Lavado de las muestras de cabello	17
II.8.2. Digestión de las muestras de cabello	20
II.9. Análisis elemental del cabello con utilidad clínica	22
II.10. Técnicas de espectroscopía atómica empleadas en la determinación de elementos traza en cabello	25
II.11. Fundamentos de la espectrometría de emisión con fuentes de plasma	27
II.11.1. Fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP, Inductively Coupled Plasma)	28

CAPITULO III

III.1. Justificación	31
III.2. Objetivo genera	32
III.3. Objetivos específicos	32

CAPITULO IV. PARTE EXPERIMENTAL

IV 1- Instrumentación	33
IV 2- Reactivos y limpieza del material	33
IV 3- Preparación de la solución de sudor artificial	35
IV 4- Muestreo	35
IV 5- Tratamiento de las muestras	35
IV 6- Estudio de metales en el cabello	37

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Estudio de metales en cabello.

PARTE I

I.1- Validación del método	37
I.2- Cálculo de los límites de detección y cuantificación	38

PARTE II

II.1- Contaminación de la muestra con sudor artificial	39
II.1.1- Cantidad de metal adsorbida por el cabello	39
II.2- Lavados con soluciones de EDTA	40
i. Porcentaje elemental de origen endógeno	41
ii. Eficiencia del lavado de cabello	41
iii. Porcentaje elemental de origen exógeno removido por los agentes de lavado	41

II.3- Lavado con solventes orgánicos	41
II.4- Lavado utilizando EDTA /Solventes orgánicos/Agua	42
PARTE III	
IV III.1 Determinación de elementos trazas en muestras de cabello	42
CAPITULO V. RESULTADOS Y DISCUSIONES	
PARTE I	
I.1- Validación del método	43
I.2- Límites de detección y cuantificación	43
PARTE II	
II.1- Cantidad de metal adsorbida por el cabello	44
II.2- Estudio de los solventes para el lavado de cabello sobre la remoción de metales en cabello	45
II.2.1- Lavado con soluciones de EDTA	
II.2.1.1- Porcentaje elemental de origen endógeno	53
II.2.2- Lavado con solventes orgánicos	55
II.2.2.1- Eficiencia del lavado de cabello	56
II.2.3- Porcentaje elemental de origen exógeno removido por los agentes de lavado	60
PARTE III	
III.1- Determinación de elementos trazas en cabello	63
CONCLUSIONES	74
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	76
APENDICE	77

Desde 1962, se ha estudiado el contenido de bioelementos en cabello humano debido a que existen evidencias que este tipo de muestra proporciona información útil sobre la exposición a elementos tóxicos en el trabajo y el medio ambiente ^[1]. Además, puede ayudar al diagnóstico de ciertas enfermedades y el uso de ciertas drogas. ^[1,2]

Actualmente, el análisis de cabello es utilizado para los estudios de contaminación del medio ambiente y la exposición a ambientes potencialmente tóxicos. Así como para evaluar la condición nutricional y física de varios metales esenciales (Ca, Cr, Cu, K, Mg, Mn, Na y Zn), y tóxicos (Ag, Al, Cd, Ni y Pb). ^[3, 4, 5]

El interés en el análisis de cabello como una muestra clínica ha aumentado en los últimos años debido a las ventajas que ofrece sobre las muestras de sangre y orina: la concentración de la mayoría de los bioelementos en el cabello son más altos que en otros materiales humanos y las muestras pueden ser recogidas con mayor rapidez y facilidad. El cabello es un material químicamente inerte y no se requieren de condiciones especiales de almacenamiento a diferencia de la sangre y orina. ^[6]

La composición elemental de cabello (a diferencia de la sangre o la orina) se debe a la exposición o ingesta a largo plazo de metales en el metabolismo y la exposición ambiental. ^[7] La concentración depende también de la edad, sexo, localización étnica y geográfica, ^[8] color de pelo, los hábitos alimentarios, ^[9] por lo que se deben considerar estos factores para interpretaciones de los resultados.

Para la determinación de elementos trazas en cabello se debe hacer una distinción entre los elementos incorporados en el cabello desde dentro del organismo (mecanismo endógeno) y los incorporados mediante un medio externo (mecanismo exógeno), por lo que se debe diferenciar esta contaminación de las fuentes externa del contenido endógeno. ^[6]

Existen numerosos estudios que en los cuales se busca una metodología apropiada para la eliminación de los elementos trazas incorporados mediante un mecanismo exógeno. El método recomendado por el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA), ha sido utilizado en varios estudios ^[10] como un paso previo en el tratamiento para eliminar la contaminación externa. En este método, las muestras secuencialmente se lavan con acetona una vez, tres veces con agua des-ionizada, y con acetona una vez más. ^[6] Otros métodos que han trabajado para eliminar la contaminación externa, consisten en la utilización de acetona, agua, SLS, de isopropanol, ácido etilendiamintetraacético (EDTA), Triton X-100, ácido nítrico diluido, ácido clorhídrico diluido, y champú comercial. ^[5, 6, 11]

Se han realizado trabajos que comparan la eficiencia de remoción de los métodos de lavado utilizando combinaciones de estos agentes. ^[5] A pesar de todos los trabajos que se han hecho, aun no se ha logrado conseguir un método certificado en el que se haga la remoción completa de los elementos que se desean estudiar para posteriormente hacer la determinación de estos elementos en cabello.

En el presente estudio se evaluó hasta qué punto el contenido exógeno de bioelementos en cabello pueden ser removido mediante lavados con diferentes solventes y procedimientos para posteriormente determinar su contenido endógeno. Los resultados indican que la mayoría de los elementos estudiados ya se encuentran presentes como contenido exógeno por lo que es necesario utilizar algún tipo de tratamiento que permita su remoción porque este contenido puede llevar a interpretaciones erróneas si se relaciona con alguna patología. De los procedimientos utilizados la metodología que resultó mas adecuada fue un tratamiento donde inicialmente se lava con EDTA luego con un solvente orgánico y finalmente con agua.

II.1. Los Elementos Biogénicos (bioelementos).

Se conocen como bioelementos todos aquellos compuestos químicos que cumplen una función biológica en el organismo, de acuerdo a su abundancia en el cuerpo pueden ser clasificados como elementos principales, secundarios y elementos trazas. Los Bioelementos principales, llamados también **elementos mayoritarios**, constituyen el 95% de la masa total de los seres vivos, lo cuales son: **C, H, O y N**. Por su parte, los bioelementos secundarios representan el 4,5% de la materia viva y los elementos traza, menos del 0,01%. ^[14]

Los **bioelementos secundarios** son conocidos también como macrominerales o elementos en masa, existen típicamente en estado iónico en los alimentos y en el cuerpo humano. ^[14] A este grupo pertenecen: **P, Mg, Ca, S, Na, Cl y K**; Entre las funciones y consecuencias de las deficiencias de algunos de estos elementos en el organismo.

Los **elementos trazas** se encuentran en concentraciones muy pequeñas partes por millón (ppm) o parte por billón (ppb) en los tejidos corporales y algunos de ellos son esenciales para el crecimiento óptimo, la salud y el desarrollo de los organismos vivos. Son aquellos metales que se han comprobado ser necesarios para el rendimiento óptimo de una función específica en el organismo. Pueden estar en como iones cargados o unidos a proteínas si se encuentran en la sangre o en otros líquidos celulares. Estos actúan como activadores de enzimas, y ejercen labores estructurales y metabólicas, estimulan o inhiben la función hormonal, regulan las respuestas fisiológicas, la velocidad y la calidad de la transmisión nerviosa, entre otros procesos biológicos. Ejemplo de ellos son: **Fe, Zn, Se, Mn, F, Mo, V, Cu, Cr, Co, Ni, B y Si**. ^[15] Algunas de las funciones, consecuencias de las deficiencias en el organismo humano y síntomas asociados con la toxicidad (cuando sus concentraciones exceden determinados límites).

Es importante señalar que algunos elementos traza presentes en el organismo poseen esencialidad incierta, por lo tanto, sus funciones y requerimientos se encuentran indefinidos en virtud de los papeles a saber en el funcionamiento del cuerpo humano. Entre ellos se encuentran: **Li, Al y Sn**.^[15]

La presencia de oligoelementos en el organismo humano es de gran importancia debido a que los **elementos trazas**, regulan las actividades de muchas enzimas y proteínas, actuando como biocatalizadores que permiten la transformación química de grandes cantidades de sustratos a partir de los cuales se producen los diferentes componentes necesarios para llevar a cabo todos los procesos vitales.^[15]

Entre los diferentes metales que están presentes en los seres vivos estos pueden cumplir funciones biológicas o no; por lo que se puede clasificar como esenciales y no esenciales.

Es importante destacar que cualquier elemento químico, sea esencial o no, puede ser tóxico a partir de unos determinados niveles. Existe un rango de concentraciones considerado óptimo dentro del cual se alcanza un valor que le permite al metal desempeñar correctamente las funciones biológicas en un organismo. Por debajo o encima de este rango se produce la **deficiencia o toxicidad** respectivamente, lo que conlleva a la aparición de efectos patológicos o incluso la muerte.

Los niveles óptimos de un elemento químico se mantienen en un organismo mediante mecanismos homeostáticos. De esta forma se controla la absorción, almacenamiento y excreción del mismo. Sin embargo, se puede producir déficit o exceso debido a la dieta, a problemas en los mecanismos de absorción, etc.

Finalmente, los elementos trazas no esenciales o tóxicos pueden producir una patología aguda, desarrollada rápidamente tras la ingesta o el contacto con una dosis alta o crónica y por exposición a dosis bajas a largo plazo. Ejemplo de ellos son: **Pb, Cd, Hg y As.**

En la figura 1 se presenta un esquema que ilustra la clasificación de los elementos químicos en los seres vivos.

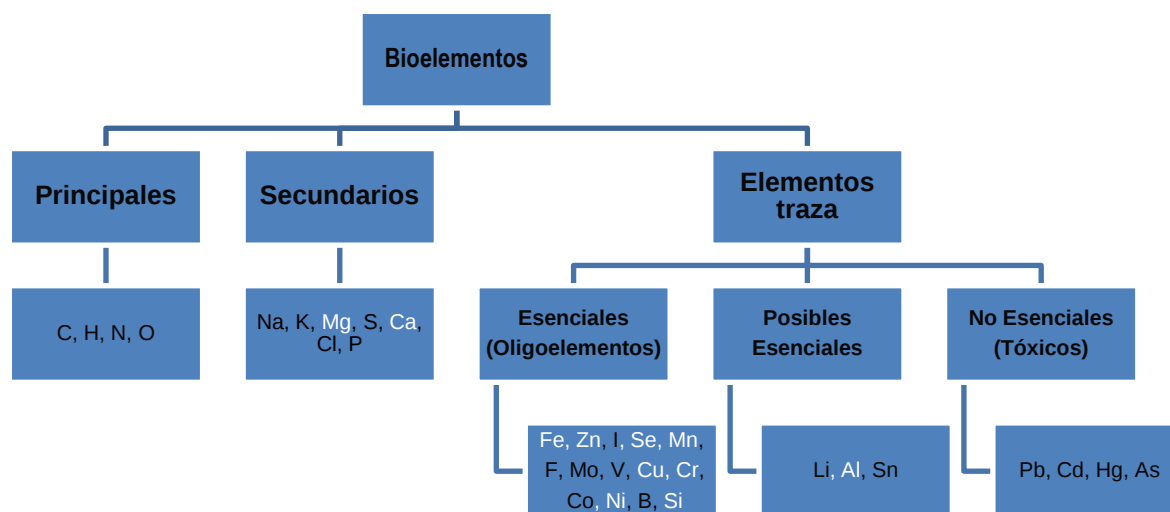


Figura 1. Clasificación de los elementos químicos en los seres vivos.

II.2. Determinación de elementos traza en muestras biológicas

Diversos materiales biológicos, como el cabello, la leche materna, la sangre, la orina y las uñas se han utilizado para evaluar los niveles de bioelementos en el cuerpo humano.

La cuantificación a nivel de trazas de estos elementos en muestras complejas de origen humano representa una tarea de gran importancia para la química analítica moderna ya que la determinación de los niveles de bioelementos en el organismo es de vital importancia debido a que su deficiencia indica la presencia de posibles patologías que pueden ocurrir en el organismo o su alta concentración también puede causar problemas crónicos en el organismo.

La mayoría de los estudios de elementos traza incluyen análisis en sangre y orina. Sin embargo, estas muestras se utilizan en la mayoría de los casos o comúnmente para evaluar exposiciones recientes y estudiar el perfil de eliminación de elementos tóxicos. Los resultados de estos análisis pueden estar condicionados igualmente por el consumo reciente de alimentos que aportan algunos elementos traza al organismo o por la utilización de fármacos.

El tratamiento de muestras biológicas es un procedimiento que conlleva un análisis estandarizado (protocolo de análisis) debido a lo difícil que resulta el tratamiento de estas muestras para de esta manera garantizar la confiabilidad de los resultados. La creciente necesidad de utilizar diferentes tipos de muestras biológicas para realizar un diagnóstico confiable sobre ciertas enfermedades, nos ha llevado a realizar estudios sobre los niveles de metales en cabello y utilizarlo como un indicio sobre la existencia o ausencia de una enfermedad.

II.3.Descripción del cabello como muestra biológica.

El cabello es una fibra de queratina que se forma en un folículo de la epidermis constituye un rasgo característico de la piel del ser humano.^[16] Se puede considerar como una pequeña unidad de excreción de los elementos traza, además, puede actuar como una especie de tejido almacenador donde los metales integran a su matriz proteica en la medida que crece.^[3,17]

Su estructura básica consiste en dos o tres cadenas de α -queratina entrecruzadas en hebras llamadas microfibrillas organizadas en haces. Las hebras de cabello son estabilizadas y obtienen su forma por uniones disulfuro de hidrógeno que hacen que el cabello adquiera una estructura semicristalina.

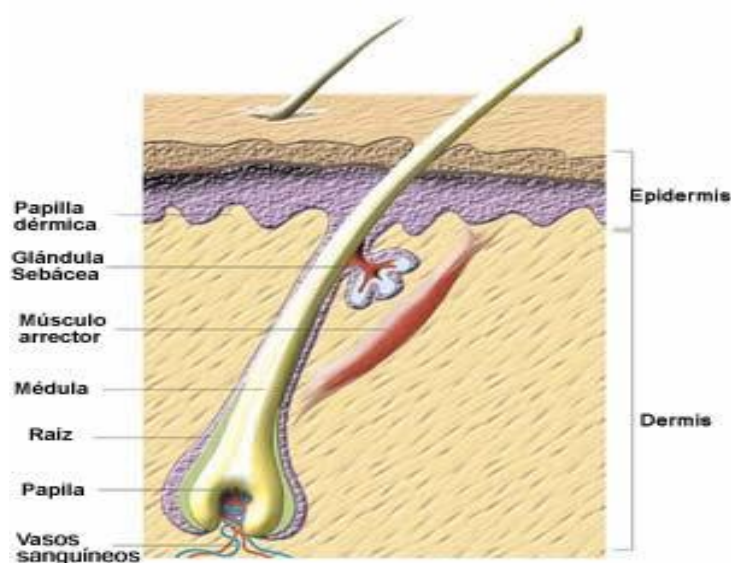


Figura 2. Estructura del cabello

Cada cabello consiste de una raíz, ubicada en un folículo piloso y un tallo que se proyecta hacia arriba por encima de la superficie de la epidermis. La zona papilar está compuesta de tejido conjuntivo y **vasos sanguíneos**, que le proporcionan las sustancias nutritivas esenciales necesarias para su crecimiento. La cutícula es la capa más externa, le sigue una capa intermedia que es la corteza y la más interna es la médula. ^[16,18]

El cabello se compone mayoritariamente de proteínas (65% a 95%), el resto lo forman lípidos (1% a 9%), pigmentos como la melanina (% variable que depende del color del cabello), sales minerales (0,25% a 0,95%), agua (15% a 35%) y elementos químicos.^[18]

La proteína más abundante es la queratina, la cual está compuesta por cadenas polipeptídicas muy ricas en cisteína. La cisteína (figura 3) es un aminoácido azufrado, que contiene un grupo sulfidrilo o tiol (SH) que puede oxidarse dando el dímero cistina (14%) en la que el enlace disulfuro constituye un puente covalente entre dos restos de cisteína.^[19]

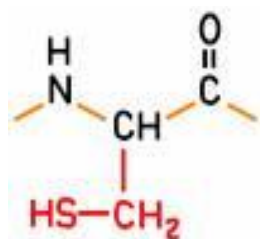


Figura 5. Estructura química de la cisteína

El cabello con respecto a otras muestras biológicas tiene varias ventajas, ya que se recopilan a través de una toma de muestras no invasiva, y contiene la mayor concentración de elementos para determinar con mayor eficacia el contenido de estos elementos en el cuerpo humano, a diferencia de la sangre, en la que las concentraciones tienden a mantenerse constantes mediante mecanismos de control homeostático. De esta manera, se extraerán de los tejidos o de la parte ósea los elementos deficientes para mantener sus niveles estabilizados por medio de mecanismos fisiológicos y bioquímicos.^[14]

El cabello, a diferencia de la sangre u órganos, se puede recoger fácilmente y sin molestias y es fácil de transportar y almacenar. La composición elemental del cabello (a diferencia de la sangre o la orina) se debe a la exposición a largo plazo a estos metales, ya que el cabello es un indicador de los últimos cambios en el metabolismo y la exposición ambiental. ^[7]

La conservación de muestras de sangre y orina exige refrigeradores o tratamientos con preservativos. A diferencia de la sangre, el cabello es una muestra inerte, estable a temperatura ambiente y químicamente homogénea.^[17] Aunque su aspecto es frágil es prácticamente indestructible, sólo si se le quema o trata con ácidos fuertes se le altera. ^[18]

II.4. Elementos trazas en cabello.

El cabello actúa como una especie de tejido almacenador así su contenido metálico consigue reflejar el estado del organismo a largo plazo debido a su lento crecimiento. Como término medio el cabello crece a una velocidad que oscila entre 0,7 y 1,5 cm/mes (dependiendo del sexo y edad), por lo que, una muestra de cuatro centímetros de longitud, puede reflejar la concentración promedio de los elementos traza de los últimos cuatro meses. ^[3,18,20,21]

La concentración de elementos en sangre y orina reflejan un estado actual o reciente, el del momento de la extracción lo que representa un período relativamente corto dependiendo de algunos elementos. ^[17]

La alta afinidad del cabello por los metales es debida principalmente a la presencia de la cistina. El mecanismo endógeno para la absorción se logra ya que muchos metales encontraron anclarse al cabello por medio de los átomos del azufre en cistina o a los grupos sulfidrilo (SH) presentes en otros aminoácidos. ^[2]El cabello está

esencialmente reticulado, parcialmente cristalino, orientado, red polimérica que lleva varios enlaces básicos de los grupos funcionales los cuáles son capaces de atar las moléculas pequeñas. ^[22]

Los metales pueden atarse a la estructura del pelo a través de melanina, la cual determina el color del pelo dependiendo de la cantidad y el tipo de melanina incorporaron en el cabello. La melanina es un polímero polianiónico con grupos semiquinones carboxil negativamente cargados en el pH fisiológico y consecuentemente puede atar los cationes cercanos por interacción iónica. Aminas, iones orgánicos y metales pueden tener una alta afinidad por la melanina, porque están positivamente cargado en el pH fisiológico y obrar recíprocamente con el polímero de la melanina por las fuerzas electrostáticas en medio sus grupos catiónicos y las cargas negativas en polímero de la melanina. El atascamiento iónico puede también ser realizado por otras fuerzas tales como atracción de van der Waal. Metales sin carga como el mercurio elemental, puede también atarse a la base hidrofóbica de la melanina polímero en la estructura del pelo. ^[23]

La abundancia de elementos metálicos en cabello es debido a que estos pueden ser incorporaron en el pelo desde dentro del cuerpo (endógeno), que debe ser distinguido de la contaminación por las fuentes externas (exógenas). ^[2]

Sin embargo, la contaminación del ambiente y de los cosméticos por ejemplo champúes, aerosoles para el cabello, jabones y perfumes ^[22], tratamientos más permanentes de la belleza del cabello también altera el contenido del elemento de rastro del pelo. Esta contaminación externa complica la interpretación de los resultados del análisis de cabello, ya que alteran los resultados en la determinación de niveles elementales endógenos.

Además la concentración de metales en cabello humano están estrechamente vinculados a la caracterización de los parámetros y condicionado la vida humana, como la nutrición, el medio ambiente, la salud, la edad, el sexo y la raza. ^[8]

II.5.Determinacion de elementos trazas en cabello.

La investigación de elementos traza en cabello humano se ha correlacionado con el diagnóstico de diversas enfermedades (como el cáncer) ^[21] así como en la ciencia forense para demostrar estados de intoxicación. El cabello también es utilizado como indicadores de deficiencia en la nutrición. ^[23] Según la Agencia de Protección Ambiental (EPA), el cabello es una de los más importantes materiales biológicos, para la vigilancia del medio ambiente en el mundo ^[6] Cabello humano es una rentable y conveniente indicador biológico de la contaminación ambiental. ^[8]

El análisis de cabello es utilizado para el estudio del medio ambiente y la exposición profesional. Así como para evaluar la condición nutricional y ambiental de varios metales esenciales (Ca, Cr, Cu, K, Mg, Mn, Na y Zn) y tóxicos (Ag, Al, Cd, Ni y Pb). ^[7]

Además, la localización dinámica a lo largo del cabello presenta un panorama general de la exposición media en la escala de tiempo que va de semanas a meses. En el caso de la orina los elementos traza son excretados, sin embargo, una fracción de ellos se acumula en otras partes del cuerpo, lo que representa un impedimento de poder registrar valores elevados se debe al desplazamiento de éstos a otros tejidos u órganos ya que de otra forma deberían aparecer en las heces o en otros fluidos corporales. ^[24] No obstante, este tipo de análisis puede ser utilizado para medir el perfil de eliminación de elementos tóxicos en higiene laboral o la tasa de eliminación de Ca, P y Mg en relación con el metabolismo óseo. ^[25]

Debe existir un método que permita una diferenciación entre los elementos incorporados desde adentro del cuerpo de los que se incorporan desde afuera. Esta distinción es crucial para la interpretación de los resultados, existen una gran cantidad de estudios, pero la conclusiones son escasa y aun no se cuenta con un método estandarizado para la realización de estos análisis.

II.6. Limitaciones del análisis que se deben considerar para la determinación de bioelementos en cabello.

Para hacer la determinación de metales en cabello se tienen que considerar ciertos aspectos inherentes a algunos factores que pueden influir de una manera u otra en los resultados, es por ello que se deben tomar en cuenta numerosos factores que puedan influir de una forma u otra.

El contenido elemental del cabello está influenciado también por factores como la **utilización de fármacos** o medicamentos: los anticonceptivos orales dan lugar a una disminución de los niveles de Cu y un aumento del Zn, también, el suministro de suplementos dietéticos de Ca, se refleja en un aumento de este elemento en el cabello, ^[3] por ello, es importante que cada muestra posea un registro adjunto de datos del donante que incluya hábitos alimenticios y consumo de medicamentos u otro fármaco. ^[26]

La edad, el sexo y el color del cabello del donante también influyen, elementos como el Mg, Ca, Cu y Zn tienden aumentar con la edad, aunque el Ca comienza a disminuir a partir de los 60 años. ^[3] Costa et al., 1994, encontraron que el contenido de Zn, Cu, Ni y Mn en el cabello de mujeres es más alto en comparación con el de los hombres independientemente del color, el cabello rubio en general, presentó los valores de concentración más bajos de estos elementos independientemente del sexo. También, hallaron la cantidad máxima de estos metales en el cabello negro, seguida

por el castaño y rojo. En este sentido, es recomendable al interpretar los resultados, realizar una clasificación de las muestras tomando en cuenta estos aspectos con la finalidad de hacer una discusión adecuada. ^[27]

El cabello difiere en forma significativa en su composición elemental en habitantes de distintas localizaciones geográficas. Estas variaciones Chojnacka et al., 2005, la han atribuido a las diferencias en los hábitos alimenticios y a la contaminación ambiental. ^[20] Las interferencias en los análisis se pueden reducir, como se mencionó anteriormente, adoptando un método de lavado o pretratamiento de las muestras que permita remover los metales adheridos en el cabello producto de la contaminación externa y recurriendo a valores de referencia confiables de concentración de elementos traza determinados en habitantes de cada región. ^[28]

Otro factor crucial que se debe tomar en cuenta son aquellos elementos que se adhieren a la superficie del cabello (mecanismo exógeno) actúan como contaminantes cuando el interés del análisis es la evaluación del estado nutricional y toxicológico de la persona. Morton et al., 2002, refieren que esta contaminación complica la determinación del contenido elemental endógeno del cabello y la interpretación de los resultados. ^[15] Este aspecto puede ser reducido al mínimo adoptando un método de lavado de las muestras y recurriendo a valores de referencia confiables para los elementos determinados. ^[13,17] En un estudio clínico, hechos en 2003, señalan que cada laboratorio debe preparar sus propios valores de referencia para evaluar si los pacientes presentan concentraciones inferiores o superiores a los considerados normales. ^[13] A pesar de los problemas planteados por la contaminación externa y la carencia de metodologías estandarizadas en el análisis de cabello, la Organización Mundial de Salud (OMS) y la Agencia Internacional de Energía Atómica (AIEA) han recomendado el empleo de este tipo de pruebas para la supervisión de metales pesados en algunos casos. Según la Agencia de Protección Ambiental (EPA, Environmental Protection Agency), el cabello es

uno de los materiales biológicos más importantes, confiables y convenientes para evaluar el grado de contaminación de una región. ^[23]

Factores que se deben controlar para determinar bioelementos en cabello

Algunos autores, ^[26,29] han comentado sobre la carencia de metodologías analíticas estandarizadas para llevar a cabo la determinación de elementos traza en el cabello. En este sentido, algunos investigadores ^[3,23,4,7,30] han realizado trabajos en los cuales han desarrollado y comparado algunos métodos de lavado y digestión de las muestras gracias al avance en las técnicas analíticas, los cuales se darán a conocer más adelante, para obtener unos niveles de referencia adecuados, es necesario tener en cuenta los **factores preanalíticos** que son mostrados en la tabla 2, debido a que influyen en los resultados del análisis y deben ser considerados durante su interpretación. ^[3]

Tabla 1. Factores preanalíticos que influyen en los resultados del análisis elemental del cabello. ^[3]

Factores considerados

Región: Localización anatómica y longitud de la muestra.

Factores intrínsecos: edad, sexo, raza, color de cabello.

Factores extrínsecos: Entorno geográfico, utilización de fármacos, suplementos dietéticos y tratamientos externos.

Pretratamiento y tratamiento de la muestra: Método de lavado y de digestión.

II.7.Tratamiento pre-analítico

II.7.1Toma, recolección y conservación de las muestras de cabello

La toma de las muestras tiene que realizarse evitando la contaminación con materiales e instrumentos. Currenti y Navarro, 1995, han publicado un procedimiento para realizar el muestreo de cabello de una manera sencilla y estandarizada. Concretamente recomiendan antes de tomar las muestras, limpiar las tijeras con acetona para eliminar todo rastro de grasa y polvo que pudiese quedar en sus superficies de corte. De igual manera, la persona que realice el muestreo debe lavarse las manos antes de proceder a la recolección o usar guantes adecuados. ^[26]

Si el cabello ha recibido algún tratamiento artificial como tinte, la decoloración y la ondulación en frío (permanente), el muestreo en estos casos debe efectuarse después de las diez semanas de concluido el tratamiento. ^[26] Ródenas de la Rocha et al., 2003, dicen que la toma de la muestra se debe realizar lo más cerca posible del cuero cabelludo, debido a que las zonas distantes, se exponen a la contaminación ambiental durante un período de tiempo más prolongado que las regiones próximas produciéndose un gradiente de concentración a lo largo del cabello. ^[3]

Debido a las posibles variaciones que se puedan dar en diferentes zonas de donde se tome la muestra, estos autores han expuesto, sobre la diferencia en la concentración de elementos traza que se origina como consecuencia de las distintas regiones del cuero cabelludo de donde se toma la muestra. De igual manera destacan, que aun dentro de un mismo lugar de muestreo y en una misma persona, se han reportado variaciones en el contenido de metales. Esto se debe a que no todos los cabellos de una misma zona se encuentran en fase de crecimiento, además, las velocidades de crecimiento no son homogéneas en las diferentes regiones en las que

éstos se encuentran divididos, causando variaciones en la concentración de metales de acuerdo a la longitud.^[26,3]

De acuerdo a los estudios mencionados anteriormente, la región del cuero cabelludo ampliamente recomendada en los estudios^[4,29,31] para los análisis, es la occipital o el área alrededor de la nuca (figura 3), por ser la menos expuesta a la contaminación ambiental y en la que perdura el cabello, incluso en individuos con alopecia.^[3] También, la velocidad de crecimiento del cabello es más constante, (aproximadamente 1,0 cm/mes) y es la región menos afectada por el sexo y la edad del donante.^[26] Las muestras se deben conservar en recipientes o bolsas plásticas para evitar contaminación del medio externo.



Figura 3. Región del cuero cabelludo recomendada para los análisis

II.8. Tratamiento analítico.

II.8.1 Lavado de las muestras de cabello.

Para la determinación del contenido elemental endógeno del cabello, es necesario efectuar un procedimiento de lavado previo de las muestras antes de realizar el proceso digestión. ^[26] La finalidad es tratar de eliminar los elementos adheridos en la superficie del cabello mediante un mecanismo exógeno, pues su presencia, puede alterar los resultados de los análisis ya que actúan como contaminantes.

Diversos agentes de lavado han sido empleados por los investigadores en sus trabajos para minimizar en lo posible las interferencias causadas por la contaminación externa de las muestras, entre éstos se encuentran:

- i.* Disolventes orgánicos: Acetona, metanol, isopropanol, diclorometano, n-hexano, dimetil éter, etil éter.
- ii.* Soluciones acidas: el ácido clorhídrico (HCl) diluido.
- iii.* Agentes acomplejantes: el ácido etilendiaminotetracético (EDTA).
- iv.* Surfactantes iónicos: el lauril sulfato de sodio y no iónicos como el Tritón-X-100. ^[5,23,29,30]

Algunos de los métodos físicos utilizados para llevar a cabo el procedimiento del lavado incluyen: baños ultrasónicos, centrifugadoras y plataformas capaces de producir vibraciones y agitaciones constantes con temperatura programable. ^[23,28,29]

Entre los procedimientos de lavado publicados se encuentra el protocolo de la AIEA, el cual recomienda que las muestras de cabello sean lavadas con acetona, tres veces con agua des-ionizada y una vez más con acetona. Entonces, éstas deben estar diez minutos a temperatura ambiente en contacto con el solvente y el lavado tiene que ser realizado en un recinto libre de polvo. No obstante, este método

es probablemente adecuado para el retiro de suciedad, pero no asegura la remoción total de los elementos trazas incorporados al cabello por el mecanismo exógeno.^[23]

El procedimiento recomendado en el método propuesto por AIEA para lavados es con acetona que a pesar de no presentar gran poder de remoción puede ser ampliamente usado para quitar cualquier resto de material de otra naturaleza de la superficie del cabello.^[26] En algunos estudios,^[14, 29, 21, 12] han usado el protocolo de la AIEA por rutina, sin embargo, en otros trabajos no lo han empleado y han utilizado la acetona combinándola con diferentes solventes orgánicos (isopropanol-acetona-metanol; n-hexano-acetona-metanol, etil éter-acetona, entre otros.)^[28, 29, 31]

De los estudios realizados, la utilización del EDTA como agente quelante, tiene la capacidad de eliminar o aislar a los iones metálicos.^[32] Este reactivo ha sido estudiado y empleado por algunos investigadores en sus lavados debido a que puede acomplejarse con los metales adheridos en la superficie del cabello.

Morton et al., 2002,^[6] se plantearon desarrollar un método de pretratamiento de las muestras de cabello para ser usado en la determinación de Sb, As, Cd, Cr, Pb, Hg y Se. Una investigación de diferentes métodos de lavado fue realizada para averiguar si era posible retirar los elementos adheridos en la superficie del cabello y permitir la determinación del contenido elemental de metales de origen endógeno. En su estudio incluyeron el empleo de acetona, agua, el isopropanol, soluciones al 1% de lauril sulfato de sodio, EDTA y Tritón X-100, HCl 0,1M y un champú comercial. Para determinar si estos métodos podrían ser utilizados y distinguir entre las especies incorporadas por los mecanismos endógeno y exógeno. Muestras de cabello contaminadas con una solución de 100 ng/mL de Sb, As, Cr, Pb, Se y Hg preparada en un sudor artificial y una enriquecida con un isótopo de cadmio (Cd^{106}) fueron lavadas y analizadas. Concluyeron, que usando el HCl 0,1M se elimina el Cr, Cd y Pb, además, no es posible remover el Sb, As, Hg y Se por ninguno de los métodos de lavado estudiados.^[23]

Jorma K, Seppo S, trabajaron con X-100, lauril sulfato de sodio, acetona, y una mezcla de (1:1) de hexano y etanol indica que el procedimiento de lavado recomendado implica dos lavados de 20 minutos con solución acuosa 1% lauril sulfato sódico solución después de un enjuague con hexano.

Raghupathy L, y Masazuki H, compararon diferentes métodos de lavados de cabello antes del tratamiento elemental, utilizado como agentes de lavado, agua desionizada, solventes no iónicos como acetona, éter y tetracloruro de carbono, solventes iónicos como lauril sulfato de sodio, y agentes quelantes cada procedimiento seguido de ultrasonido en esta investigación se encontró que las soluciones de EDTA es el agente de lavado mas adecuado, sin embargo concluyeron que es necesario estandarizar una metodología de lavado de cabello.

D. Vicente Mattera, Vicente A., para evaluar la capacidad de los diversos agentes de lavado para extraer el cobre y el zinc en cabello, se utilizó ácido nítrico, dodecil-sulfato sulfato sódico (SDS), y EDTA se evaluó su capacidad de extracción de metales como una función de tiempo. Se llegó a la conclusión de que una solución de ácido nítrico 0,125% eliminado el 95% de la de zinc en 30 horas Soluciones de 5% de y el 1,25% EDTA exhibieron aumento de la capacidad de extracción con el aumento del pH. Una solución de 5% a pH 6,3 SDS parece muy poco para extraer el zinc y un promedio de 78% de cobre depositado de forma exógena fue removido por un lavado de 30 minutos con un 5% de este.

Morton et al., 2002, señalan que no existe ningún procedimiento de lavado, ampliamente reconocido y aceptado para las muestras de cabello, de igual manera, dicen que ciertos aspectos como el pretratamiento de la muestra y procedimientos analíticos tienen que ser investigados para hacer de este tipo de análisis una técnica confiable y reproducible.

En trabajos mas recientes realizados por **Pérez B y Chirinos J., 2007** para evaluar la metodología de lavados con EDTA, acetona se obtuvo entre varios procedimientos utilizados que el lavado de la muestra con EDTA-acetona resulto ser el método mas eficiente en extraer los elementos exógenos, y también se recomienda estudiar mas ampliamente los métodos de lavado, el HCl 0,1M muestra una reducción significativa de la mayoría de los elementos excepto Se, Si, Existen dudas si los metales removidos son parte del contenido endógeno. ^[33]

II.8.2. Digestión de las muestras de cabello

La mayoría de las técnicas analíticas requieren que las muestras biológicas estén en solución, para ello se debe conseguir un agente oxidante fuerte para la total digestión de la muestra y que este no interfiera en los resultados obtenidos debido a que se está trabajando con a nivel de trazas para ello se debe utilizar un acido de alta pureza. Además debe generarse un líquido homogéneo y libre de partículas.

Durante la etapa de disolución puede tener lugar la volatilización del analito, por lo que se deben tomar las precauciones adecuadas, ya que algunos elementos forman cloruros volátiles que son parcial o completamente perdidos de sus disoluciones en HCl concentrado. Entre estos están, el tricloruro de arsénico, tetracloruro de estaño y cloruro mercurico, entre otros. ^[32]

Entre los reactivos más comunes empleados para disolver las muestras analíticas se han utilizado ácidos inorgánicos o sus disoluciones acuosas, el mas empleado es el ácido nítrico (HNO_3). El cual es un agente oxidante fuerte con, un amplio uso en la disolución de todos los elementos metálicos comunes. También se puede mezclar con acido clorhídrico para obtener una acción disolvente más rápida. Ésta mezcla está compuesta por tres volúmenes de ácido clorhídrico concentrado y uno de ácido nítrico (agua regia). La adición de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) aumenta frecuentemente su acción disolvente y acelera la oxidación de los materiales orgánicos de la muestra. ^[32]

En cuanto al cabello, varios procedimientos para disolver las muestras también han sido objeto de optimización, éstos incluyen: HNO_3 ó mezclas binarias de $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$; $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ y $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$, HF , siendo esta última la más empleada en los estudios, aunque, no siempre en la misma proporción. [4,19,26,31]

Sreenivasa et al., en 2002, estandarizaron un método de digestión via húmeda en un recipiente abierto, empleando una mezcla $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$. Estudiaron y optimizaron varios parámetros que influyen en la preparación de la muestra como la temperatura, tiempo de digestión y relación de la solución ácida. El procedimiento optimizado lo emplearon para tratar los materiales de cabello de referencia con el fin de verificar la exactitud del mismo. Concluyeron que el método desarrollado es exacto y eficiente para la determinación de Fe, Co, Ni, Mn, Zn, Cu, Cd y Pb en cabello. [17]

Posteriormente, **Chojnacka et al.**, en sus trabajos del 2005 y 2006, sólo utilizaron HNO_3 en sus experimentos y determinaron elementos traza esenciales como el Cr, Se, Si, Fe, Zn, Co, Ni, entre otros, y no esenciales como el As, Hg y Cd. [20, 21] Señalan que este tipo de análisis a llegado a ser importante en la valoración del grado de exposición humana a algunos elementos tóxicos.

En el estudio mencionado de **Forte et al.**, 2005, emplearon una mezcla $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ 3:1 para determinar Ca, Cu, Fe, Mg, Si y Zn en cabello de personas con la enfermedad de Parkinson. Las digestiones en estos últimos trabajos fueron asistidas por microondas. [31]

Estos procedimientos de digestión acida normalmente son asistidos por ultrasonidos, que son vibraciones sonoras. Estas vibraciones pueden facilitar y acelerar el proceso de disolución debido a que generan burbujas microscópicas que se expanden y se contraen agitando la solución y rompiendo la superficie del sólido. También, crean grietas microscópicas cuyas expansiones ayudan a romperlo. En ocasiones estas burbujas se forman por debajo de películas superficiales y son

capaces de separarla. Esto hace al ultrasonido significativamente más eficiente que una agitación manual o magnética.^[34]

El interés por aplicar la energía de las microondas y de los ultrasonidos en la preparación de muestras de cabello radica en el ahorro de tiempo que tiene la aplicación de estos, en contraste con los procesos tradicionales de digestión abierta que son largos, tediosos, aumentan el riesgo de contaminación y pueden producir pérdidas del analito por volatilización.^[14,34]

Un estudio mas reciente realizados por **Pérez Betsy, y Chirinos José., 2007**, han optimizado un procedimiento para la digestión con ácido nítrico si lo comparamos con otros reactivos como el ácidos clorhídrico, fluorhídrico, sulfúrico, perclórico donde el ácido nítrico resultó ser el mejor reactivo para reactivo para realizar la digestión.^[33]

II.9. Análisis elemental del cabello con utilidad clínica.

Hay pruebas que sugieren que el análisis de cabello proporciona la información necesaria para saber sobre la exposición elementos tóxicos en el trabajo y el medio ambiente^[1]. También se esta utilizando como una útil ayuda en el diagnóstico de ciertas enfermedades relacionadas con la concentración de bioelementos y pueden proporcionar información sobre el uso o exposición de ciertas drogas^[2]. Sin embargo, antes de que los niveles de bioelementos en el cabello sean convertidos en indicadores aceptables de la exposición normal de los valores que, se han establecido, junto con la normalización y estandarización del método de pre-tratamiento y digestión, así como la recolección de las muestras. Además, estos bioelementos incorporados en el cabello mediante un mecanismo endógeno en el organismo, deben ser diferenciados de la contaminación externa (mecanismo exógeno)^[22], al mismo tiempo se debe tener una amplia base de datos de la zona de estudio de los pacientes involucrados.

Algunas enfermedades o condiciones patológicas se asocian con alteraciones en la concentración de metales lo cual se puede ver reflejado en la concentración de estos elementos en cabello ^[25]. Para estudios realizados se han obtenido concentraciones bajas de elementos traza esenciales o altas concentraciones de elementos no esenciales, potencialmente tóxicos, en grupos de pacientes con determinadas condiciones patológicas o enfermedades. En algunos casos, se puede establecer una relación casual entre elemento y enfermedad (**Tabla 2**).

En la actualidad, pueden ser descubiertos desequilibrios nutricionales, además de patologías específicas analizando los cambios en el contenido de algunos elementos traza que podrían causar tales anomalías.^[4] **Ródenas de la Rocha et al.**, 2003, señalan que analizando muestras de cabello se han obtenido bajas concentraciones de elementos traza esenciales o elevados niveles de elementos potencialmente tóxicos, en grupos de pacientes con determinadas condiciones patológicas o enfermedades, asimismo, indican que en algunos estudios, se ha podido establecer una relación entre el elemento con la enfermedad (ver tabla 2).^[3] Un ejemplo de lo anterior es la investigación de **Kazi et al. del 2006**, quienes reportaron al analizar el cabello de niños con un defecto ocular, concentraciones bajas de Zn y Cu, también, elevados niveles de metales tóxicos como el Cd y el Pb en comparación con niños sanos. ^[4]

Tabla 2. Cambios en la concentración elemental del cabello en función con algunas enfermedades.^[3]

Enfermedad/síndrome	Elemento alterado	Referencia
Alcoholismo	Fe↑, Zn↑, Cu↑,	Skal'Nyi et al, 1991
Cáncer	Mn↑	Borella et al 1997
Cáncer esofágico	Fe↑, Se↓	Lin et al, 1977
Cáncer hepático	Zn ↓, Cu↑, Fe↑	Yongxian, 1990
Diabetes mellitus	Se↓, Mn↑, Fe↑ Cr↓, Mn↓	Anderson, 1986;Mooradian y Morley, 1987
Enfermedad de Keshan		Chen et al, 1980; Bai et al,1989
Epilepsia	Se↓ Mn↓, Mg↑, Zn↓	Papavisiliou et al, 1987; Shrestha y Oswaldo, 1987
Esclerosis múltiple	V↑, Se↑, Mn↑	Ryan et al, 1978; Muddukrishna et al 1991
Fenilcetonuria		Jochum y Terwolbeck, 1997
Fibrosis quística	Se↓	Mitchel et al, 1988
Hemodiálisis	Na↑, K↑, Zn↓	Mahajan et al, 1982
Hipertensión	Al↑, Cu↑	Bergomi,1997; Vivoli et al,1995
Hipoglucemia	Zn↓, Cu↓, Mn↓	Stebbing et al 1982;
Parkinson	Mg↓, Ca/K↑	Chem Biao, 1990

↑Aumenta; ↓Disminuye. (En comparación con un grupo control)

Chojnacka et al., 2005, señalan que este tipo de análisis ha llegado a ser importante en la valoración del grado de exposición humana a algunos elementos tóxicos y que además, en ciencia forense se ha utilizado para demostrar estados de envenenamiento.^[20]

Si se considera la utilidad clínica del análisis, se debe tener en cuenta que se ha establecido eficazmente un juicio del déficit o exceso de elementos mayoritarios como el Ca, Mg, P, K y Na en fluidos biológicos como la sangre y la orina. Sin embargo, en muestras de cabello parece más útil la determinación de elementos traza esenciales como el Cr, Mn, Cu y Zn y elementos no esenciales como el Cd y el Pb.^[3] Hay que destacar, que los resultados analíticos obtenidos tienen que ser vistos con precaución. Plantikow y Denkhaus, 1996, dicen que es recomendable en algunos casos, realizar estudios de otros tejidos o fluidos del mismo paciente para incluirlos en la evaluación final y utilizarlos para tomar una decisión concreta.^[29]

II.10. Técnicas de espectroscopia atómica empleadas en la determinación de elementos traza en cabello.

Plantikow y Denkhaus en 1996 señalaron, que los procedimientos estandarizados y recomendados para la determinación de elementos traza en el cabello no existían y por lo general, la garantía total de calidad práctica no era posible.^[29] En este sentido, los métodos analíticos para este tipo de análisis se han ido optimizando en la medida que se han desarrollado nuevas técnicas analíticas con mejores atributos de exactitud, precisión y bajos límites de detección.^[3]

Entre las técnicas de espectroscopia atómica empleadas en la determinación de elementos traza en el cabello se encuentran: La espectrometría de absorción atómica con llama (FAAS); espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS); espectrometría de emisión óptica con plasma inductivamente acoplado (ICP OES); espectrometría de masas con ionización en plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS), entre otras.

La técnica de ICP OES, ha sido ampliamente utilizada en la determinación de elementos traza en cabello debido a las ventajas que ofrece, entre éstas se encuentran:

- ✓ Bajos límites de detección (oscilan entre 0,1 y 100 ng/mL)
- ✓ Menor interferencia entre elementos, que es consecuencia directa de sus elevadas temperaturas las cuales pueden alcanzar los 5000 K en el canal central del plasma.
- ✓ se obtienen las señales de emisión para la mayoría de los elementos en condiciones similares de excitación, en consecuencia, se pueden registrar simultáneamente diversos elementos en corto tiempo con buena precisión (entre 0,5 y 2% como %RSD) y exactitud.

Esta propiedad tiene especial importancia en el estudio multielemental de pequeñas cantidades de muestra, ^[36,37] como es el caso de las muestras biológicas con las que se trabaja en los análisis, habitualmente, en cantidades limitadas.

A continuación se presentan algunos trabajos relevantes realizados en la determinación de elementos traza en muestras de cabello empleando la técnica de ICP OES:

Plantikow y Denkhaus., En 1996 optimizaron, un sistema de vaporización electrotérmica (ETV, Electrothermal Vaporization) para la introducción sólida de muestras de cabello en el ICP OES. Llevaron a cabo la determinación de elementos como el Mg, Zn y Mn. Señalaron que empleando un sistema ETV, el tiempo de preparación de las muestras es reducido al mínimo, además, se evita la contaminación durante el proceso de digestión y ofrece un método alternativo para el análisis de muestras biológicas. ^[29]

En el trabajo ya mencionado de **Sreenivasa et al.**, el análisis de las muestras de cabello lo realizaron por ICP OES, llevando a cabo de manera satisfactoria la determinación simultánea de Fe, Co, Ni, Mn, Zn, Cu y Cd. ^[17]

Hoy en día la mayoría de los trabajos, emplean la técnica de ICP-MS en la determinación de algunos elementos traza en muestras de cabello. Ésta posee ventajas similares a la de ICP OES y límites de detección más bajos, por lo tanto es más sensible. En este sentido, la técnica de ICP-MS puede ampliar el número de elementos que pueden ser determinados en muestras biológicas como el cabello, sangre, uñas y orina. ^[38]

II.11. Fundamentos de la espectrometría de emisión con fuentes de plasma

Por definición, un plasma es una mezcla gaseosa conductora de la electricidad que contiene una concentración significativa de cationes y electrones la concentración es tal que la carga neta se aproxime a cero. El origen de la emisión continua proviene de la recombinación de los electrones con el argón y otros iones.

En el plasma de argón empleado frecuentemente en los análisis de emisión, los iones de argón y los electrones son las principales especies conductoras, aunque los cationes de la muestra también estén presentes en menor cantidad. Una vez que se han formado los iones de argón en un plasma, son capaces de absorber la suficiente energía de una fuente externa como para mantener la temperatura a un nivel tal que la posterior ionización sustente el plasma indefinidamente; la temperatura puede llegar a ser de 10000 °K en el núcleo. ^[36]

Un plasma característico tiene un núcleo no transparente, blanco brillante y muy intenso, coronado por una cola en forma de llama. Las observaciones espectrales por lo general se hacen a una altura de 15 a 20 mm por encima de la

bobina de inducción. En esta zona la radiación de fondo está libre de las líneas del argón y resulta adecuada para el análisis. ^[36]

II.11.1. Fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP, Inductively Coupled Plasma)

El equipo de ICP OES utiliza una fuente de plasma de acoplamiento inductivo para dissociar los átomos o iones que constituyen la muestra, excitándolos a un nivel de energía de donde emiten luz al relajarse con una longitud de onda característica. La fuente de plasma de acoplamiento inductivo se denomina **antorcha** (ver figura 4).

Consiste en tres tubos concéntricos de cuarzo a través de los cuales fluyen tres corrientes de argón. El diámetro del tubo más grande es de aproximadamente 2,5 cm. Rodeando la parte superior de este tubo se encuentra una bobina de inducción, refrigerada por agua, que está alimentada por un generador de radiofrecuencia, capaz de producir una potencia de 0,5 a 2 KW a unos 27 o 41 MHz.

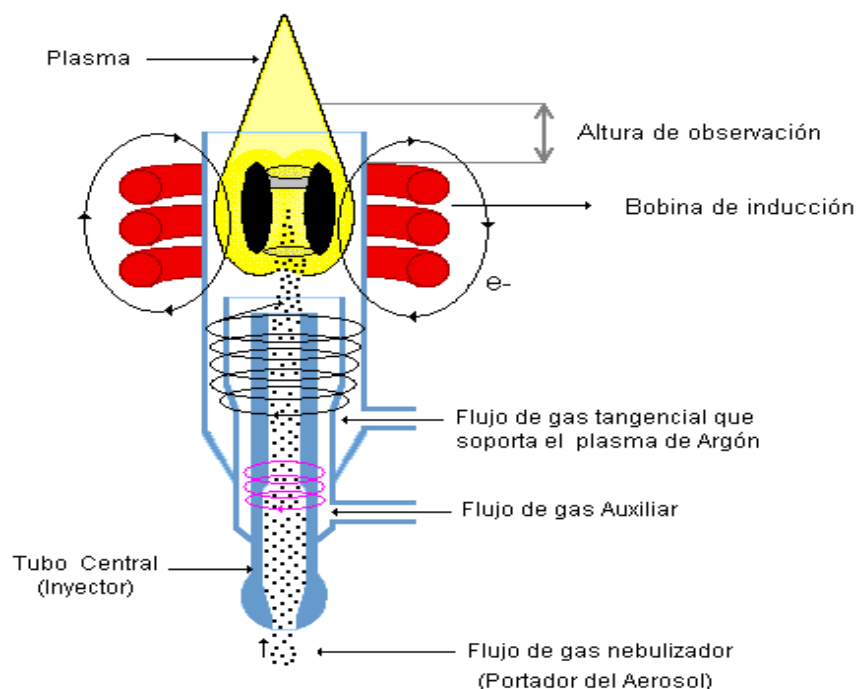


Figura 4. Fuente de plasma de acoplamiento inductivo (antorcha)

La ionización del argón que fluye se inicia por medio de una chispa que proviene de una bobina Tesla. Los iones resultantes y sus electrones asociados interaccionan entonces con el campo magnético oscilante producido por la bobina de inducción. Esta interacción hace que los iones y los electrones dentro de la bobina se muevan en trayectorias circulares.

Las temperaturas alcanzadas son debidas al calentamiento óhmico que surge como consecuencia de la resistencia que presentan los iones y electrones a este movimiento. ^[36,37]

Estos electrones ionizan el **gas plasmógeno** que se inyecta tangencialmente formando un patrón en remolino y es el responsable de sostener la descarga, además, enfría las paredes del tubo central. Otro gas también es inyectado y es llamado **gas auxiliar**, su función es estabilizar el flujo hidrodinámico en la antorcha y centra al plasma. ^[5,30] Las muestras disueltas son transformadas en un aerosol de partículas finas por los nebulizadores, los cuales se acoplan al sistema de generación del plasma. El aerosol se introduce dentro de la antorcha mediante un flujo de argón de 0,3 a 1,5 L/min llamado **flujo de gas nebulizador**. ^[36,37]

El proceso de excitación se inicia cuando la energía de la fuente ICP es transferida hacia el canal central a lo largo del cual se introduce la muestra a analizar, una vez allí comienza a sufrir un proceso secuencial de solvatación, vaporización, atomización, excitación e ionización (ver figura 5).

Posteriormente, la luz emitida por los átomos excitados e ionizados presentes en la muestras es colectada por un sistema óptico. Éste enfoca la luz hacia un detector que transforma la energía electromagnética en una señal eléctrica que es amplificada, registrada y expuesta para ser leída. En la figura 6 se presenta un esquema del instrumento de ICP OES.

Finalmente, hay que destacar que existe la posibilidad de analizar directamente muestras sólidas y gaseosas empleando la técnica de ICP OES. Para introducir las muestras sólidas se utilizan procedimientos como los de vaporización electrotérmica y ablación por láser.^[36] Las gaseosas se analizan por acoplamiento con cromatografía de gases o generación de hidruros.

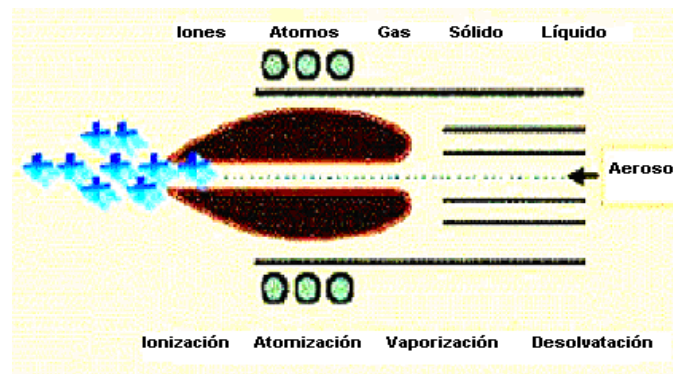


Figura 5. Estados de la materia y procesos que sufren los átomos a lo largo de su camino a través del plasma (configuración axial).

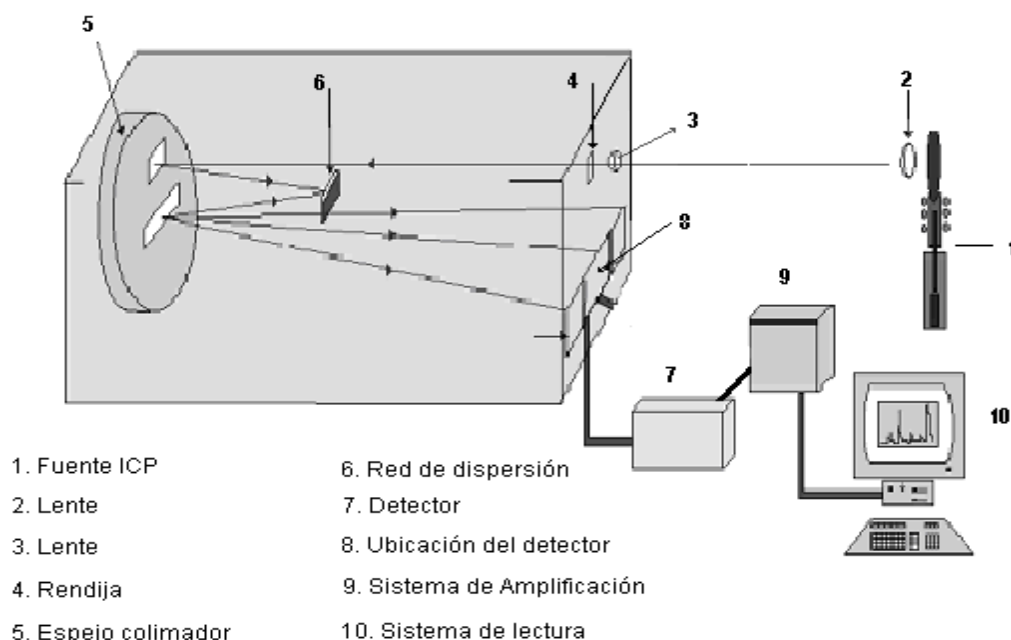


Figura 6. Sistema espectroscópico del ICP OES (configuración radial).

III.1. Justificación

El análisis del contenido de metales en muestras de cabello demuestran que este proporciona información útil sobre la exposición a elementos tóxicos en el trabajo y el medio ambiente. Además, puede ayudar en el diagnóstico de ciertas enfermedades y el uso de ciertas drogas.

A pesar de los potenciales beneficios del análisis de cabello, la exactitud de los resultados puede verse afectada por la incorporación de metales desde un medio externo (mecanismo exógeno) lo que puede influir de manera apreciable, ya que los resultados pueden interpretarse de forma errónea, sino se elimina este contenido.

Existen numerosas investigaciones sobre el tratamiento y remoción de elementos trazas incorporados mediante un mecanismo exógeno, pero aun no se cuenta con una metodología de pre-tratamiento (lavados) la cual sea ampliamente aceptada es por ello, que el Centro de Química Analítica de la Universidad Central de Venezuela ha estado desarrollando una metodología de tratamiento (digestión) y lavado de cabello para la determinación de metales, debido a la necesidad que se tiene por encontrar un método que permita el tratamiento de muestras de cabello de forma eficiente y confiable es por ello que se tiene la necesidad de continuar con este trabajo.

En la presente investigación se plantea como objetivo principal realizar un estudio de una variedad de procedimientos de pre-tratamiento (lavados) para la remoción de la contaminación externa, con diferentes reactivos para ver el efecto que tienen, en la determinación de elementos trazas en cabello por espectrometría de emisión óptica con plasma inductivamente acoplado (ICP-OES).

III.2. Objetivo General

Hallar una metodología de lavado que permita conseguir cual es el método mas eficiente para la remoción del contenido exógeno en cabello empleando la espectroscopia de emisión óptica con plasma inductivamente acoplado (ICP-OES) para la determinación de metales en cabello.

III.3. Objetivos Específicos

- ✓ Estudiar el efecto del lavado con solventes orgánicos sobre la concentración de elementos traza en muestras de cabello.
- ✓ Estudiar el efecto de los lavados con EDTA a diferentes concentraciones sobre la concentración de elementos traza en cabello.
- ✓ Determinar si los procedimientos de lavado utilizados se puede distinguir entre los elementos trazas incorporados de forma endógena y exógena.
- ✓ Determinar la concentración de elementos trazas en cabello de personas sanas con la finalidad de establecer los niveles normales de referencia de los elementos estudiados y ampliar la base de datos disponible.
- ✓ Establecer una metodología de lavado con los solventes que presenten un mayor poder de remoción de los elementos exógenos.

IV 1- Instrumentación

El análisis de las muestras de cabello se realizó un espectrómetro de emisión atómica con plasma inductivamente acoplado de argón con detección simultánea marca Thermo Jarrel Ash, modelo IRIS-HR. La tabla IV 1 presenta las condiciones de trabajo empleadas, las cuales fueron optimizadas en trabajos previos. ^[33]

Tabla IV 1- Condiciones de operación del equipo ICP-OES y longitudes de onda de trabajo.

Parámetros de operación	
Potencia del generador RF	1350 W
Flujo gas plasmógeno	12 L/min
Flujo de gas nebulizador	0,4 L/min
Aspiración de muestra	1,14 mL/min
Flujo de gas auxiliar	1,5 L/min
Longitudes de onda de trabajo	Ca(II)396,8; Zn(II)202,5; Mg(II)280,2; Al(I)309,2; Cr(II)283,5; Cu(I)342,7; Fe(II)259,9; Mn(II)257,6; Ni(II)231,6; Pb(II)220,3; Si(I)251.6; Se(I)196.0(2)

IV 2- Reactivos y limpieza del material

Todos los reactivos empleados para el tratamiento de las muestras de cabello fueron de grado analítico, se utilizó HNO₃ 65%, HCl 37%, acetona 99,5%, hexano, etanol, éter y H₂O₂ 30%(Riedel de Haen, Alemania). También, se empleó la sal disódica de EDTA al 99% de pureza (Meck, Alemania). Los ácidos inorgánicos se destilaron empleando un destilador modelo subboiling BSB-939-IR (Berghof Laborprodukte GMBH, Alemania). Este sistema carga un volumen máximo de 750 mL y puede garantizar una pureza <1ng/mL por elemento en el destilado.

Los patrones acuosos multielementales utilizados para elaborar las curvas de calibración se prepararon por diluciones sucesivas a partir de soluciones estándar de 1000 mg/L (Merck, Alemania) en un rango de concentraciones de elementos trazas que se indican en la tabla IV 2. Las curvas de calibración se elaboraron con patrones con la misma concentración ácida que la muestra. Se utilizó agua 18 MΩ en todas las soluciones preparadas, obtenida de un sistema Nano pure (Barnstead Thermolyne, Alemania).

Los materiales de laboratorio utilizados en la preparación de reactivos, soluciones y muestras fueron rigurosamente lavados con HNO₃ 5% (v/v) y enjuagados dos veces con agua desionizada antes de ser usados. Se utilizó material volumétrico elaborado de teflón para evitar la contaminación de silicio. En este sentido, todos los recipientes para el almacenamiento de las soluciones de los patrones y muestras fueron de plástico.

Tabla IV 2- Concentración de los patrones multielementales para elaborar curvas de calibración.

Concentración (mg / L)												
Patrón	Al	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Si	Se	Mg	Ca	Zn
1	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,50	6,0	2,0
2	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	1,00	10,0	4,0
3	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	2,00	14,0	6,0
4	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	4,0	16,0	8,0
5	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	6,0	20,0	10,0

IV 3- Preparación de la solución de sudor artificial

La solución de sudor artificial utilizada en este estudio, se preparó con una mezcla de sulfato de calcio (0,04g), cloruro de sodio (0,38g), sulfato de magnesio (0,0050g), sulfato de potasio (0,223g) y úrea (0,09g) disueltos en 100 mL de agua destilada.^[23]

IV 4- Muestreo

La toma de la muestra se realizó considerando los aspectos que se describen en la introducción del trabajo: edad, sexo, alimentación y color de cabello. Para ello, se recolectó la información que se presenta en el apéndice 1 para cada muestra.

Las muestras usadas en el estudio de los métodos de lavado provienen de una misma persona, la cual fue homogenizada, para disminuir los efectos provocados por la variabilidad natural de la muestra de cabello.

Las muestras recolectadas para el grupo control fueron tomadas de personas que no han sido diagnosticadas de enfermedades como cáncer u otras patologías conocidas que pueden afectar en la determinación del contenido metálico.

IV 5- Tratamiento de las muestras

En un análisis químico, la cantidad de muestra de trabajo debe ser representativa de la población que se va a estudiar y su composición debe ser igual en todas sus partes, para así garantizar que cualquier porción elegida para el análisis produzca resultados similares, esto implica que el peso de muestra de cabello utilizado puede afectar la exactitud y precisión de los resultados, debido a que la cantidad de cabello disponible para los análisis es limitada, y en la mayoría de los casos no pueden hacerse réplicas, por lo que se debe garantizar la confiabilidad del método de forma tal que este produzca resultados representativos de la muestra.

Estudios previos ^[4, 31] sugieren que se deben utilizar cantidades no menores a 0,2000g de muestra de cabello. Así mismo, un estudio realizado en un trabajo previo ^[33] demostró que utilizar 0,2000 g de cabello permite obtener resultados reproducibles.

En base a lo anterior, por cada 0,2000g de cabello se agregaron 1,5 mL de ácido nítrico y posteriormente se colocó en baño térmico a 45°C durante 3 horas, aplicando ultrasonido por periodos de 15 min. Luego se agregó 1,0 mL de peróxido de hidrogeno al 30% y se colocó nuevamente en el baño con ultrasónido a 45°C durante 3 horas, para finalmente aforar a 10 mL.

Estudio de metales en el cabello

Este trabajo experimental se dividió en tres secciones: en una primera parte se hizo la **validación del método de digestión** utilizado, ya que en los estudios anteriores el procedimiento no fue debidamente validado. En una segunda parte, se **estudió el efecto de diferentes agentes de lavado sobre los elementos de origen exógeno**, y en una tercera parte se hizo la **determinación de metales de origen endógeno en habitantes de la ciudad de Caracas**.

PARTE I

IV I.1- Validación del método

En todo análisis se debe verificar que los resultados obtenidos estén dentro de los límites de confianza establecidos para estar seguros de que los resultados que se obtendrán son confiables, ya que la exactitud de un método está directamente referida con los sistemas de validación de sus procedimientos analíticos, debido a que relaciona la concordancia entre la concentración medida y la real.

El procedimiento de digestión de la muestra se validó con el material certificado de cabello NCS ZC 81002b, suministrado por el *Centro Nacional Chino de Análisis para Hierro y Acero*. El tratamiento del mismo se hizo de acuerdo al protocolo seguido por 9 laboratorios independientes donde se coloca la muestra a 80°C durante cuatro horas, luego se pesaron 0,2000g y finalmente se procedió a su digestión con el procedimiento mostrado en la sección IV 5.

IV 1.2- Cálculo de los límites de detección y cuantificación

Una vez validado el tratamiento de la muestra se evaluaron los límites de detección y cuantificación de la técnica y de la metodología propuesta. En términos generales, el límite de detección (LOD) de un analito se define de acuerdo con la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), como la mínima concentración de analito que proporciona una señal analítica en el instrumento (y), diferente a la señal del blanco o ruido de fondo (yb), bajo las condiciones experimentales establecidas. ^[43]

No obstante, la IUPAC define de forma precisa el LOD como la concentración de analito que proporciona una señal (y) igual a la del blanco (yb) mas tres veces la desviación estándar del blanco, (sb).

$$Y = y_b + 3s_b \quad \text{Ec.IV.1}$$

En este estudio los límites de detección y cuantificación de la técnica se estimaron a partir de la curva de regresión considerando concentraciones bajas del analito. Para ello, se utilizó la suposición básica del método de mínimos cuadrados el cual establece que cada punto en la representación gráfica (incluidos el que representa el blanco o fondo) tiene una variación normal para el eje y y con desviación estándar estimada de $S_{x/y}$. De igual manera el valor del punto de corte de la recta de calibración con el eje y, se empleó como una estimación de y_b , la señal del blanco.

Para la ecuación de la curva de calibración se tiene que:

$$X = \frac{y - y_b}{m} \quad \text{Ec.IV.2}$$

Sustituyendo las ecuaciones anteriores se obtiene que:

$$LOD = \frac{3Sb}{m} \text{ Ec.IV.3}$$

Donde m es la pendiente de la curva de calibración y Sb = Sxy

El límite de cuantificación (LOQ) es considerado por la IUPAC como el límite inferior para medidas cuantitativas precisas que corresponde a una señal igual a la del blanco, más diez veces la desviación estándar del blanco. ^[41]

$$Y = y_b + 10Sb \text{ Ec.IV.4}$$

Para determinar el LOQ se empleo la siguiente ecuación

$$LOQ = X = 10 Sb \text{ Ec.IV.5}$$

PARTE II

Los estudios sobre el efecto de los metales presentes en el cabello tienen el principal inconveniente de no poder distinguir entre los elementos incorporados por un mecanismo endógeno y/o un mecanismo exógeno. Esta distinción es muy importante ya que los metales incorporados mediante un mecanismo exógeno pueden influir apreciablemente en la interpretación de los resultados especialmente cuando se utiliza el cabello como bioindicador. Es por esto, que primero se plantea la **contaminación con sudor artificial** con una solución de concentraciones conocidas de los elementos en estudio, la finalidad del experimento es tener una idea de la afinidad de los elementos para adsorberse al cabello (mecanismo exógeno) y determinar la **cantidad de metal adsorbida por el cabello**. Luego, a esta muestra alterada o modificada se le aplicó diversos métodos de lavado encontrados en la bibliografía para obtener la eficiencia de remoción de los mismos.

IV II.1- Contaminación de la muestra con sudor artificial

Para contaminar la superficie del cabello con los metales de estudio, las muestras fueron impregnadas con 3 mL de sudor artificial y 1 mL de una disolución que contiene 40 mg/L de Al, Ca, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb, Si, Se y Zn. Se dejó reposar por un periodo de 24 h, para asegurar que se adsorbiera la mayor cantidad de los elementos que estaban presentes en la solución. Luego, se lavó con agua y se dejó secar en una estufa a una temperatura de 60°C. Finalmente, la muestra de cabello se digestó y se analizó empleando el ICP OES. Cada análisis se realizó por triplicado y los resultados se compararon con los obtenidos con la muestra de cabello sin contaminar.

IV II.1.1- Cantidad de metal adsorbida por el cabello.

Para establecer la cantidad de metal adsorbida en la superficie del cabello se midieron muestras contaminadas y no contaminadas con solución de sudor artificial de manera tal que al restar dichas concentraciones permite obtener la cantidad adsorbida por el cabello:

$$C.M.A = M.S.S - M.C.S \quad Ec.IV.6$$

C.M.A= Cantidad de metal adsorbida ($\mu\text{g/g}$)

M.S.S= Muestra sin sudor ($\mu\text{g/g}$)

M.C.S= Muestras con sudor ($\mu\text{g/g}$)

IV II.2- Lavados con soluciones de EDTA.

El estudio de los solventes para el lavado de metales en cabello se enfocó en primer lugar, en estudiar el efecto de la concentración de EDTA ya que es ampliamente utilizado en el análisis del cabello. No solo puede afectar el contenido metálico de origen exógeno sino también los de origen endógeno.

Para evaluar el efecto de la concentración de EDTA sobre la remoción de los metales en estudio, se realizaron lavados con soluciones de EDTA al 1%,3%,5% y 7%. Para ello, se agregó al cabello una alícuota de 14 mL de EDTA y se colocó en el ultrasonido por 12 períodos de 15 min a 25°C, se decantaron los residuos y se hicieron tres lavados sucesivos con agua desionizada, colocándolo 20 minutos en el ultrasonido, entre un lavado y otro; el agua se decantó y con una pipeta se retiró el agua remanente.

Para facilitar la interpretación de los resultados y apreciar mejor el efecto que tienen los solventes, se calcularon los siguientes factores:

- i. **Porcentaje elemental de origen endógeno.** Suministra información sobre la proporción de masa total que es de origen endógeno, se emplea la siguiente relación:

$$\% \text{ elemento endógeno} = \frac{\text{Concentración Muestra Tratada con agente de lavado } (\mu\text{g/g})}{\text{Concentración Muestra sin sudor (Blanco)} (\mu\text{g/g})} \times 100 \quad \text{Ec.IV.8}$$

- ii. **Eficiencia del lavado de cabello.** Este valor se obtiene mediante la relación de la cantidad de metal removido con respecto a la cantidad de metal adsorbido. Permite evaluar con facilidad que solvente removió mayor cantidad de metal en relación con lo adsorbido por el cabello:

$$Eficiencia = \frac{\text{Cantidad metal Removida } (\mu\text{g/g})}{\text{Cantidad metal Adsorbida } (\mu\text{g/g})} \quad \text{Ec.IV.9}$$

- iii. **Porcentaje elemental de origen exógeno removido por los agentes de lavado.** Se obtiene la proporción de masa total que es de origen exógeno y calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ elemento Removido} = 100 \left[1 - \frac{\text{Concentración Muestra Tratada con agente de lavado } (\mu\text{g/g})}{\text{Concentración Muestra con sudor } (\mu\text{g/g})} \right] \quad \text{Ec.IV.10}$$

IV II.3- Lavado con solventes orgánicos

Luego de estudiar el efecto del EDTA, el trabajo se enfocó en el efecto de solventes orgánicos comúnmente reportados en la bibliografía, con la idea de determinar cuál de ellos presenta mayor eficiencia en la remoción de los metales presentes en la superficie del cabello.

Los solventes orgánicos seleccionados para realizar los lavados fueron la acetona, éter, hexano, etanol y una combinación hexano-etanol estos se agregaron a la muestra en alícuotas de 14 ml seguidamente fueron sometidas a ultrasonido por 12 periodos de 15 min c/u a 25°C, luego se decantaron los residuos y se hicieron tres lavados sucesivos con agua des ionizada, colocando durante 20 minutos en el ultrasonido para cada lavado, el agua se retiró con una pipeta.

IV II.4- Lavado utilizando Solventes orgánicos / EDTA /Agua.

Finalmente, se realizó un estudio con el solvente orgánico que presentó mejor eficiencia en la remoción de elementos exógenos combinado con el EDTA. Para ello, se le agregó a la muestra una alícuota de 14 mL del agente de lavado solvente orgánico seguidamente se sometió a ultrasonido por 12 periodos de 15 min c/u a 25°C, luego se decantaron los residuos y se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente, pero con la concentración de EDTA que ofreció los mejores resultados.

PARTE III

IV III.1 Determinación de elementos trazas en muestras de cabello

Actualmente, no se cuenta con una base de datos amplia que indique los niveles de elementos trazas para los habitantes de la **Gran Caracas específicamente de la ciudad de los Teques**, en consecuencia se amplió una base de datos, iniciada en estudios previos realizados en el laboratorio, los resultados fueron comparados con valores promedio de concentraciones de diferentes regiones del mundo reportados en la literatura.^[39,40,41] Para el análisis se consideraron los siguientes factores:

- i.-* La composición elemental de cabello difiere en habitantes de distintas zonas geográficas. Lo cual es debido a la contaminación ambiental y a los hábitos alimenticios que son propios de cada región.^[28]
- ii.-* Los estudios han demostrado que el contenido elemental de cabello depende de la coloración del mismo, la edad y el género del donante.^[3]
- iii.-* Los elementos trazas contenidos en el cabello son un indicador de los estatus de nutrición.^[42]

Las muestras fueron recolectadas de acuerdo al criterio de muestreo descrito anteriormente, las mediciones se hicieron por duplicado.

La determinación de elementos trazas en las muestra recolectadas se hizo tomando como procedimiento final la toma de 0,2000g de cabello, se lavo con la combinación EDTA al 1%, acetona, agua, se digesto y se analizó en el ICP OES.

PARTE I

V I.1- Validación del método

En la **tabla V.1** se presentan las concentraciones ($\mu\text{g/g}$), de elementos traza obtenidas experimentalmente para el estándar certificado de cabello, las cuales, puede notarse, se encuentran dentro del intervalo reportado para todos los elementos, excepto el Fe, cuyo valor de concentración obtenido experimentalmente se encuentra por debajo de la cantidad reportada y no se pudo encontrar la posible fuente de error.

Tabla V.1 Determinación de metales en estándar de referencia NCS ZC 81002b.

Material de Referencia NCS ZC 81002b (Concentración $\pm$ SD) $\mu\text{g/g}$			
Elemento	Valor Certificado	Valor Obtenido	Intervalo de confianza 95% $\mu\text{g/g}$
Al	$23,2 \pm 2,0$	$22,3 \pm 2,2$	20.5 - 24.3
Ca	1537 ± 68	1588 ± 68	1527.3 -1648.0
Cr	$8,74 \pm 0,97$	$7,40 \pm 0,85$	6.7 -8.1
Cu	$33,6 \pm 2,3$	$31,1 \pm 2,5$	29.0 - 33.3
Fe	160 ± 16	$107,8 \pm 4,5$	103.8 -111.7
Mg	248 ± 14	$245,5 \pm 8,7$	238.1 -253.4
Mn	$3,83 \pm 0,69$	$5,37 \pm 0,33$	5.1 -5.7
Ni	5,77	$4,77 \pm 0,59$	4. 3-5.3
Pb	$3,83 \pm 0,18$	$4,34 \pm 0,78$	3.7 -5.0
Zn	191 ± 16	$194,6 \pm 6,3$	189.1 -200.2

V I.2- Límites de detección y cuantificación.

En la **tabla V.2** se presentan los resultados obtenidos para los límites de detección para el ICP OES y del método propuesto para el estudio de muestras de cabello donde se puede apreciar que el error más significativo es el producido por la metodología analítica propuesta.

Tabla V.2 Límites de detección y cuantificación de la técnica y del método propuesto para los elementos de estudio.

Elemento	Coeficiente de determinación	Técnica ICP OES		Método	
		LOD($\mu\text{g/g}$)	LOQ($\mu\text{g/g}$)	LOD($\mu\text{g/g}$)	LOQ($\mu\text{g/g}$)
	0,9957				
Al		1,496	4,48	6,484	231,42
	0,9998				
Ca		0,998	2,99	42,394	142,14
	0,9996				
Cr		2,494	8,47	12,469	417,45
	0,9999				
Cu		0,998	2,99	47,880	160,10
	0,9997				
Fe		1,995	6,48	97,756	327,18
	0,9998				
Mg		0,100	0,99	4,988	49,87
	0,9999				
Mn		0,499	1,99	30,923	103,24
	0,9999				
Ni		0,499	1,99	27,930	93,76
	0,9999				
Pb		0,998	2,99	42,394	142,64
	0,9999				
Se		0,998	3,49	53,865	180,54
	0,9996				
Si		2,494	8,47	130,673	435,91
	0,9999				
Zn		0,150	1,49	7,481	74,81

PARTE II

IV II.1- Cantidad de metal adsorbida por el cabello

En la **tabla V.3** se presentan las cantidades de metal adsorbido por el cabello luego de aplicar el procedimiento de contaminación con sudor artificial. Para la mayoría de los elementos estudiados se observó que bajo las condiciones de trabajo empleadas, son adsorbidos metales como: Fe(11,3 µg/g), Cu(7,63 µg/g), Cr(116 µg/g), Mn(2,1 µg/g), Ni(3,02 µg/g), Pb(17,7 µg/g) y Se(1200 µg/g) en el cabello. Otros elementos, como: Al, Ca, Mg, Si y Zn, en lugar de ser adsorbidos, fueron removidos por el agua. Este resultado indica, que estos elementos se encuentran presentes en el cabello antes de realizar cualquier tipo de tratamiento, por lo tanto, con solo hacer un lavado inicial con agua, se puede remover con gran facilidad parte del contenido metálico de origen exógeno. Además, pudo notarse la existencia de una elevada afinidad de Se y Cr por el cabello, lo cual puede ser un indicio de que estos elementos pueden presentar altas concentraciones como contenido exógeno en condiciones normales.

Tabla V.3 Cantidad de metal adsorbido por el cabello

Elemento	Cantidad Adsorbida (µg/g de cabello)
Al	-
Ca	-
Cr	116
Cu	7,63
Fe	11,3
Mg	-
Mn	2,1
Ni	3,02
Pb	17,7
Se	1200
Si	-
Zn	-

IV II.2- Estudio de los solventes para el lavado de cabello sobre la remoción de metales en cabello.

IV II.2.1- Lavado con soluciones de EDTA

En la mayoría de los estudios referidos al análisis de metales en cabello, como muestra biológica, se trabajó con EDTA al 1% o al 5% ^[10, 26, 36] sin criterios previamente establecidos al respecto, razón por la cual, se trabajó con diferentes concentraciones de EDTA, con la finalidad de determinar si la concentración del reactivo tiene un efecto significativo sobre el poder de remoción y verificar si existe la posibilidad de que al trabajar con concentraciones elevadas de EDTA, se produce una remoción importante de parte del contenido endógeno del cabello.

En la **tabla V.4** se pueden observar el contenido de los metales en la muestra luego de aplicar los lavados con diferentes soluciones de EDTA. Estos indican que al tratar la muestra de cabello con las diferentes soluciones, elementos como: Al (0,7-1,1 µg/g), Cu(20,9-21,4 µg/g), Fe(4,8-6,2 µg/g), Ni(0,5-0,7 µg/g), Se(2,0-2,8 µg/g) y Si(21,4-34,9 µg/g), no presentan cambios significativos en su concentración, sin embargo, elementos como: Ca(de 82 a 3,7 µg/g), Cr(de 2,9 a 0,9 µg/g), Mg(de 8,0 a 3,9 µg/g), Mn(de 0,5 a 0,1 µg/g), Pb(de 2,9 a 0,5 µg/g), y Zn(de 62,5 a 26,8 µg/g), disminuyen su concentración cuando se utiliza una concentración de EDTA al 7%. Existe la posibilidad de que estén siendo removidos incluyendo los elementos de origen endógeno. Esto nos lleva a la conclusión de que no es recomendable lavar las muestras con concentraciones elevadas de EDTA ($\geq 7\%$). También es importante destacar que, luego de aplicar los lavados, se observó la presencia de un precipitado compuesto de partículas muy finas de EDTA, el cual se elimina haciendo lavados con agua, ya que la presencia de este sólido afecta la reproducibilidad de los resultados.

En la **tabla V.4**, también puede notarse que Al(0,9 µg/g en EDTA, en 0,9 µg/g agua), Cu(21,0 µg/g en EDTA, 21,9 µg/g en agua), Se(2,3 µg/g en EDTA, 2,2 µg/g en agua), Si(34,9 µg/g en EDTA, 38,1 µg/g en agua) y Zn(77,2 µg/g en EDTA, 73,4 µg/g en agua), son removidos en cantidades similares al ser tratados con EDTA o solamente agua. Para el Ni la tendencia es contraria, ya que el contenido metálico es menor con el tratamiento con agua, y en consecuencia, no es necesario el empleo del EDTA para la remoción del mismo.

Tabla V.4 Determinación de elementos trazas en muestras de cabello empleando diferentes agentes de lavado.

Agente de Lavado		Concentración µg/g	Desviación Estándar(SD)	% Desviación estándar relativa
Aluminio	1,- EDTA 1%	0,7	0,2	21
	2,- EDTA 3%	0,8	0,3	32
	3,- EDTA 5%	1,1	0,1	12
	4,- EDTA 7%	0,9	0,3	34
	5,- Agua	0,9	0,3	33
	6,- Éter	1,3	0,3	17
	7,- Hexano	1,1	0,4	23
	8,- Hexano-Etanol	0,35	0,09	24
	9,- Etanol	1,0	0,3	31
	10,- Acetona	1,39	0,04	5

Elemento	Agente de Lavado	Concentración µg/g	Desviación Estándar(SD)	% Desviación estándar relativa
Calcio	1,- EDTA 1%	53	14	27
	2,- EDTA 3%	73	13	18
	3,- EDTA 5%	82	5	6
	4,- EDTA 7%	3,7	0,4	12
	5,- Agua	91	8	8
	6,- Éter	1462	43	3
	7,- Hexano	1561	82	5
	8,- Hexano-Etanol	1406	299	6
	9,- Etanol	1662	32	2
	10,- Acetona	1720	75	4

Tabla V.4 Determinación de elementos trazas en muestras de cabello empleando diferentes agentes de lavado, (continuación)

Elemento	Agente de Lavado	Concentración µg/g	Desviación Estándar(SD)	% Desviación estándar relativa
Cromo	1,- EDTA 1%	2,1	0,3	15
	2,- EDTA 3%	2,1	0,4	21
	3,- EDTA 5%	2,9	0,4	15
	4,- EDTA 7%	0,9	0,1	16
	5,- Agua	4,4	0,3	24
	6,- Éter	0,7	0,2	23
	7,- Hexano	0,26	0,09	38
	8,- Hexano-Etanol	0,5	0,2	40
	9,- Etanol	0,6	0,1	18
	10,- Acetona	0,51	0,05	9
Elemento	Agente de Lavado	Concentración µg/g	Desviación Estándar(SD)	% Desviación estándar relativa
Cobre	1,- EDTA 1%	20,9	0,9	4
	2,- EDTA 3%	21,4	1,1	5
	3,- EDTA 5%	21,0	0,6	3
	4,- EDTA 7%	20,8	1,0	5
	5,- Agua	21,9	2,5	9
	6,- Éter	27,4	3,1	11
	7,- Hexano	22,6	4,0	18
	8,- Hexano-Etanol	18,5	0,3	2
	9,- Etanol	20,9	0,2	1
	10,- Acetona	23,1	0,7	3

Tabla V.4 Determinación de elementos trazas en muestras de cabello empleando diferentes agentes de lavado (continuación)

Elemento	Agente de Lavado	Concentración µg/g	Desviación Estándar(SD)	% Desviación estándar relativa
Hierro	1,- EDTA 1%	4,8	0,6	13
	2,- EDTA 3%	5,0	0,6	12
	3,- EDTA 5%	6,2	0,1	2
	4,- EDTA 7%	5,6	0,4	7
	5,- Agua	9,8	1,5	15
	6,- Éter	8,4	0,1	2
	7,- Hexano	5,1	1,7	34
	8,- Hexano-Etanol	6,1	0,2	3
	9,- Etanol	6,3	0,2	3
	10,- Acetona	7,3	0,1	1
Elemento	Agente de Lavado	Concentración µg/g	Desviación Estándar(SD)	% Desviación estándar relativa
Magnesio	1,- EDTA 1%	8,5	1,7	67
	2,- EDTA 3%	9,2	3,4	76
	3,- EDTA 5%	8,0	3,3	65
	4,- EDTA 7%	3,9	1,6	43
	5,- Agua	9,0	0,7	30
	6,- Éter	178	12	3
	7,- Hexano	145	33	20
	8,- Hexano-Etanol	166	11	20
	9,- Etanol	193	3	4
	10,- Acetona	183	6	9

Tabla V.4 Determinación de elementos trazas en muestras de cabello empleando diferentes agentes de lavado (continuación)

Elemento	Agente de Lavado	Concentración µg/g	Desviación Estándar(SD)	% Desviación estándar relativa
Manganeso	1,- EDTA 1%	0,5	0,3	21
	2,- EDTA 3%	0,45	0,3	37
	3,- EDTA 5%	0,5	0,3	40
	4,- EDTA 7%	0,1	0,06	14
	5,- Agua	0,5	0,06	6
	6,- Éter	0,5	0,01	7
	7,- Hexano	0,5	0,1	11
	8,- Hexano-Etanol	0,3	0,07	7
	9,- Etanol	0,4	0,02	2
	10,- Acetona	0,4	0,05	3
Elemento	Agente de Lavado	Concentración µg/g	Desviación Estándar(SD)	% Desviación estándar relativa
Níquel	1,- EDTA 1%	0,6	0,3	48
	2,- EDTA 3%	0,5	0,2	42
	3,- EDTA 5%	0,51	0,06	12
	4,- EDTA 7%	0,7	0,2	24
	5,- Agua	0,4	0,06	14
	6,- Éter	1,5	0,2	12
	7,- Hexano	1,4	0,3	24
	8,- Hexano-Etanol	0,30	0,05	17
	9,- Etanol	1,2	0,2	15
	10,- Acetona	1,4	0,1	9

Tabla V.4 Determinación de elementos trazas en muestras de cabello empleando diferentes agentes de lavado (continuación)

Elemento	Agente de Lavado	Concentración µg/g	Desviación Estándar(SD)	% Desviación estándar relativa
Plomo	1,- EDTA 1%	2,6	0,5	20
	2,- EDTA 3%	2,9	0,7	23
	3,- EDTA 5%	2,9	0,4	14
	4,- EDTA 7%	0,5	0,2	39
	5,- Agua	3,2	0,4	11
	6,- Éter	10,5	2,5	24
	7,- Hexano	1,3	0,1	9
	8,- Hexano-Etanol	1,4	0,2	11
	9,- Etanol	10,5	1,3	15
	10,- Acetona	16,9	3,0	18
Elemento	Agente de Lavado	Concentración µg/g	Desviación Estándar(SD)	% Desviación estándar relativa
Selenio	1,- EDTA 1%	2,3	0,6	24
	2,- EDTA 3%	2,8	0,6	20
	3,- EDTA 5%	2,1	0,3	16
	4,- EDTA 7%	2,0	0,8	40
	5,- Agua	2,2	0,1	5
	6,- Éter	2,4	0,5	18
	7,- Hexano	1,9	0,5	28
	8,- Hexano-Etanol	1,5	0,5	36
	9,- Etanol	1,4	0,5	34
	10,- Acetona	1,5	0,3	19

Tabla V.4 Determinación de elementos trazas en muestras de cabello empleando diferentes agentes de lavado (continuación)

Elemento	Agente de Lavado	Concentración µg/g	Desviación Estándar(SD)	% Desviación estándar relativa
Silicio	1,- EDTA 1%	21,4	3,6	17
	2,- EDTA 3%	28,0	3,4	10
	3,- EDTA 5%	40,2	5,3	12
	4,- EDTA 7%	34,9	6,9	20
	5,- Agua	38,1	3,5	9
	6,- Éter	132,5	2,9	2
	7,- Hexano	41,3	3,7	9
	8,- Hexano-Etanol	54	16	29
	9,- Etanol	109,2	2,3	2
	10,- Acetona	40,7	0,5	10
Elemento	Agente de Lavado	Concentración µg/g	Desviación Estándar(SD)	% Desviación estándar relativa
Zinc	1,- EDTA 1%	79,9	8,8	13
	2,- EDTA 3%	77,2	12,4	16
	3,- EDTA 5%	62,5	3,3	5
	4,- EDTA 7%	26,8	2,8	10
	5,- Agua	73,4	11	12
	6,- Éter	1104	194	18
	7,- Hexano	605	106	9
	8,- Hexano-Etanol	606	58	5
	9,- Etanol	1047	50	5
	10,- Acetona	561	5,6	7

V 2.1.1- Porcentaje elemental de origen endógeno

Para cuantificar si la remoción fue total o si se removió mas de la cantidad adsorbida, se comparó la concentración de las muestras sin contaminar con solución de sudor artificial y la concentración de las muestras que fueron tratadas con los diferentes agentes de lavado mediante la relación: $\% \text{ elemento Removido} = 100 \left[1 - \frac{\text{Concentración Muestra Tratada con agente de lavado } (\mu\text{g/g})}{\text{Concentración Muestra con sudor } (\mu\text{g/g})} \right]$ Ec.IV.10. Con esta relación se obtuvo el porcentaje de muestra que es de origen endógeno tomando como referencia las muestras sin contaminar con sudor y sin ningún tipo de tratamiento de lavado.

Los valores mostrados en la **figura V.1** representan la cantidad de metal que queda expresada en porcentaje elemental de origen endógeno, luego de aplicar el procedimiento de lavado. Valores en porcentajes que son menores a 100 nos indican que se logró remover metales de origen exógeno presentes en el cabello adicional a la cantidad de metal adsorbida por las muestras, como es el caso de **Al, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, Pb, Se, Si y Zn** al ser tratados con EDTA, además esto resultados coinciden con el estudio anterior donde se observó que (**Al, Ca, Mg, Si y Zn**) ya forman parte del contenido exógeno antes de aplicar algún tipo de tratamientos de lavado. Para valores entre 5-20% indican que la mayoría del metal contenido en la muestra es de origen exógeno, lo que podría ser producto de una muy alta remoción ó puede estar atacando los metales de origen endógeno como es el caso del **Al, Ca, Mg y Zn**. Estos resultados permiten estimar la cantidad total de contenido endógeno luego de aplicar el procedimiento de lavado, Si se observa una diferencia significativa en el porcentaje de muestra removido por los agentes de lavado permite afirmar si en realidad el contenido exógeno de metales afecta la determinación de metales en cabello.

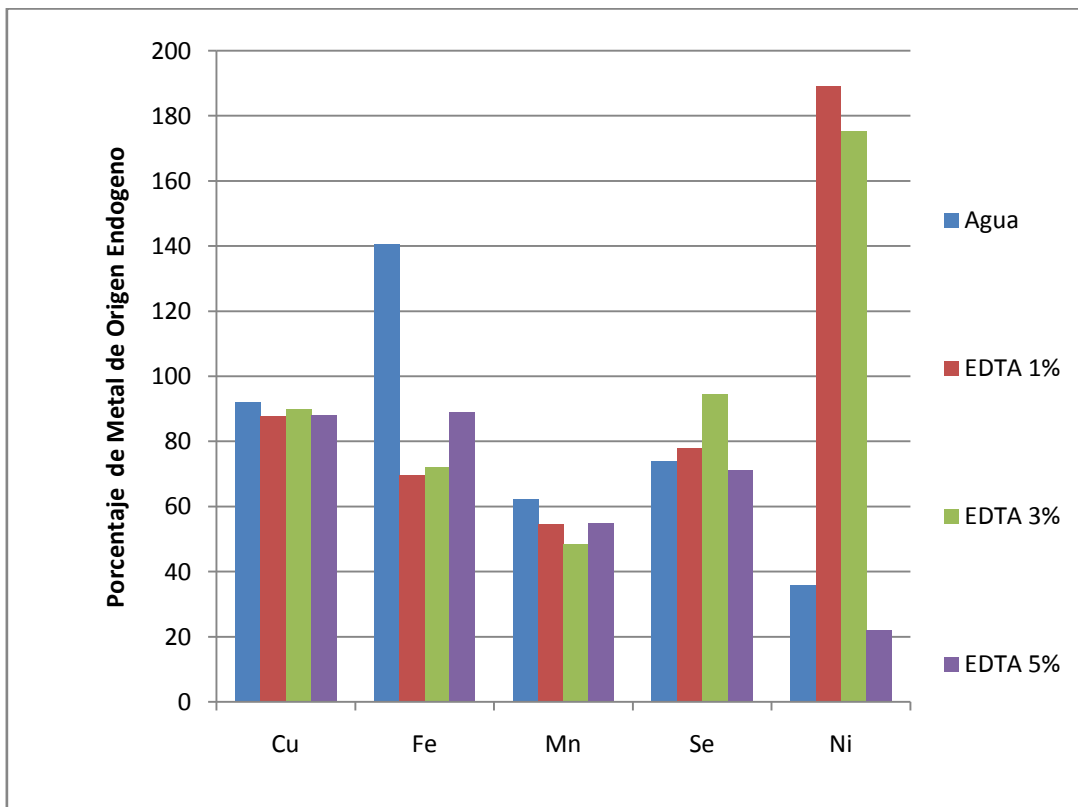
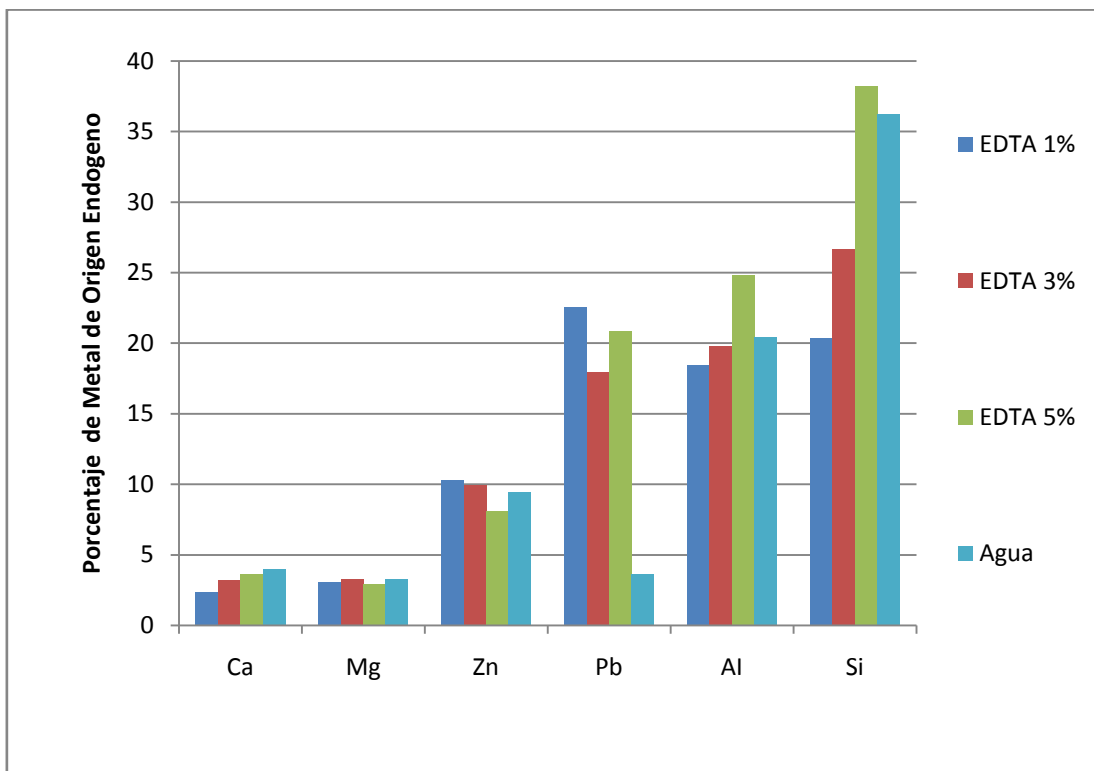


Figura V.1 Porcentaje de metal en cabello que es de origen endógeno.

Al trabajar con EDTA se debe tomar en cuenta que concentraciones mayores al 5% se puede estar atacando el contenido endógeno de **Ca, Cr, Mg, Mn, Pb y Zn**, además los resultados indican que es indiferente lavar con agua o EDTA para **Al, Cu, Fe, Se y Si**. Todo esto nos sugiere que se puede trabajar con EDTA entre 1-5% es adecuado para remover los metales estudiados.

V II.2.2- Lavado con solventes orgánicos

De los solventes orgánicos estudiados (acetona, etanol, hexano), el que presentó mayor poder de remoción fue la combinación hexano-etanol los demás solventes presentaron resultados similares.

Los resultados presentados en la **tabla V.4** muestran que, metales como el **Cr** y **Se**, son removidos de manera más eficiente por los solventes orgánicos empleados que por el EDTA o el agua.

En la **tabla V.4** también se puede notar que el lavado de cabello con solamente solventes orgánicos, no es adecuado para remover metales como Al, Ca, Mg, Si y Zn. En otros casos, elementos como: Ca, Mg, Pb, Si, Zn son eficientemente removidos por el EDTA con respecto a los solventes orgánicos por lo que los solventes orgánicos no presentan un buen grado de remoción para estos metales.

El uso de solventes orgánicos como hexano y etanol, presentaron también la aparición del precipitado blanco mencionado anteriormente, por lo que se aplicó un lavado adicional con agua.

V II.2.2.1- Eficiencia del lavado de cabello

Una vez conocida la cantidad de metal adsorbido por el cabello y la cantidad removida por los agentes de lavado, tales cantidades fueron comparadas mediante la $Eficiencia = \frac{\text{Cantidad metal Removida } (\mu\text{g/g})}{\text{Cantidad metal Adsorbida } (\mu\text{g/g})}$ (ecuación Ec.IV.9), que es útil para identificar que solvente removió una mayor cantidad de metal de lo que fue adsorbido por el cabello contaminado con sudor artificial.

En la **figura V4.1** donde se representa la eficiencia de los lavados para cada metal, la relación resultará en valores mayores a uno para **Cu, Pb y Mn** en la mayoría de los solventes orgánicos, lo que implica que se remueve más de lo que se adsorbe, lo que es un indicativo que estos metales ya estaban en el cabello como contenido exógeno producto de la exposición diaria, además estos resultados coinciden con el estudio anterior sobre el contenido elemental de origen endógeno. Si el valor es cercano o igual a uno, nos indica que todo lo que se adsorbió es removido como es el caso del **Cr y Se** tratados con solventes orgánicos. En los casos donde se obtuvo valores menores a uno (**Pb** con acetona, Ni éter, hexano, etanol, acetona, **Cu** con éter y **Fe** con agua y éter) nos indican que se remueve menos de lo que se adsorbe por lo que estos solventes no son adecuados para remover estos metales.

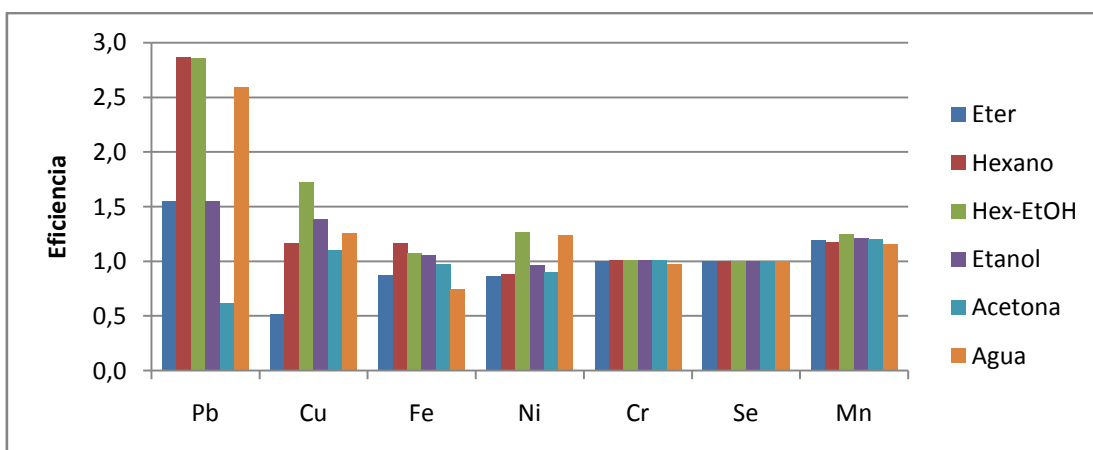


Figura V.4.1 Relaciones entre cantidades adsorbidas con la cantidad removida con solventes orgánicos.

Los resultados obtenidos para el estudio de los solventes orgánicos utilizados demuestran que para algunos el **Cr y Se**, se consigue una mayor remoción al ser tratados con solventes orgánicos. Además se encontró que utilizar solo solventes orgánicos no es adecuados para remover metales como **Ca, Mg, Si y Zn**, y presenta una baja remoción para metales como **Pb** con acetona, **Cu** con éter, **Fe** con éter y agua, **Ni** con éter, hexano, etanol y acetona, por lo que estos solventes no son apropiados para efectuar los procedimientos de lavado para remover los metales anteriormente mencionados. De los solventes orgánicos estudiados, la combinación hexano-etanol es la presente mayor poder de remoción en comparación a los otros solventes utilizados; obteniéndose además resultados similares en los lavados para los diferentes solventes.

V II.2.3- Lavado utilizando EDTA /Solventes orgánicos/Agua

En la **tabla V.5** se presentan los resultados obtenidos para los lavados donde se utilizaron inicialmente solventes orgánicos; y posteriormente EDTA al 1%. Los resultados demuestran que al realizar estos dos lavados, se consiguen mayor remoción combinando los solventes que al usarlos individualmente ya que por separado el agua remueve el Al, Mg y Zn con facilidad, el EDTA remueve mejor metales como el Ca, Pb, Si, y los solventes orgánicos remueven mejor metales como Cr, Se, Ni, y, Mn además se piensa que ayuda en la remoción de grasa adheridas al cabello.

Tabla V.5 Determinación de elementos trazas en muestras de cabello empleando solventes orgánicos y EDTA.

Elemento	Concentración $\pm$ SD ($\mu\text{g/g}$)		
	Acetona- EDTA	Éter-EDTA	Hexano-etanol-EDTA
Al	0,9 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,3
Ca	52,0 $\pm$ 2,3	48 $\pm$ 2,1	42,3 $\pm$ 2,6
Cr	0,5 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,3
Cu	19,8 $\pm$ 0,8	20 $\pm$ 1	16,2 $\pm$ 0,9
Fe	3,1 $\pm$ 0,3	4,1 $\pm$ 0,4	2,1 $\pm$ 0,6
Mg	6,9 $\pm$ 0,4	8,9 $\pm$ 0,4	7,0 $\pm$ 0,5
Mn	0,32 $\pm$ 0,09	0,54 $\pm$ 0,07	0,44 $\pm$ 0,06
Ni	0,71 $\pm$ 0,08	0,79 $\pm$ 0,09	0,5 $\pm$ 0,1
Pb	1,9 $\pm$ 0,9	1,7 $\pm$ 0,8	1,4 $\pm$ 0,9
Se	1,9 $\pm$ 0,9	1,4 $\pm$ 0,8	1,6 $\pm$ 0,7
Si	11 $\pm$ 2,2	16,9 $\pm$ 2,6	13,2 $\pm$ 2,0
Zn	78,1 $\pm$ 1,6	64,5 $\pm$ 2,8	61 $\pm$ 3

SD= Desviación estándar

IV II.2.3- Porcentaje elemental de origen exógeno removido por los agentes de lavado

Con la relación, que se muestra en Ec.IV.10 se obtuvo la cantidad de metal que se removió respecto al total de la masa de la muestra una vez de ocurrida la adsorción, lo que permite obtener la cantidad de masa total de origen exógeno.

Si el porcentaje de remoción es muy bajo, la cantidad removida es escasa, lo que implicaría que los agentes de lavado remueven apenas una cantidad apreciable de metal, esto puede observarse para el **Cu** (36%) con todos los solventes estudiados.

Para la combinación EDTA /Solventes orgánicos/Agua porcentajes de remoción entre 70-90% podemos decir que se removió la mayoría de la cantidad adsorbida como es el caso de **Al, Fe, Mn, Ni, Si y Zn**. Si se obtienen porcentajes de remoción cercanos a 100% indica que se removió todo lo que se adsorbió como lo vemos en el caso del **Ca, Cr, Mg, Pb y Se**.

En la **tabla V.6** se puede observar que se logró remover una cantidad de metal similar con las diferentes combinaciones utilizadas (EDTA /Solventes orgánicos/Agua) y a su vez se obtuvo un mayor poder de remoción que con los solventes orgánicos utilizados. Es por ello que se puede utilizar una u otra combinación de las propuestas, usar cualquiera de ellas resulta adecuado, a pesar de ello no se utilizó la combinación con la que se obtuvo mayor poder de remoción (EDTA-hexano-etanol-agua) debido a que requiere mas tiempo para su tratamiento y el error asociado a esta determinación es mayor que en los otros casos, es por ello que se decidió utilizar la combinación de acetona y EDTA al 1%.

Tabla V.6 Porcentaje de metal removido por los agentes de lavado

Elemento	EDTA-Acetona	EDTA-éter	EDTA-Hexano-etanol	EDTA 1%	Acetona
Al	67,6	82,0	78,0	71,5	49,9
Ca	95,5	95,8	96,3	95,4	-
Cr	99,6	99,6	99,6	98,2	99,6
Cu	36,8	36,2	48,3	33,2	26,3
Fe	83,1	77,6	87,5	73,5	60,3
Mg	92,2	89,9	92,1	90,3	-
Mn	89,2	81,8	85,1	83,9	85,0
Ni	82,6	80,7	87,8	48,7	65,9
Pb	91,1	92,0	93,4	87,9	20,3
Se	99,8	99,9	99,9	99,8	99,9
Si	83,7	74,8	80,8	68,4	39,7
Zn	67,4	73,3	74,5	66,6	-
PROM	82,4	82,0	85,7	76,5	60,8

V III.1- Determinación de elementos trazas en cabello

Es necesario contar con una base de datos lo mas amplia posible, esto se debe a que la variaciones en las concentraciones viene dada por diferentes factores que pueden influir de una manera significativa en los resultados obtenidos y en la interpretación de los mismos cuando se quiera comparar con otra población de estudio tanto para monitoreo como para correlación con patologías relacionadas.

En la determinación de elementos traza en cabello se deben considerar diferentes factores que pueden influir de manera apreciable por lo que debe considerarse edad, color, sexo, debido a que antes de proporcionar una base de datos confiable pueda tomarse en cuenta todos estos aspectos.

En la **tabla V.7** se encuentran los resultados obtenidos en las muestras de la ciudad de Caracas. La misma indica las concentraciones de los elementos en estudio, edad del donante y color del cabello las cuales se van a unir a otro grupo de muestras para ampliar la base de datos disponible. Las muestras recolectadas abarcan desde niños de 2 años en adelante hasta hombres de 57 años. Como se puede apreciar se escogieron en su mayoría personas con cabellos de color oscuro.

En la **tabla V.8** se encuentran las muestras agrupadas según el color del cabello donde se puede apreciar que para **Al** se obtuvo para el castaño claro valores de concentración muy superiores al cabello color negro esta diferencia no ha sido reportada en otros trabajos las diferencias que atribuyen al color son debidas a los cambios de concentración de metales como **Zn, Cu, Ni y Mn** como fue reportado por Stutaro.^[38]

En la **tabla V.9** se presentan estadísticos tales como: promedio, mediana, desviación estándar y rango intercuartílico, para hacer la comparación de acuerdo a la edad se agruparon se dividieron en cuatro grupos (Grupo A de 2 a 20 años, Grupo B de 22 a 29 años, Grupo C de 30 a 39 años, Grupo D de 40 a 57 años). Donde se

puede observar que la concentración para elementos como el Ca, Zn, Cu disminuye con la edad, también se logró observar una tendencia creciente de la concentración, hasta los 39 años y luego disminuye hasta los 57 como es el caso del Fe, Mg, Al otros metales como el Cr, Mn y Ni presentan la misma tendencia pero su concentración comienza a disminuir luego de los 29 años.

En la **tabla V.10** se encuentran reportados los valores promedio obtenidos para individuos residentes en la ciudad de los Teques, los valores obtenidos están dentro del intervalo de concentraciones reportado ^[21, 8] por Miekeley, en esta tabla también se encuentran los valores reportados por otros estudios para diferentes ciudades del mundo tales como en los trabajos en otros trabajos como: Silesian Beskid Slaski (Polonia) ^[39] , Lulea (Suecia) ^[40] , Rio de Janeiro (Brasil) ^[8] y los resultados obtenidos por Betsy Pérez ^[33] en caracas en un trabajo previo.

Tabla V.7 Concentración de metales en muestras de cabello lavadas con acetona-EDTA para 0,2000g de muestra.

Muestra	Sexo(Edad)	Color de cabello	Concentración en µg/g		
			Al	Ca	Cr
1	M(02)	Negro	4,06	229,69	1,76
2	M(03)	Negro	6,55	352,4	1
3	M(04)	Castaño oscuro	7	191	1,6
4	M(15)	Negro	3,4	414,05	0,6
5	M(17)	Negro	2,7	408,88	0,77
6	M(22)	Castaño claro	14,23	290,83	0,81
7	M(25)	Castaño oscuro	14,04	341,83	1,62
8	M(25)	Negro	0,67	255,98	1,59
9	M(27)	Negro	1,95	347,43	0,63
10	M(28)	Castaño oscuro	14,17	359,2	1,75
11	M(28)	Negro	1,51	236,22	2,65
12	M(29)	Negro	2,35	226,07	0,9
13	M(30)	Negro	0,47	184,14	0,66
14	M(30)	Negro	1,27	467,49	1,05
15	M(33)	Castaño oscuro	13,77	172,34	1,29
16	M(33)	Negro	1,41	496,28	1
17	M(39)	Negro	18,36	95,01	2,31
18	M(40)	Negro	-	66,51	9,16
19	M(41)	Negro con canas	-	200,44	1,15
20	M(42)	Castaño oscuro	1,91	425,34	0,69
21	M(43)	Castaño claro	2,27	168,06	0,88
22	M(49)	Negro	6,54	200,95	1,03
23	M(54)	Negro con canas	12,04	218,13	1,04
24	M(57)	Castaño oscuro	2,24	231,14	1,1

Tabla V.7 Concentración de metales en muestras de cabello lavadas con acetona-EDTA para 0,2000g de muestra (continuación).

Muestra	Sexo(Edad)	Color de cabello	Concentración en µg/g		
			Cu	Fe	Mg
1	M(02)	Negro	7,18	5,49	12,1
2	M(03)	Negro	9,67	7,68	18,2
3	M(04)	Castaño oscuro	8,1	6	23
4	M(15)	Negro	9,33	6,5	17,3
5	M(17)	Negro	8,5	4,66	26,7
6	M(22)	Castaño claro	6,4	3,76	23,1
7	M(25)	Castaño oscuro	6,48	7,07	24,2
8	M(25)	Negro	5,66	3,97	21,2
9	M(27)	Negro	8,73	4,14	43,6
10	M(28)	Castaño oscuro	9,22	12,96	21,5
11	M(28)	Negro	7,65	8,78	14,4
12	M(29)	Negro	7,32	3,43	13,9
13	M(30)	Negro	7,14	4,09	17,2
14	M(30)	Negro	6,91	3,96	28,2
15	M(33)	Castaño oscuro	7,72	3,24	16,1
16	M(33)	Negro	7,06	19,6	47,8
17	M(39)	Negro	5,36	4,6	17,9
18	M(40)	Negro	5,88	1,68	11,4
19	M(41)	Negro con canas	6,06	4,65	17,4
20	M(42)	Castaño oscuro	8,92	4,29	18,1
21	M(43)	Castaño claro	9,11	7,3	10,5
22	M(49)	Negro	5,26	4,32	11,1
23	M(54)	Negro con canas	4,94	4,11	9,2
24	M(57)	Castaño oscuro	7,1	4,13	17,6

Tabla V.7 Concentración de metales en muestras de cabello lavadas con acetona-EDTA para 0,2000g de muestra (continuación).

Muestra	Sexo(Edad)	Color de cabello	Concentración en µg/g		
			Mn	Ni	Pb
1	M(02)	Negro	0,84	0,56	7,65
2	M(03)	Negro	1,37	1	16,2
3	M(04)	Castaño oscuro	0,45	0,86	5,89
4	M(15)	Negro	0,36	0,25	0,25
5	M(17)	Negro	0,53	0,23	1,63
6	M(22)	Castaño claro	0,28	1,54	-
7	M(25)	Castaño oscuro	0,51	0,68	2,49
8	M(25)	Negro	0,15	0,47	-
9	M(27)	Negro	1,49	0,32	0,36
10	M(28)	Castaño oscuro	1,53	0,51	1,88
11	M(28)	Negro	0,94	1,33	1,98
12	M(29)	Negro	0,3	0,68	-
13	M(30)	Negro	0,13	0,27	-
14	M(30)	Negro	0,61	0,44	-
15	M(33)	Castaño oscuro	0,12	0,49	-
16	M(33)	Negro	2,27	0,8	1,34
17	M(39)	Negro	0,33	0,75	0,53
18	M(40)	Negro	0,24	0,54	0,74
19	M(41)	Negro con canas	0,14	0,4	-
20	M(42)	Castaño oscuro	0,69	0,34	0,15
21	M(43)	Castaño claro	0,41	0,52	0,01
22	M(49)	Negro	0,34	0,38	-
23	M(54)	Negro con canas	0,18	0,47	-
24	M(57)	Castaño oscuro	0,31	0,52	-

Tabla V.7 Concentración de metales en muestras de cabello lavadas con acetona-EDTA para 0,2000g de muestra (continuación).

Muestra	Sexo(Edad)	Color de cabello	Concentración en µg/g		
			Se	Si	Zn
1	M(02)	Negro	-	-	104,2
2	M(03)	Negro	-	9,97	156,9
3	M(04)	Castaño oscuro	-	4	106,4
4	M(15)	Negro	-	4,55	177
5	M(17)	Negro	-	9,6	154,8
6	M(22)	Castaño claro	-	-	161,8
7	M(25)	Castaño oscuro	-	-	94,6
8	M(25)	Negro	-	-	113,6
9	M(27)	Negro	-	-	157
10	M(28)	Castaño oscuro	-	-	156,6
11	M(28)	Negro	-	5,82	100,1
12	M(29)	Negro	-	-	155,6
13	M(30)	Negro	-	-	96,2
14	M(30)	Negro	-	-	160,6
15	M(33)	Castaño oscuro	-	-	104,4
16	M(33)	Negro	-	81,68	106,7
17	M(39)	Negro	-	-	59,8
18	M(40)	Negro	-	-	82,6
19	M(41)	Negro con canas	-	-	93
20	M(42)	Castaño oscuro	-	-	139,3
21	M(43)	Castaño claro	-	20,92	77,1
22	M(49)	Negro	-	-	89,4
23	M(54)	Negro con canas	-	-	53,1
24	M(57)	Castaño oscuro	-	-	102,2

Tabla V.8 recopilación de estadísticas. (Cabello castaño)

	Ca	Zn	Mg	Al	Cu	Fe	Cr	Mn	Ni
PROMEDIO	250,63	114,73	19,43	9,67	7,73	6,35	1,29	0,52	0,73
MEDIANA	231,14	104,40	21,50	13,77	7,72	6,00	1,29	0,41	0,52
DESVACION ESTANDAR	80,21	31,95	4,96	5,69	1,15	3,33	0,38	0,47	0,38
RANGO INTERCUARTILICO	95,57	42,35	6,85	5,98	1,41	4,86	0,47	0,71	0,53

Tabla V.8 recopilación de estadísticas. (Cabello Negro)

	Ca	Zn	Mg	Al	Cu	Fe	Cr	Mn	Ni
PROMEDIO	274,9	116,29	20,48	3,46	7,04	5,73	1,71	0,64	0,56
MEDIANA	232,9	105,45	17,35	2,35	7,10	4,46	1,04	0,35	0,47
DESVACION ESTANDAR	126,2	38,71	11,17	3,25	1,47	4,06	2,07	0,61	0,30
RANGO INTERCUARTILICO	214,9	53,75	19,30	5,79	2,37	8,96	4,28	1,07	0,55

Tabla V.9 recopilación de estadísticas (General)

	Ca	Zn	Cu	Fe	Mg	Al	Cr	Mn	Ni	Pb	Si
PROMEDIO	274,1	116,8	7,3	5,9	20,1	6,0	1,5	0,6	0,6	2,9	19,5
MEDIANA	233,6	105,4	7,1	4,4	17,75	3,05	1,0	0,4	0,5	1,5	9,6
DESVACION ESTANDAR	115,0	35,6	1,4	3,7	9,4	5,6	1,7	0,5	0,3	4,4	28,0
RANGO INTERCUARTILICO	214,8	61,9	2,3	8,9	19,3	8,9	3,7	1,1	0,7	8,1	38,8

Tabla V.9 recopilación de estadísticas. (Grupo de 2 a 20 años)

	Ca	Zn	Cu	Fe	Mg	Al	Cr	Mn	Ni	Pb	Si
PROMEDIO	319,2	139,8	8,6	6,1	19,5	4,7	1,1	0,7	0,6	6,3	7,0
MEDIANA	352,4	154,8	8,5	6,0	18,2	4,1	1,0	0,5	0,6	5,9	7,1
DESVACION ESTANDAR	103,2	32,7	1,0	1,1	5,6	1,9	0,5	0,4	0,3	6,3	3,2
RANGO INTERCUARTILICO	319,2	139,7	8,6	6,1	19,5	4,7	1,1	0,7	0,6	6,3	7,0

Tabla V.9 recopilación de estadísticas. (Grupo de 22 a 29 años)

	Ca	Zn	Cu	Fe	Mg	Al	Cr	Mn	Ni	Pb	Si
PROMEDIO	293,9	134,2	7,3	6,3	23,1	6,9	1,4	0,7	0,8	1,7	5,8
MEDIANA	290,8	155,6	7,3	4,1	21,5	2,4	1,6	0,5	0,7	1,9	5,8
DESVACION ESTANDAR	56,0	30,0	1,3	3,6	9,9	6,7	0,7	0,6	0,5	0,9	-
RANGO INTERCUARTILICO	66,5	33,6	1,8	4,8	14,9	6,3	1,0	0,7	0,61	1,07	0

Tabla V.9 recopilación de estadísticas. (Grupo de 30 a 39 años)

	Ca	Zn	Cu	Fe	Mg	Al	Cr	Mn	Ni	Pb	Si
PROMEDIO	283,1	105,5	6,8	7,1	25,4	7,1	1,3	0,7	0,6	0,9	81,7
MEDIANA	184,1	104,4	7,1	4,1	17,9	1,4	1,1	0,3	0,5	0,9	81,7
DESVACION ESTANDAR	185,0	36,1	0,9	7,0	13,4	8,4	0,6	0,9	0,2	0,6	-
RANGO INTERCUARTILICO	200,6	50,4	1,2	8,2	15,9	8,9	0,8	1,1	0,3	0,4	0

Tabla V.9 recopilación de estadísticas. (Grupo de 40 a 57 años)

	Ca	Zn	Cu	Fe	Mg	Al	Cr	Mn	Ni	Pb	Si
PROMEDIO	248,7	92,2	7,1	4,8	13,3	5	0,9	0,4	0,4	0,08	20,9
MEDIANA	218,1	89,4	7,1	4,3	11,1	2,3	1,0	0,3	0,5	0,1	20,9
DESVACION ESTANDAR	101,5	31,9	2,0	1,4	4,2	4,4	0,2	0,2	0,1	0,1	
RANGO INTERCUARTILICO	179,4	43,1	2,1	2,8	4,5	5,1	4,2	0,3	0,1	0,3	0

Tabla V.10 cuadro comparativo de concentraciones de cabello para diferentes regiones.

Elemento	Valores de Referencia [21,8]	Caracas Venezuela		Silesian beskid slaski [39]	Luela ^[40]	Rio de janeiro ^[8]
		2007 ^[33] 2008	obtenido	Polonia	Suecia	Brasil
Al	<12	5,1± 2,0	6,0 ± 5,6	-	8,2 ± 4,2	8,3 ± 0,9
Ca	350-860	445 ± 298	274,1 ± 115,0	826 ± 880	750 ± 660	802 ± 37
Cr	0,78-1,0	1,0 ± 0,6	1,5 ± 1,7	0,60 ± 1,13	0,167 ± 0,118	<0,3
Cu	13-35	15,63 ± 12,50	7,3 ± 1,4	7,96 ± 9,12	25 ± 21	44,1 ± 3,5
Fe	6,0-15	5,86 ± 3,09	5,9 ± 3,7	45,7 ± 37,7	9,6 ± 4,4	20,8 ± 2,2
Mg	40-110	34 ± 32	20.1 ± 9,4	-	46 ± 38	43,9 ± 1,0
Mn	0,26-0,75	0,33 ± 0,2	0,6 ± 0,5	2,41± 2,24	0,560 ± 0,550	5,0 ± 0,5
Ni	<1,6	0,30 ± 0,3	0,6 ± 0,3	0,75 ± 1,15	0,430 ± 0,400	0,7 ± 0,1
Pb	<6,0	1,67 ± 2,08	2,9 ± 4,4	4,99 ± 3,90	0,960 ± 0,860	12,5 ± 0,6
Se	0,38-0,7	3,45 ± 1,9	-	-	0,830 ± 0,280	1,29 ± 5,90
Si	-	74 ± 43	-	-	33 ± 31	-
Zn	125-165		116,8 ± 35,6	129,0 ± 60,2	142 ± 29	156 ± 6

SD = desviación Estándar

Conclusiones

En este estudio se logró distinguir entre contenido exógeno y endógeno, de elementos como **Al, Ca, Cu, Fe, Mn, Mg, Ni, Pb, Si y Zn**. Asimismo, se demostró que **Fe, Cu, Cr, Mn, Ni, Pb y Se** tienen una alta afinidad para adsorberse en el cabello.

Los estudios realizados sugieren que al lavar el cabello con EDTA a concentraciones mayores al 5% se puede extraer el contenido endógeno de elementos como **Ca, Cr, Mg, Mn, Pb y Zn**. Se pueden utilizar soluciones de EDTA entre 1-5% sin correr el riesgo de afectar el contenido endógeno de los elementos.

Los resultados obtenidos también demuestran que los solventes orgánicos estudiados tienen una capacidad de remoción similar del contenido de elementos exógenos en cabello.

El mejor procedimiento de lavado para remoción de elementos trazas de origen exógeno en cabello, es la combinación solvente orgánico, EDTA y agua, así mismo siempre que se utilice **EDTA, hexano o etanol** se debe hacer un lavado final con agua porque afecta la reproducibilidad en la determinación.

Se encontró que la concentración de Ca, Zn, Cu disminuye con la edad. También se logró observar que para el Fe, Mg y Al existe una tendencia creciente de la concentración hasta los 39 años y luego disminuye. Otros elementos como el Cr, Mn y Ni presentan la misma tendencia, pero su concentración comienza a disminuir luego de los 29 años. Adicionalmente se encontró que el **Al** está presente en mayor concentración para cabello color castaño oscuro y esto no ha sido reportado en estudios anteriores.

Referencias bibliográficas

- [1] T. Suzuki, Hair and nails: advantages and pitfalls when used in biological monitoring, in: T.W. Clarkson, L. Friberg, G.F. Nordberg, P.R. Sager (Eds.), *Biological Monitoring of Toxic Metals*, Plenum Press, p. 623.1988.
- [2] A. Chatt, S.A. Katz, *Hair Analysis*, VCH, New York, 1988-V.A. Batzevich, *Sci. Total Environ.* 164 (1995) 89
- [3] Ródenas de la Rocha, S., Sevillano, I., Sánchez, F. y otros. Interés biomédico de la determinación de elementos traza en el cabello. *Schironia. Revista Científica del Colegio Farmacéutico de Madrid*. Vol. 2. pp 36-41. 2003.
- [4] Kazi, T., Afridi H., Kazi G, Jamali M., Arain M. y Jalbani N. Evaluation of essential and toxic metals by ultrasound-assisted acid leaching from scalp hair samples of children with macular degeneration patients. *Clinica Chimica Acta*. Vol. 369. pp 52 – 60. 2006.
- [5] Raghupathy et al., Methods of removing external metal contamination from hair samples for environmental monitoring, *Sci. Total Environ.* **77**, pp. 141–151. 1988.
- [6] Morton et al., Removal of exogenously bound elements from human hair by various washing procedures and determination by inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* **455**, pp. 23–34. 2002.
- [7] Ashraf and M. Jaffar, Concentrations of selected metals in scalp hair of an occupationally exposed population segment of Pakistan, *Int. J. Environ. Stud.* **51**, p. 313. 1997.
- [8] Miekeley, M.T. Dias Carneiro and C.L. Porto da Silveira, How reliable are human hair reference intervals for trace elements, *Sci. Total Environ.* **218**, p. 9. 1998.
- [9] Application of double focusing sector field ICP-MS for multielemental characterization of human hair and nails. Part II. A study of the inhabitants of northern Sweden *The Science of The Total Environment*, Volume 262, Issues 12, 30 October 2000, Pages 21-36 Ilia Rodushkin and Mikael D. Axelsson
- [10] V.A. Batzevich *Sci. Total Environ.* 164, p. 89. 1995.

-
- [11] Vivoli, G. Fantuzzi, G. Bergomi, M. Enrico Tonelli, Gatto, M. Relationship between zinc in serum and hair and some hormones during sexual maturation in humans. *The Science of The Total Environment*, Volume 95, Pages 29-40. 1990.
- [12] Fernandes, G., Nogueira, A., Gomes, J., Nóbrega, J. Determination of vanadium in human hair slurries by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Talanta*. 2006.
- [13] Sturaro, G. Parvoli, L. Doretto, G. Allegri and C. Costa, The influence of color, age, and sex on the content of zinc, copper, nickel, manganese and lead in human hair, *Biol Trace Elem Res* **40**, pp. 1–7.1994.
- [14] Villaroel, J. Elementos Biogénicos (Zn, Cu, Fe y Mg) en pelo, uñas y suero sanguíneo en la mujer gestante, en pelo y uñas de recién nacidos. Trabajo de grado para optar al título de Doctor en Química Analítica. Facultad de Ciencias. Universidad de los Andes. Mérida. 2004.
- [15] Mahan, L., Scout-Stump, S. *Nutrición y Dietoterapia de Krause*. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana. México. Capítulo 5. pp. 119-161. 1996.
- [16] <http://es.wikipedia.org/wiki/Cabello> [Última consulta: 01-12-07]
- [17] Sreenivasa, K., Balaji, T., Naidu, G. y otros. Determination of iron, cobalt, nickel, manganese, zinc, copper, cadmium and lead in human hair by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Spectrochimica Acta. Parte B. Vol 57*. pp 1333-1338. 2002.
- [18] Perkins de Piacentino, A., Locani, O., Lorenzo, J. Drogas en pelo: sus alcances y limitaciones. *Revista AMA. Asociación Médica Argentina. Versión electrónica*. En línea: http://www.ama-med.org.ar/peritos_articulos1.asp?id=99 [Última consulta: 20-10-06].
- [19] Lehninger, A. *Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función molecular*. Segunda edición. Ediciones Omega S.A. Barcelona. pp. 88 -89. 1982.
- [20] Chojnacka, K., Górecka H., Chojnacki, A. y Górecki H. Inter-element interactions in human hair. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. Vol. 20. pp 368–374. 2005.

-
- [21] Chojnacka, K., Górecka, H. y Górecki, H. The influence of living habits and family relationships on element concentrations in human hair. *Science of the Total Environment*. Vol. 366. pp 612–620. 2006.
- [22] V. Valkovic and N. Limic. Hair analysis: How useful it is and can it be done properly *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, Volume 22, Issues 1-3, Pages 159-162. 1987.
- [23] Morton, J., Carolan, VA., Gardiner, PHE. Removal of exogenously bound elements from human hair by various washing procedures and determination by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 455. pp 23–34. 2002.
- [24] Zeiner, M., Zenz, P., Steffan, I y otros. Influence on elemental status by hip-endoprostheses. *Microchemical Journal*. Vol. 85. pp 145–148. 2007.
- [25] Ródenas de la Rocha , I. Sevillano Navarro y otros. Interés biomédico de la determinación de elementos traza en el cabello. *Schironia*. Vol 2, (1993) pp-36.
- [26] Currenti, H. y Navarro, R. Procedimiento de colección y preservación de muestras de pelo humano para la determinación de metales. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. Vol. 14. pp. 15-20. 1995.
- [27] Costa, C., Sturaro, A., Allegri, G. y otros. The influence of color, age, and sex on the content of zinc, copper, nickel, manganese, and lead in human hair. *Biology of Trace Elements Research*. Vol. 40. pp 1-8. 1994.
- [28] Senofonte, O., Violante, N., y Caroli, S. Hair analysis and the early detection of imbalances in trace elements for members of expeditions in Antarctica. *Microchemical Journal*. Vol. 69. pp 231-238. 2001.
- [29] Plantikow, F. y Denkhaus, E. Application of an ETV-ICP system for the determination of elements in human hair. *Spectrochimica Acta. Parte B*. Vol. 51. pp 261-270. 1996.
- [30] Das Chaudhuri, A. y Sen, J. Brief communication: Choice of washing method of hair samples for trace element analysis in environmental studies. *American Journal of Physical Anthropology*. Vol. 15. pp 289-291. **2001.**

-
- [31] Forte, G., Alimonti, A., Violante, N. y otros. Calcium, copper, iron, magnesium, silicon and zinc content of hair in Parkinson's disease. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. Vol.19. pp 95–201.2005.
- [32] Skoog, D. Fundamentos de Química Analítica. Editorial Reverté S.A. España. Capítulo 32. pp. 845-849. 1974.
- [33] Betsy, Perez. Optimización de una metodología de elementos trazas en cabello por espectrometría de emisión óptica de plasma inductivamente acoplado. Trabajo de grado para optar al título de licenciado en Química. Facultad de ciencias. Universidad central de Venezuela. Caracas. 2007.
- [34] Robinson, K. y Robinson, J. Análisis Instrumental. Prentice Hall. España. pp 119-122. 2001.
- [35] Maraima, M. Determinación de silicio mediante la Espectrometría de emisión Óptica con Plasma Inductivamente Acoplado (ICP-OES). Trabajo de grado para optar al título de Licenciado en Química. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas. 2006.
- [36] Skoog, D, West, D., y Haller, J. Análisis Instrumental. Quinta Edición. Editorial McGraw-Hill. México. Capítulo 10. pp. 245-261. 2001.
- [37] Chirinos, J. y Márquez, G. Introducción a la Espectrometría de emisión Óptica con Plasma Inductivamente Acoplado (ICP OES). Universidad Central de Venezuela. Caracas. 2006.
- [38] Goull, JP., Neveu, N., Bouige, D., y otros. Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair reference values. *Forensic Science International*. Vol.153. pp 39–44. 2005.
- [39] Nowak b. Contents and relationship of elements in human hair for a non industrialized population in Poland the science of the total environment. Vol 209 pp 59 1998.
- [40] Rodushkin I., Axmson, M.D. Application of double focusing sector field ICP MS for multielemental characterization of human hair and nails. Parte II. A study of the in

habitants of northern sweden, the science of the total environment Vol 262pp 21-36 2006.

[41] Miller, J. y Miller, n. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. 4^{ta} edición. Prentice hall. España. pp 125-126. 2000.

[42] Jorma K, seppo Salmela, Erkki V. Effect of washing procedure on the chromium content of human scalp hair. Analytical chemica acta. Acta 138. PP 361-364.1982.