UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Determinación de niveles sanguíneos de Plomo en una muestra de niños mediante espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito

Tatiana del Pilar Cortés Guerrero

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de Toxicología
Bogotá D.C.; Colombia
2016

Determinación de niveles sanguíneos de Plomo en una muestra de niños mediante espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito

Tatiana del Pilar Cortés Guerrero

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Toxicología

Directora:

MSc. Nancy Patiño Reyes

Profesor asociado

Departamento de Toxicología Facultad de Medicina Universidad Nacional de Colombia

Codirectora:

MSc. Alba Isabel Rodríguez

Profesor asociado

Departamento de Toxicología Facultad de Medicina Universidad Nacional de Colombia

Toxicología Analítica

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Departamento de Toxicología

Bogotá D.C., Colombia

2016

A Isaac Gómez Cortés, el niño más importante en mi vida

Agradecimientos

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a las personas e instituciones que hicieron posible el desarrollo de este proyecto, entre las cuales encontramos:

A la Docente Nancy Patiño de la Universidad Nacional de Colombia, por sus enseñanzas, su dedicado esfuerzo y por sus constantes palabras de apoyo.

A la Docente Alba Isabel Rodríguez de la Universidad Nacional de Colombia, por la oportunidad brindada en hacer parte de su proyecto docente de año sabático.

Al Docente Álvaro Izquierdo de la Universidad Nacional de Colombia, por la oportunidad brindada en el Hospital de la Misericordia.

Al Departamento de Toxicología de la Facultad de Medicina, al coordinador del programa el Dr. Miguel Cote Menéndez y anterior coordinador el Dr. Jairo Téllez por su interés en el desarrollo y culminación del proyecto.

Al laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, en Coordinación de la Docente Nancy Patiño y en Dirección de la Docente Diana Cháves, por facilitarme el espacio para el desarrollo de la parte analítica del proyecto.

Al Hospital la Misericordia, en especial a la Dra. Gloria Uribe y Dra. Diana Beltrán por facilitarme un espacio de sus áreas de trabajo para el desarrollo del proyecto.

A Luz Adriana Ruiz, Mayury González, Diana Ríos ya que sin su apoyo no hubiese sido posible la culminación de este proyecto.

A Diana Mariño por sus valiosos aportes, por apoyo incondicional y sobre todo por su amistad.

A mis maestros de vida, mis padres José y María, mis hermanos David y Claudia por su ejemplo, dedicación y comprensión.

Finalmente a los dos hombres de mi vida, mi esposo Alejandro por su paciencia, apoyo, abrazos y amor; y a ti Isaac, la luz de mis días.

A todas las personas que me ayudaron y apoyaron en el desarrollo de este proyecto.

Resumen

La intoxicación con metales representa en la actualidad una gran problemática a nivel mundial pues aquellos no cumplen ninguna función biológica, como es el caso del Plomo, y la exposición a ellos puede afectar más de un sistema a la vez, produciendo efectos a veces irreversibles que perjudican notablemente la salud de la persona expuesta.

Es por esta razón, que este trabajo desarrolló y validó una metodología bioanalítica para la determinación de niveles de Plomo en sangre por espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito. A la metodología desarrollada se le evaluaron los parámetros de Selectividad, Linealidad y rango, Limite de detección, precisión, exactitud, entre otros.

Dicha metodología fue aplicada en el análisis de muestras de sangre provenientes de una población de niños hospitalizados en el Hospital la Misericordia de Bogotá, en los meses de enero a marzo del año en curso, con edades comprendidas entre los 3 meses y previo a los 18 años, para un total de 300 muestras.

Los resultados de dicho estudio pretenden dar un primer acercamiento al panorama actual de la intoxicación de Plomo en niños en Colombia y así motivar a nuevos investigadores a desarrollar estudios puntuales que permitan generar políticas de seguimiento y control de metales en la población infantil y adulta no laboralmente expuesta.

Palabras clave: Sangre, niños, metales, Plomo, espectrofotometría de absorción atómica.

Abstract

Hazardous metals, including lead, represents a huge problem worldwide because they do not serve any biological function in the body, and exposure to them can affect systems at a time, causing sometimes irreversible effects that can significantly human health.

Consequently we have developed and validated a bioanalytical method for determining blood lead level by atomic absorption spectrophotometry using a graphite furnace. The methodology developed was evaluated for Selectivity, Linearity, range, detection limit, precision and accuracy, among others.

This methodology was applied in the analysis of blood samples from a population of hospitalized children at Hospital la Misericordia of Bogota, during the months of January to March e current year, ages between 3 months and prior to the 18 years, for a total of 300 samples.

The results of this study aims to give a first estimate of the current landscape of lead poisoning in children in Colombia and thus encourage new researchers to develop specific studies to generate policies for monitoring and control metals exposure in children and the adult population not occupationally exposed.

Keywords: Blood, children, metals, lead, atomic absorption spectrophotometry.

Contenido

Pág.

AGRADECIMIENTOS VII

RESUMEN IX

ABSTRACT X

CONTENIDO XI

LISTA DE FIGURAS XIII

LISTA DE TABLAS XIV

INTRODUCCIÓN 1

1. OBJETIVOS 5

1.1. OBJETIVO GENERAL 5
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 5

2. MARCO CONCEPTUAL 7

2.1. PLOMO 7
2.1.1. Generalidades 7
2.1.2. Toxicocinética 8
2.1.3. Toxicodinamia 15
2.1.4. Órganos objetivos y manifestaciones clínicas 17
2.1.5. Plomo en niños 19
2.1.6. Tratamiento (Markowitz, 2003) 23
2.1.7. Biomarcadores 24
2.1.8. Plomo en sangre 26
2.2. VALIDACIÓN 27
2.2.1. Parámetros de validación. 28
2.3. ESPECTROSCOPÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA 33
2.4. INCERTIDUMBRE DE LA MEDICIÓN 43

3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 45

4. METODOLOGÍA 47

4.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO 47
4.1.1. Criterios de inclusión 48
4.1.2. Criterios de exclusión 48

4.2. Recolección y toma de datos 48
4.3. Características de las muestras a analizar 48
4.4. Metodología analítica 49
4.4.1. Equipos, materiales y reactivos 49
4.4.2. Preparación de soluciones estándar 51
4.4.3. Determinación del contenido de Plomo 53
4.4.4. Validación del método bioanalítico 56
4.5. Análisis y manejo de datos 62
4.6. Consideraciones éticas del estudio 62
4.6.1. Tipo de investigación 62
4.6.2. Procedimiento para la toma de muestras y recolección de la información 63

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 65

5.1. Tratamiento de la muestra 65
5.2. Limpieza del material de vidrio 65
5.3. Validación de la metodología Bioanalítica 65
5.4. Estimación de la Incertidumbre de la metodología bioanalítica. 79
5.5. Análisis de las muestras de sangre de niños por medio de la metodología bioanalítica validada. 85
5.5.1. Análisis socio demográfico de los individuos del estudio 85
5.5.2. Análisis de muestras 89

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 105

6.1. Conclusiones 105
6.2. Recomendaciones 106

BIBLIOGRAFÍA 109

ANEXOS 117

A. Anexo: Comité de Ética Universidad Nacional de Colombia 117
B. Anexo: Comité de Ética Hospital la Misericordia 118
C. Anexo: Autorización del No Uso de Consentimiento Informado 119
D. Anexo: Formato de Toma de Datos 120
E. Anexo: Procedimiento de limpieza de materiales para análisis de Plomo en sangre 121
F. Anexo: Certificado Estándar de Plomo 122
G. Anexo: Datos para cálculos de Parámetros de Validación 123
H. Anexo : Fórmulas para cálculos de los parámetros de validación 125
I. Anexo: Optimización del método 129
J. Anexo: Efecto matriz 130
K. Anexo: Tablas y análisis de datos para la estimación de la incertidumbre . 131
L. Anexo: Tabla resumen con datos de muestras de género, edad y ubicación geográfica 133

Lista de figuras

Pág.

FIGURA 2-1: MODELO DEL METABOLISMO DEL PLOMO 11
FIGURA 2-2: EFECTOS DEL PLOMO EN LA SÍNTESIS DEL HEM 16
FIGURA 2-3: PUNTEADO BASÓFILO POR INTOXICACIÓN CON PLOMO 17
FIGURA 2-4: MODELO CINÉTICO DE EXPOSICIÓN AL PLOMO EN NIÑOS 21
FIGURA 2-5: ESQUEMA DE NIVELES ELECTRÓNICOS DE ENERGÍA EN UN ÁTOMO 34
FIGURA 2-6: ESQUEMA SIMPLE DE ESPECTROFOTÓMETRO ABSORCIÓN ATÓMICA CON HORNO DE GRAFITO 35
FIGURA 2-7: ESQUEMA DE LÁMPARA DE CÁTODO HUECO 36
FIGURA 2-8: PROCESO EN LA LÁMPARA DE CÁTODO HUECO. 36
FIGURA 2-9: CORTE TRANSVERSAL DE HORNO DE GRAFITO Y GRÁFICO DE HORNO DE GRAFITO CON PLATAFORMA L´VOV INSERTADA. 37
FIGURA 2-10: ESTRUCTURA TÍPICA DE UN MONOCROMADOR. 39
FIGURA 2-11: SISTEMA BÁSICO DE ESPECTROFOTÓMETRO DE UN SOLO HAZ. 40
FIGURA 5-1: SEÑAL DE BLANCO DE SANGRE 66
FIGURA 5-2: CURVA DE CALIBRACIÓN EN EL SISTEMA PARA PLOMO 67
FIGURA 5-3: CURVA DE CALIBRACIÓN EN EL MÉTODO PARA PLOMO 67
FIGURA 5-4: DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO ANALÍTICO 80
FIGURA 5-5: INDIVIDUOS SEGÚN SU GÉNERO INCLUIDOS EN EL ESTUDIO 85
FIGURA 5-6: PORCENTAJE DE INDIVIDUOS SEGÚN SU GÉNERO EN EL ESTUDIO 85
FIGURA 5-7: NÚMERO DE INDIVIDUOS DE ACUERDO A LA EDAD 86
FIGURA 5-8: PORCENTAJE DE INDIVIDUOS PERTENECIENTES A LA CLASIFICACIÓN ETARIA 87
FIGURA 5-9: NÚMERO DE INDIVIDUOS PERTENECIENTES A LA CLASIFICACIÓN ETARIA DE ACUERDO AL GÉNERO 88
FIGURA 5-10: NÚMERO DE INDIVIDUOS DE ACUERDO AL LUGAR DE PROCEDENCIA 88
FIGURA 5-11: PORCENTAJE DE INDIVIDUOS DE ACUERDO AL LUGAR DE PROCEDENCIA 89
FIGURA 5-12: PORCENTAJE DE NIÑOS SEGÚN RESULTADO DE ANÁLISIS DE CONCENTRACIONES SANGUÍNEAS DE PLOMO 94
FIGURA 5-13: CONCENTRACIÓN VS GÉNERO 97
FIGURA 5-14: CONCENTRACIÓN VS EDAD 99
FIGURA 5-15: ANÁLISIS DE CORRESPONDENCIA MÚLTIPLE 101

Lista de tablas

Pág.

Tabla 2-1: Respuesta biológica en Niños vs. Adultos en exposición a Plomo 20
Tabla 4-1: Datos Solución Estándar de Referencia de Plomo 51
Tabla 4-2: Programa del horno de grafito para la determinación de Plomo 54
Tabla 4-3: Cantidades para preparación de curva acuosa 55
Tabla 4-4: Cantidades para preparación de curva sanguínea 56
Tabla 4-5: Resumen del estudio de validación de la metodología bioanalítica para determinación de Plomo en sangre 61
Tabla 5-1: Respuestas obtenidas para los seis blancos de sangre provenientes de diferentes donantes 66
Tabla 5-2: Pruebas de Hipótesis aplicadas para la pendiente, intercepto y coeficiente de variación 68
Tabla 5-3: Resultados de las pruebas de hipótesis para el intercepto, pendiente y coeficiente correlación del sistema para Plomo. 68
Tabla 5-4: Resultados de las pruebas de hipótesis para el intercepto, pendiente y coeficiente correlación del método para Plomo 69
Tabla 5-5: Determinación del límite de Detección mediante DSR y Curva de Calibración 71
Tabla 5-6: Verificación del límite de detección 71
Tabla 5-7: Resultados para el Límite inferior de Cuantificación LLOQ y el Límite superior de Cuantificación 72
Tabla 5-8: Precisión y Repetibilidad del sistema y método para el LLOQ, 50,0 µg/L, 100, 0 µg/L y 250,0 µg/L. 73
Tabla 5-9: Resultados del Análisis de Varianza para la precisión intermedia del método y sistema. 75
Tabla 5-10: Exactitud del Sistema y método para el LLOQ 50,0mg/L, 100,0mg/L y 250,0 mg/L 75
Tabla 5-11: Resultados del porcentaje de recuperación para las concentraciones de 25,0 mg/L, 50,0 mg/L, 100,0 mg/L y 250,0 mg/L. 76
Tabla 5-12: Evaluación del efecto matriz por comparación de pendientes 77
Tabla 5-13: Resultados de Efecto Memoria 77
Tabla 5-14: Resultados de estabilidad en el automuestreador a las 12horas, 24 horas y 48 horas para concentración de 50,0µg/L y 250,0 µg/L, expresados en porcentaje en relación a la muestra control. 78

Tabla 5-15: Resultados de estabilidad de una muestra de concentración conocida, en ciclos de refrigeración y atemperado propios del análisis en semana 2, 4 y 6, expresados en porcentaje en relación a la muestra control. 79
Tabla 5-16: Componentes de la incertidumbre 84
Tabla 5-17: Resultados de los niveles sanguíneos de Plomo 91
Tabla 5-18: Número de individuos y porcentaje de acuerdo a las concentraciones sanguíneas de Plomo encontradas, para niños menores de 1 año 94
Tabla 5-19: Número de individuos y porcentaje de acuerdo a las concentraciones sanguíneas de Plomo encontradas, para niños entre 1 año a 5 años 95
Tabla 5-20: Número de individuos y porcentaje de acuerdo a las concentraciones sanguíneas de Plomo encontradas, para niños entre 6 años a 12 años 95
Tabla 5-21: Número de individuos y porcentaje de acuerdo a las concentraciones sanguíneas de Plomo encontradas, para niños entre 13 años a menores de 18 años 96
Tabla 5-22: Frecuencias Absolutas, Concentración vs Género 96
Tabla 5-23: Porcentajes (Total Columna) Concentración vs Género 96
Tabla 5-24: Frecuencias Absolutas, Concentración vs Edad 98
Tabla 5-25: Porcentajes (Total Columna) Concentración vs Edad 98

Introducción

La intoxicación con metales representa en la actualidad una gran problemática a nivel mundial pues aquellos no cumplen ninguna función biológica, como es el caso del Plomo, y la exposición a ellos puede afectar más de un sistema a la vez, produciendo efectos a veces irreversibles que perjudican notablemente la salud de la persona expuesta.

Los efectos en la salud de la persona expuesta a metales pesados dependerá de las características fisicoquímicas del metal y de las características de la población expuesta, en este caso en particular, las diferencias toxicocinéticas que manifiesta el Plomo en una población conformada por niños y adultos, revela una mayor susceptibilidad en los niños, pues estos últimos absorben más de este metal a través del tracto gastrointestinal que los adultos (40% en los niños vs 10% en adultos), por ejemplo. (Basa, Luzardo & Quintana, 2012). El tener exposición a Plomo inorgánico (vía pulmonar o digestiva) en los primeros años de vida produce daños en la función cerebral que pueden ser duraderos, pues en etapas de desarrollo existe mayor densidad de conexiones sinápticas. (Ochoa et al, 1998)

Estudios científicos sobre la exposición crónica de Plomo en niños, indican que los efectos sobre la salud pueden presentarse con niveles sanguíneos por debajo de 10 µg / dl, entre los cuales encontramos por ejemplo déficit académico-cognitivo en niños expuestos de 6 años en adelante, hallazgos con deficiencias neurológicas, entre los que se encuentran coeficientes intelectuales bajos, deficiencia cognitiva, disminución en su rendimiento escolar, etc. (Ascione, 2001) (Azcona,2000) (Ochoa,1998). Sin embargo, desde el año 2015, el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) disminuye estos límites a 5 µg / dl. (CDC, 2015)

En el año 1991 el CDC sugirió que a los niños menores de 6 años se les debe realizar exámenes para determinar presencia de Plomo. En 1993 la Academia Americana de

Pediatría (AAP), sugiere que la detección de Plomo debería ser obligatoria y ser realizada como un examen de rutina para niños de 9 meses a niños de 6 años. (Min-ming, L.- 2014)

Estudios realizados recientemente en Corea han concluido por ejemplo, que existe una asociación de concentraciones de Plomo en sangre, inclusive bajas concentraciones con un aumento de los comportamientos autistas en niños en edad escolar. También estudios realizados en ese país han demostrado asociación entre concentraciones de Plomo en sangre y Déficit de atención e hiperactividad. (Choi, 2016)

Revisando bibliográficamente en Colombia se han desarrollado pocos estudios de evaluación de la exposición de metales en niños, lo que genera un desconocimiento sobre el riesgo toxicológico presente actualmente, debida a la interacción del Plomo con dicha población.

Uno de los estudios realizados en Bogotá, por Fuentes & Falla en el 2008, evaluó Plomo ambiental al interior de jardines infantiles de las localidades de Puente Aranda, Fontibón y Kennedy, encontrando que sobrepasaron los valores permisibles de concentración indicados por la OMS.

Es importante resaltar que en países de América Latina, como por ejemplo México, existe normatividad sobre salud ambiental que permite evaluar la concentración de Plomo en sangre y así tomar acciones para proteger la salud de la población no expuesta laboralmente a este metal.

El presente estudio pretende realizar un acercamiento a la situación actual del país, analizando muestras de sangre provenientes de niños que viven especialmente a nivel central (Boyacá, Cundinamarca, Huila). Para el análisis de este metal en sangre, la Organización Mundial de la Salud, establece cuatro posibles métodos analíticos, los cuales son: Espectrometría de Absorción Atómica con ionización en llama, Espectrometría de Absorción Atómica con ionización electrotérmica (Horno de grafito), Voltamperometría de redisolución anódica y Plasma Inductivo Acoplado con Espectrómetro de Masas ICP MS.

Se selecciona la metodología de Absorción atómica con Horno de Grafico, puesto que los límites de detección reportados en la literatura son menores de 1 µg/dl, se necesita una pequeña cantidad de muestra, es más económica que el análisis por ICP/MS y además es ampliamente usada y recomendada para el control biológico de Plomo en sangre. La ACGIH (American Conference of Guvermental Industrial Hygienist) de España recomienda la cuantificación de Plomo por horno de grafito.

1. Objetivos

1.1. Objetivo General

Determinar los niveles sanguíneos de Plomo presente en una muestra de niños que se encuentren hospitalizados en el Hospital la Misericordia, en un periodo de tiempo tres meses.

1.2. Objetivos Específicos

- Validar la metodología analítica para la cuantificación de niveles sanguíneos de Plomo por la técnica Espectrometría de absorción atómica.

- Estimar la incertidumbre del análisis de Plomo en muestras de sangre.

- Determinar la concentración de Plomo en muestras biológicas de sangre recolectadas de los niños incluidos dentro del estudio.

2. Marco Conceptual

2.1. Plomo

2.1.1. **Generalidades**

El Plomo con símbolo químico Pb, es un metal pesado, como elemento metálico de número atómico 82, con peso atómico 207,19, perteneciente a la columna IVA de la tabla periódica y sus números de oxidación 0, +2 y +4. El Plomo es un metal gris y blanco, distribuido en la corteza terrestre. La forma de mayor abundancia es el Sulfuro de Plomo (PbS). (Ferrer, 2003)

El Plomo pocas veces se encuentra naturalmente como un metal, en su mayoría se encuentra combinado con dos o más elementos para formar compuestos de Plomo (Nordberg et al., 2007), entre los cuales podemos encontrar compuestos inorgánicos de nitrato de Plomo, arseniato de Plomo, oxido de Plomo y orgánicos como acetato de Plomo tetraetilo de Plomo y tetrametilo de Plomo, entre otros.

La Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) clasifica los compuestos inorgánicos de Plomo como probables carcinógenos humanos (Grupo 2A), y los compuestos orgánicos del Plomo como no clasificables carcinogénicos en humanos (Grupo 3). (IARC, 2006).

Las personas pueden estar expuestas al Plomo de diferentes formas, las cuales pueden generar intoxicación de acorde al tiempo y cantidad de la exposición. Encontramos una exposición no laboral como es el consumo de agua proveniente de tuberías en Plomo,

materiales que se exponen a la intemperie y necesitan recubrimiento en Plomo (Valdivia, 2005), ambientalmente cuando el aire que se respira proviene de empresas en las cuales incluyan este metal en sus procesos de manufactura (pinturas, pigmentos, cauchos, fabricación de vidrio, entre otros) (Abadin et al, 2007) y empresas de metalurgia. La exposición para la población general por parte de la combustión de gasolina ha disminuido notablemente en los últimos años por la eliminación de aditivos de Plomo en la gasolina. El Plomo se convierte entonces en un contaminante ambiental reconocido por causar efectos en salud cuando se presenta exposición a largo plazo en concentraciones bajas, y la capacidad nula del organismo en realizar efectivamente una eliminación, contribuye a su acumulación. (Bedolla et al, 2008).

Se presenta también una exposición ocupacional para los trabajadores que laboran en industrias cuyos procesos incluyen como materia prima compuestos con Plomo ó las personas que laboran en la fabricación, desarmado y reciclaje de baterías de automóviles, entre otros.

En niños se ha encontrado que a bajas concentraciones de exposición puede generar efectos tóxicos, algunos irreversibles, pues ellos son más sensibles que los adultos en sus efectos. (Azcona et al, 2000).

2.1.2. **Toxicocinética**

Se debe partir de la premisa que el Plomo no cumple ninguna función biológica atribuible en el organismo.

- **Absorción**

La absorción del Plomo se presenta por diferentes vías en las cuales encontramos el tracto respiratorio, tracto digestivo y piel.

Inhalación

Una de las vías por las cuales el Plomo ingresa al organismo, es la vía respiratoria. El Plomo puede ser inhalado en forma de aerosol, vapores, polvo fino (Tellez & Bautista, 2005) y su deposición en el tracto respiratorio depende considerablemente del tamaño de partícula de éste. La vía respiratoria es la vía principal en exposición ocupacional, llegándose a absorber, cuando se está expuesto a vapores de Plomo hasta un 40%. (Rubio, Revert el al, 2004)

Las partículas con un diámetro mayor de 5µm se depositan en las vías respiratorias y por medio de mecanismos como el mucociliar pueden ser llevadas al tracto digestivo y tragadas. (Nordberg et al., 2007) Partículas entre 0.01-5 µm son depositadas en los sacos alveolares en un 10 a 60 %, y son absorbidas en mayor o menor proporción dependiendo de la solubilidad del compuesto inhalado. El Plomo inhalado se combina con el Dióxido de Carbono espirado, formándose Carbonato de Plomo soluble. (Rubio et al., 2004) Hábitos como el fumar que generan daño a la mucosa y a los alveolos facilitando el paso del Plomo a sangre. (Rubio et al., 2004)

Tracto gastrointestinal

Como se mencionó anteriormente, una de las formas como el Plomo puede llegar a tracto digestivo es por medio de mecanismos mucociliares que arrastran partículas de Plomo respirado a este sistema. La absorción del Plomo inorgánico se produce principalmente en el duodeno. (Abadin et al, 2007)

La absorción del Plomo dependerá de la solubilidad del compuesto ingerido, es así, por ejemplo que para sales solubles de Plomo se encuentra una absorción de 4-21%, siendo mayor en niños, teniendo como factor determinante su estado nutricional, alcanzando hasta un 50% de absorción (Ferrer, 2003). Encontramos compuestos orgánicos como el tetraetilo de Plomo que se absorbe fácilmente en el tracto gastrointestinal, en un porcentaje mayor al 90%. Estudios realizados han demostrado que en sujetos con ayuno pueden absorber por el tracto gastrointestinal de 37 a 70 %. La ingesta simultanea de alimentos con contenido de Calcio, Fosforo, Zinc, y vitaminas pueden reducir

considerablemente la absorción gastrointestinal del Plomo. (Nordberg et al., 2007) (Tellez & Bautista, 2005). Pero también la ingesta de sustancias como el alcohol aumenta la absorción del Plomo.

Se ha descrito que los mecanismos exactos de absorción gastrointestinal son desconocidos aun y pueden implicar la difusión activa a traces de las células epiteliales intestinales o entre células, con un Plomo en su forma ionizada Pb^{+2}. (Abadin et al, 2007)

Cuando se habla de absorción de Plomo por vía gastrointestinal en niños, se debe tratar el fenómeno de *pica*, que se entiende como el fenómeno que ocurre cuando un niño consume, chupa o ingiere pintura raspada de las paredes, mastica envolturas y/o piezas metálicas que contengan Plomo. (García S., 2013). Este fenómeno presentado en niños de bajas edades (están más cercanos al suelo), facilita y aumenta la posibilidad de la absorción gastrointestinal de este metal.

Piel:

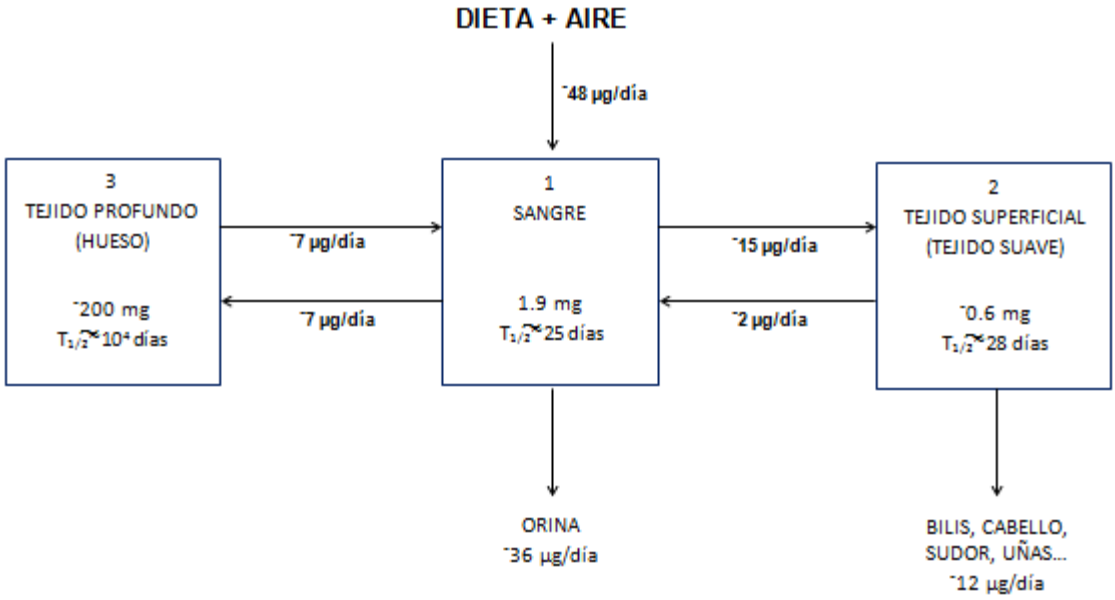
En la piel el proceso de absorción es mínimo. En un estudio realizado administrando durante un mes una fracción de una sal inorgánica de Plomo, dio como resultado una absorción de 0,06%. (Nordberg et al., 2007). El contacto con compuestos de Plomo orgánico puede generar una mayor absorción.

- **Distribución:**

Uno de los primeros modelos cinéticos del Plomo fue propuesto por Rabinowitz, donde por medio de trazadores isotópicos ingeridos, determina tres compartimentos, un primer compartimento central que representa la sangre, un segundo compartimento que corresponde a los tejidos superficiales que son aquellos tejidos de rápido intercambio de Plomo y el último compartimento que supone un tejido profundo, con un intercambio lento de depósito de Plomo y que se encuentra dentro del hueso.

En este modelo se determinan como vías de eliminación la vía urinaria desde el compartimento central y la bilis, sudor, cabello y uñas desde el compartimento de tejido superficial. (Abadin et al, 2007)

Figura 2-1: Modelo del Metabolismo del Plomo



* Modelo esquemático de la cinética de plomo, en el cual la distribución es representada como un centro de compartimentos (sangre),

(Tomado y adaptado de U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Toxicological Profile for Lead. 2007)

Una vez absorbido el Plomo, se distribuye en tres compartimentos así:

- Sangre (Vida media de aproximadamente 36 días)
- Tejidos blancos como cerebro, médula ósea, riñón (Vida media aproximadamente 40 días)
- Tejido mineralizado como Huesos y dientes (Vida media de 10 a 28 años)

Sangre:

Una vez en la sangre, el Plomo se encuentra en los eritrocitos (Glóbulos rojos), dejando libre en plasma solo una fracción del 1%, proporción que aumenta a medida que se aumenta la concentración en sangre.

A nivel de glóbulos rojos, la vías propuestas para la transferencia de Plomo a través de las membranas de los glóbulos rojos es un cambio aniónico dependiente de HCO_3^- y es bloqueada por inhibidores de intercambio aniónico, el Plomo y el calcio pueden compartir una vía de permeabilidad, que puede ser un canal de Ca^{2+}. El Plomo se extruye de los eritrocitos por una vía de transporte activo (Ca^{2+}, Mg^{2+}) – ATPasa. (Abadin et al, 2007)

La afinidad del Plomo por los eritrocitos es de un 80% y se da por la unión a la proteína ácido δ aminolevulinico deshidratasa (ALAD), enzima presente en todas las células incluyendo los eritrocitos. Al unirse dos moléculas de ácido δ aminolevulinico deshidratasa, forman una enzima con cuatro sitios activos y dos sitios de unión al Zinc. El Plomo puede reemplazar al Zinc en esta estructura, pues tiene una afinidad a ella 20 veces mayor, causándole una inhibición enzimática. (Nordberg et al., 2007) (Abadin et al, 2007)

Una inducción a la síntesis de ALAD aparece en respuesta a la inhibición de la misma por su unión al Plomo. Varios mecanismos pueden participar en la inducción de la síntesis incluida la inhibición de su actividad por su unión al Plomo, una inhibición por protoporfirina secundaria a la acumulación de protoporfirina como resultado de la inhibición de ferroquelatasa por Plomo y la acumulación de ALA secundaria a la inhibición de ALAD. (Abadin et al, 2007)

A nivel plasmático se ha propuesto que existe el Plomo en cuatro estados: débilmente unido a la albúmina sérica u otras proteínas con una afinidad relativamente baja, acomplejado con ligandos de bajo peso molecular como son aminoácidos y ácidos carboxílicos, fuertemente unido a metaloproteínas circulantes y como Pb^{2+} libre.(Abadin et al, 2007)

Cuando los sitios de unión disminuyen por la cantidad de Plomo desplazando al Zinc, la cantidad de Plomo libre se hace mayor en el plasma.

La vida media del Plomo en sangre de un adulto es de 25 días, para un niño es 10 meses si su exposición es natural, y 90 días si es hueso trabecular y de 10 a 20 años si es hueso cortical. (Ferrer, 2003)

Tejidos Blandos**:**

Una vez en el plasma, el Plomo es distribuido a otros órganos. Entre los tejidos blandos, el hígado y riñón alcanzan las concentraciones más altas. (Nordberg et al., 2007)

La distribución que se realiza en el sistema nervioso es desigual, con altos niveles en el hipocampo. Se ha encontrado que el paso del Plomo al sistema nervioso central de los niños es mayor que en adultos, siendo este sistema y la medula ósea, los órganos blancos de su toxicidad. (Valdivia, 2005) Después del hueso, el hígado es el órgano de mayor acumulación de Plomo, seguido de los riñones.(Ferrer, 2003)

Tejidos mineralizados:

Una importante cantidad de Plomo absorbida se une a los huesos. (Nordberg et al., 2007), siendo mayormente observado en trabajadores expuestos a este metal. Se atribuye la toxicidad del Plomo en los huesos a su afinidad por los sitios de acción molecular del Calcio, es decir, este metal sustituye al Calcio.(Sanin et al., 1998)

Se ha encontrado que si se retira la exposición al Plomo, los niveles sanguíneos pueden mantenerse altos o iguales, gracias a los depósitos óseos presentes y que perduran por bastante tiempo.

Experimentalmente se han propuestos mecanismos fisiopatológicos para la explicación de lesiones óseas por intoxicación con Plomo, como son la alteración de la adhesión de la células óseas a la matriz, existencia de competencia del Plomo por los sitios de unión del calcio, inhibición de la producción de osteocalcina, alteración en el acople de osteoblastos y osteoclastos, entre otros. (Sanin et al., 1998)

En este sentido un esqueleto en formación es más sensible a la toxicidad por Plomo que uno ya desarrollado, por lo que los niños en gestación y en desarrollo tienen mayores complicaciones óseas que los adultos. (Sanin et al., 1998)

El Plomo también se acumula en dientes, formando el ribete de Burton, siendo su manifestación altamente utilizada en vigilancia médica.

- **Biotransformación**

Existen pruebas de que los microorganismos son capaces de metilar el Plomo metálico y sus compuestos inorgánicos, lo que genera una gran acumulación en el organismo. (Tellez & Bautista, 2005). No se tiene evidencia de que ocurra alguna Biotransformación de estos compuestos de Plomo en tejidos. (Nordberg et al., 2007) Pero los compuestos orgánicos se dealquilan en el hígado, donde se transforman en Plomo inorgánico y compuestos trialquílicos los que son mayormente tóxicos. (Tellez & Bautista, 2005) El tetraetilo y tetrametilo de Plomo sufren una dealquilación oxidativa formando metabolitos altamente tóxicos que son el trietil y trimetil Plomo. En el hígado la reacción es catalizada por citocromo P450 dependiente de sistema monoxigenasa. (Abadin et al, 2007)

- **Eliminación**

El Plomo se elimina en mayor cantidad por la orina (90%) , con una eliminación urinaria normal de 30 µg/24 h y en menor cantidad por otras vías como son la bilis, piel, cabello, uñas y leche materna. (Valdivia, 2005) (Ferrer, 2003)

La eliminación urinaria se hace a través de filtración glomerular con reabsorción tubular. (Nordberg et al., 2007) La eliminación del Plomo consumido por ingesta se hace principalmente por las heces, también puede eliminarse por secreciones gastrointestinales (16%), sudor (8%). En madres lactantes encontramos concentraciones de Plomo en leche similares a las del plasma, con valores que oscilan entre 12 µg/l hasta valores de 115 µg/l. (Nordberg et al., 2007)

2.1.3. **Toxicodinamia**

El Plomo tiene afinidad por los sistemas enzimáticos con grupos tiol en especial por las enzimas dependientes de Zinc. (Valdivia, 2005)(Ferrer, 2003). Este metal interactúa con elementos esenciales como Calcio, Hierro, Zinc y Cobre compitiendo con ellos y alterando sus concentraciones celulares. (Rubio et al., 2004)

Podemos entonces clasificar los mecanismos de acción del Plomo así:

- **Alteración del calcio**: (Valdivia, 2005)

*El Plomo reemplaza al calcio como segundo mensajero intracelular, modificando la distribución de éste dentro de la célula, interfiriendo en la regulación del metabolismo energético.

*Activa la enzima proteinquinasa C la cual interviene en varios procesos celulares.

*Se une a la proteína calmodulina, la cual es reguladora importante.

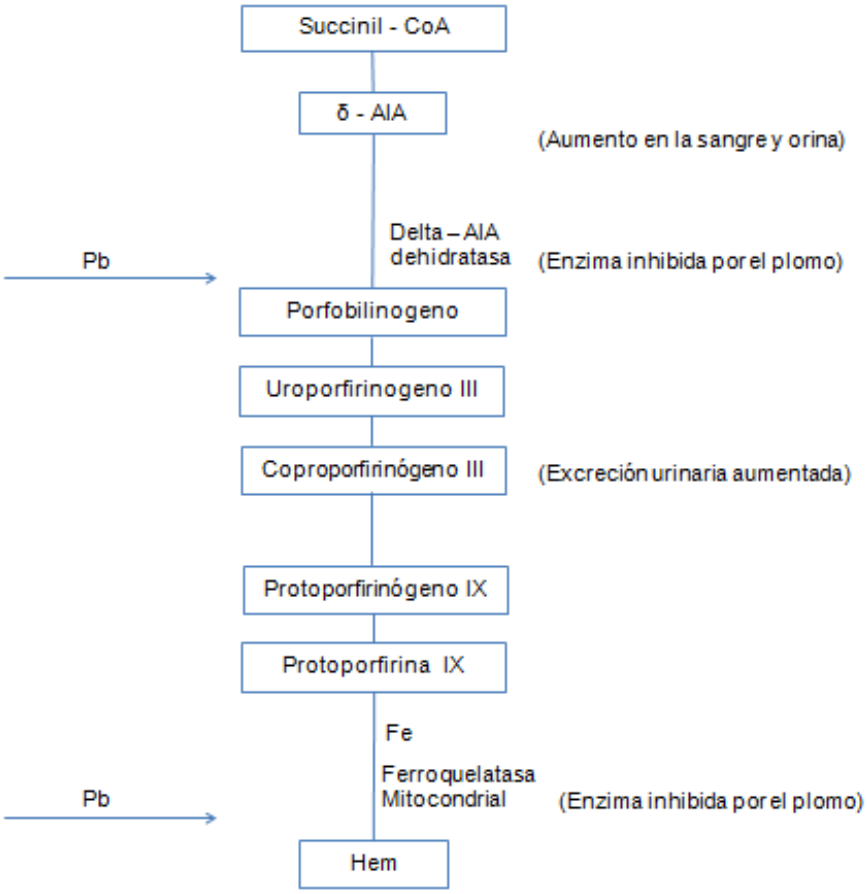
*Inhibe la bomba Na-K-ATPasa aumentando el calcio intracelular.

Por la alteración de los niveles de calcio se presentan problemas de neurotransmisión y del tono vascular. El Plomo genera interferencia con el calcio en las células endoteliales de los capilares cerebrales generando una disrupción de las uniones intracelulares que caracterizan a la barrera hematoencefálica produciendo un edema cerebral. (Ferrer, 2003)

- **Alteración de las enzimas dependientes del Zinc**:

*Altera el sistema hematopoyético, interfiriendo en la síntesis del grupo HEM, uniéndose a los grupos sulfidrilos de las metaloenzimas como por ejemplo la *d aminolevulinico deshidratasa* (ALAD). En la figura 2-2 se muestra y explica los efectos del Plomo sobre el grupo HEM.

Figura 2-2: Efectos del Plomo en la síntesis del Hem



(Tomado y adaptado de Intoxicación por Plomo. Valdivia M. Revista Sociedad Peruana Medicina Interna. 2005)

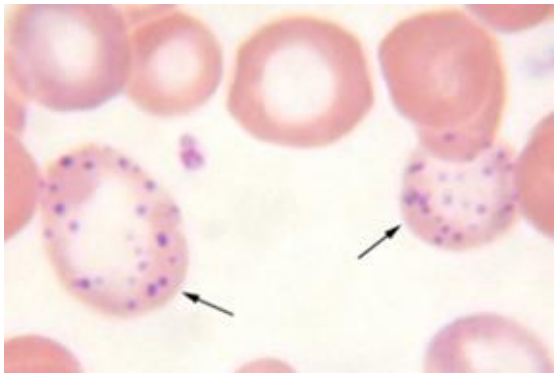
*Se une a las coproporfiriógeno oxidasa y la ferroquelatasa teniendo como resultado final el aumento de la Zinc protoporfirina y anemia. Existe entonces un aumento de la coproporfirina urinaria y un aumento de la protoporfirina eritrocitaria.

- **Otros sistemas enzimáticos afectados**.

Se presentan alteraciones en la integridad de las membranas celulares. Junto con el aumento en la protoporfirina eritrocitaria se manifiesta una anemia normocrómica y

normocítica que se evidencia con un punteado basófilo característico en los hematíes como se observa en la figura 2-3.

Figura 2-3: Punteado Basófilo por Intoxicación con Plomo



Tomado de Fichero de Hematología – Consultado en la Web
http://noeqbcursodehema.blogspot.com.co/2015/11/punteado-basofilo.html
www.flickr.com/photos/64061910@N02/galleries/72157626965076518

Este punteado está conformado por degradación de ARN que es eliminado normalmente por la enzima pirimidina-5-nucleotidasa, que se encuentra inhibida. (Ferrer, 2003)

- **Vitamina D**

A nivel renal interfiere en la conversión de la vitamina D a su forma activa, por lo que se presenta inclusión intracelular en los túbulos renales, produciendo tubulopatía que llega a su vez a atrofia tubular y fibrosis sin compromiso glomerular.

2.1.4. Órganos objetivos y manifestaciones clínicas

- **Sistema Nervioso central**

El Plomo inorgánico puede causar encefalopatía, tanto en niños como en adultos. Los signos clásicos de una toxicidad alta son pérdida de visión, ataxia, convulsiones y coma. (Tellez & Bautista, 2005) En una exposición no tan alta, se indican efectos sobre el Sistema Nervioso Central como prevalencia más alta de irritabilidad, hostilidad, ansiedad, fatiga, tensión, depresión y dificultad para concentrarse.(Nordberg et al., 2007)

En trabajadores expuestos a Plomo se ha encontrado una similitud entre la enfermedad de Esclerosis Lateral Amiotrofica (ELA) y la neuropatía motora primaria que causa la exposición a este metal. (Nordberg et al., 2007.) (Ferrer, 2003)

- **Sistema Nervioso Periférico**

La exposición a Plomo inorgánico puede causar daño al Sistema Nervioso Periférico. (Nordberg et al., 2007) La mayor alteración es la neutorpatía perisférica con predominio motor en los músculos de las extremidades. Se presenta paralisis radial, braquial, peronea. (Tellez & Bautista, 2005). Existe tambien una debilidad distal leve (menor capacidad de pellizco y fuerza de agarre) de las extremidades superiores. Tambien se presenta una destrucción de las células de Schwann seguida de desmielinización y degeneración axonal.(Ferrer, 2003)

- **Sangre y los órganos que forman la sangre**

La exposición a Plomo puede causar anemia. La anemia inducida por la exposición al Plomo se caracteriza por un punteo basófilo de los eritrocitos, debido a que se inhibe la Pirimidina 5 nucleotidasa (P5N) causando una acumulación de nucleótidos de Pirimidina y no ocurre una despolimerización normal de retículo ribosomal RNA y se produce el granulado. (Nordberg et al., 2007)

La exposición crónica a Plomo disminuye la producción del núcleo HEME, lo que afecta directamente la producción de hemoglobina y la vida de los eritrocitos, produciendo anemia. Una exposición aguda se asocia con anemia hemolítica. La anemia no se manifiesta tempranamente; solo se hace con exposiciones altas y prolongadas.(Poma, 2008)

- **Riñones**

La exposición a Plomo genera disfunción renal caracterizada por cambios tubulointersticiales y glomerulares, resultando en hipertensión, hiperuricemia y falla renal crónica. (Nordberg et al., 2007)

- **Sistema gastrointestinal**

Se presenta con la exposición a Plomo dolor abdominal tipo cólico. Además se presenta anorexia, vómitos y crisis de estreñimiento alternando con diarrea. Puede aparecer un ribete gris o azulado gingival. (Ferrer, 2003)

- **Sistema reproductor**

La exposición a Plomo genera una disminución en el conteo total de espermatozoides, además genera un aumento en la proporción de espermatozoides anormales. (Poma, 2008) (Nordberg et al, 2007)

En el embarazo, al atravesar la placenta, la sangre fetal contiene de 80 a 100% de la concentración de Plomo de la sangre materna. Estudios han demostrado que existe asociación entre exposición ocupacional al Plomo en mujeres en embarazo y abortos espontáneos, muertes fetales y partos prematuros. (Ascione, 2001) (Poma, 2008)(Alamazán, Garcia, & Hernandez, 2006)

2.1.5. **Plomo en niños**

Los niños son más sensibles que los adultos a los daños y efectos que el Plomo en concentraciones bajas puede causar en el organismo. (Azcona-cruz et al., 2000) Por ejemplo, la absorción puede ser diferente en los recién nacidos debido a la inmadurez de su tracto gastrointestinal y el área superficial de la piel es más grande en proporción al peso corporal, la absorción gastrointestinal de Plomo es mayor en lactantes y niños pequeños o en la eliminación, sobre todo en los recién nacidos, pues ellos tienen una baja tasa de filtración glomerular y no han desarrollado la capacidad de secreción y absorción tubulares eficientes. (Nordberg et al., 2007) Los mecanismos por los que se incrementa la vulnerabilidad en niños aún no están establecidos.

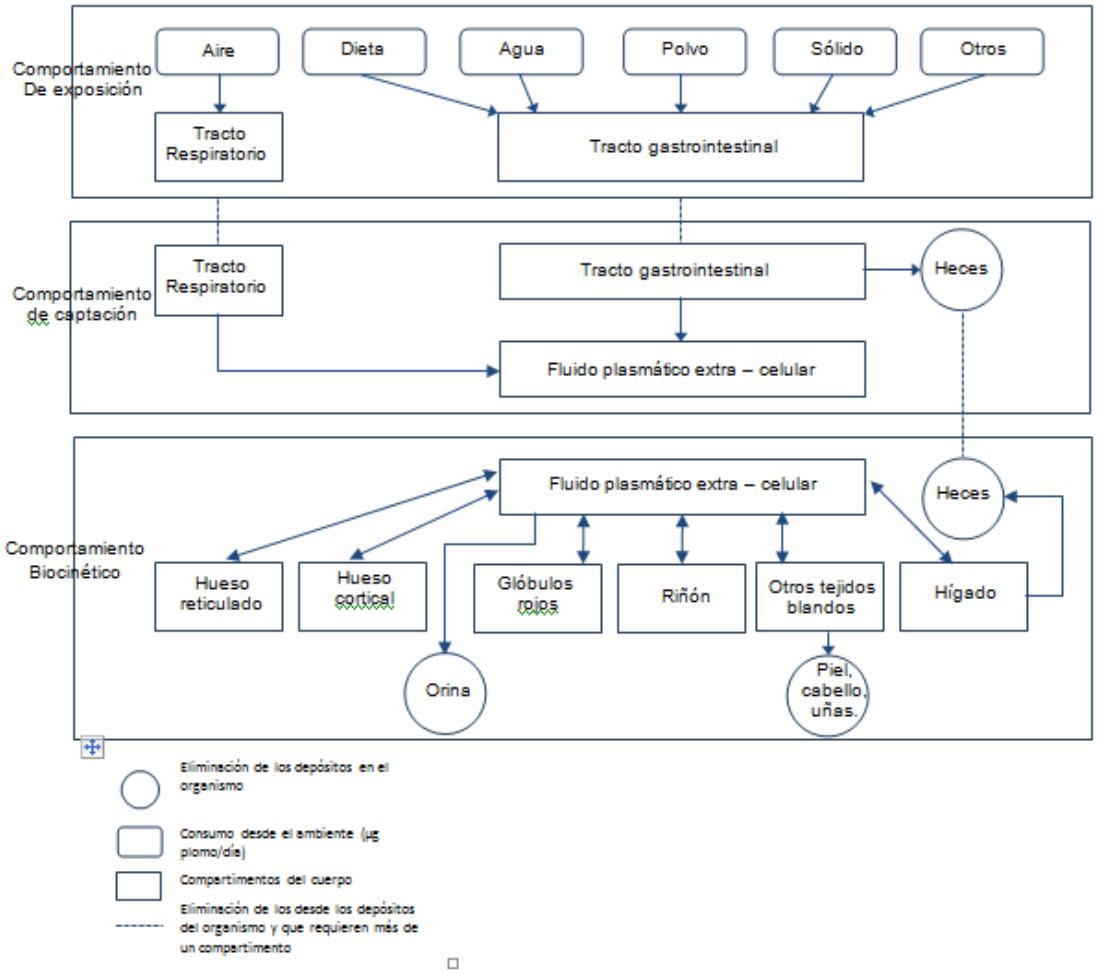
El modelo cinético para Plomo en niños es descrito por Nordberg y colaboradores como un modelo multicompartimental, según se muestra en la siguiente ilustración.

Tabla 2-1: Respuesta biológica en Niños vs. Adultos en exposición a Plomo

Respuesta en niños	Nivel de Pb en sangre (µg/dL)	Respuesta en adultos
	150	
Muerte		
	100	Encefalopatía
Encefalopatía		
Nefropatía		Anemia
Anemia		
Cólico		Longevidad disminuida
	50	Disminución en la síntesis de hemoglobina
Disminución en la síntesis de hemoglobina	40	Baja fertilidad (hombre) nefropatía
Disminución en el metabolismo, disminución de vitamina D	30	Hipertensión arterial, capacidad auditiva
Baja velocidad conducción nerviosa	20	
Baja Protoporfirina Eritrocitaria		
Bajo coeficiente intelectual (IQ)	10	Hipertensión arterial
Baja capacidad auditiva		Abortos espontáneos
Baja estatura		

(Tomada y Adaptada de Alamazán (2006) Manual para el manejo ambientalmente responsable de Plomo. Cámara Minera de México)

Figura 2-4: Modelo cinético de exposición al Plomo en niños



(Tomado y adaptado de Services (2007) Toxicological Profile for Lead. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.

El modelo consta de tres submodelos. El primero es el modelo de exposición, en el que se calcula la ingesta diaria media de Plomo en (mg/día) para cada concentración de exposición de Plomo en el aire, dieta, polvo, tierra, agua. El modelo de exposición simula la ingesta de Plomo (mg/día) durante exposiciones introducidas de Plomo en aire (mg/m^3), agua (mg/l), el polvo en el suelo (mg/g) o la dieta (g/día). La suma de los medios de exposición (dieta, agua potable, polvo) determinan la ingesta total en el tracto gastrointestinal.

El segundo es el modelo de captación de Plomo que convierte las tasas de ingesta de Plomo en tasa específica promediada en el tiempo de absorción (g/día) en el

compartimento central que es el compartimento sanguíneo. Este modelo asume por ejemplo que el 32% del Plomo inhalado es absorbido.

El tercer modelo que simula la transferencia de Plomo absorbido entre la sangre y los tejidos hacia el proceso de eliminación por medio de la orina, las heces, la piel, el cabello y las uñas. Este modelo incluye un compartimento central, seis compartimentos periféricos y tres reservorios de eliminación.

Para realizar la medición de dichos daños, algunos estudios han realizado la medición del Coeficiente Intelectual CI, para comprobar el efecto que tiene la intoxicación de este metal con el desempeño neuroconductual. Como resultado de dichos estudios se llega a la conclusión que se presenta un menor rendimiento escolar y un menor desarrollo intelectual. (Azcona-cruz et al., 2000)

Se han medido también efectos sobre la sensibilidad auditiva, equilibrio y habilidad motora. Se encontraron entonces deficiencias que interfieren notablemente en la adaptación del niño a realizar actividades diarias como correr, lanzar, trazar, hacer caligrafía, oír, entre otras. (Azcona-cruz et al., 2000)

Algunos autores aseguran que la edad se convierte en un factor de riesgo para la exposición de Plomo, empezando al año de vida y llegando a un pico de mayor riesgo a los 18 – 24 meses. (Ascione, 2001) Se debe determinar el tipo de fuente a la cual se encuentra expuesto el niño, ya sea una fuente industrial (producción de baterías, fundición de piezas de baterías, reciclaje, etc.), ambiental (Estudios han demostrado que se puede tener exposición importante viviendo a un kilómetro de área del lugar donde realizan fundiciones), domestica (recipientes de cerámica mal terminados, pinturas, etc.). (Azcona-cruz et al., 2000)

Para el Centro de Control y la Prevención de Enfermedades CDC, al menos 4 millones de hogares en el mundo tienen niños que están siendo expuestos a Plomo. Este organismo manifiesta que se deben tomar acciones de salud pública cuando estos niños presenten concentraciones en sangre mayores a 5 microgramos por decilitro (µg / dl). (CDC, 2015)

La aparición y manifestación de los signos y síntomas en el niño dependerá de la edad del paciente, del tiempo de exposición y de la concentración de Plomo en sangre. En una exposición aguda, frecuentemente debida a ingestión de alimentos contaminados o a inhalación masiva de vapores de Plomo, el niño presenta encefalopatía aguda, precedida de cólicos abdominales o alteraciones en la conducta. (Ascione, 2001) En la exposición crónica o saturnismo, los signos y síntomas suelen ser inespecíficos afectando al sistema nervioso, gastrointestinal, renal, hematopoyético y neuromuscular. (Ascione, 2001)

Para evidenciar los efectos a la exposición se solicita la realización del examen de Protoporfirina libre eritrocitaria en sangre y el Ácido Aminolevulínico en orina. Otros exámenes incluyen: hemograma con lámina, metabolismo del hierro, examen de orina, función renal y radiografía de huesos largos. (Ascione, 2001)

2.1.6. **Tratamiento** (Markowitz, 2003)

El Plomo tiene una vida media de aproximadamente 7 semanas en sangre y de aproximadamente 10 a 20 años en el hueso. La mayoría de los intoxicados por Plomo, este metal se almacena en los huesos. (Valdivia, 2005)

La terapia de tratamiento empieza con la eliminación a la exposición ambiental, modificación de las actividades mano boca, administración de suplementos nutricionales y por último tratamiento con medicamentos que estimulen la excreción de Plomo.

Para realizar un correcto tratamiento se debe erradicar las fuentes de exposición a Plomo, aunque desafortunadamente las fuentes son bastantes. Se realiza un ajuste a la dieta, por lo que se realiza un complemento nutricional con la ingesta de elementos esenciales como calcio y hierro. Se ha encontrado que la intoxicación neuronal con Plomo puede ser mayor si existe una deficiencia de hierro. Para niños mayores de un año la ingesta de un gramo de calcio debería ser suficiente.

Para la terapia de quelación del Plomo se utiliza EDTA de Calcio o Sódico, Dimercaptol (BAL), pero el de mayor frecuencia utilizado en niños es el Ácido Dimercaptosuccinico (DMSA). (Valdivia, 2005)

2.1.7. **Biomarcadores**

Un Biomarcador se define como la presencia de un xenobiótico o los metabolitos que resulten de su Biotransformación en un fluido biológico y/o las alteraciones en el sistema biológico provocadas por la exposición a ese xenobiótico, entre los que encontramos cambios a nivel celular o bioquímico y estructural. Estos son cuantificables en el sistema o en una muestra. (Hernández, 2000)(Ramírez, 2006)

Los tres Biomarcadores más usados para evaluar el impacto sobre el sistema biológico son Biomarcadores de exposición, Biomarcadores de efecto y Biomarcadores de susceptibilidad. (Tellez & Bautista, 2005)

- **Biomarcadores de exposición**

Este Biomarcador valora la dosis interna de la sustancia exógena o subproductos de biotransformación en medios biológicos (Células, tejidos, fluidos corporales), cuantificándolo en el organismo. (Ramírez, 2006)(Tellez & Bautista, 2005)

Para la determinación de exposición de Plomo tenemos los biomarcadores de plumbemia (concentración de Plomo en sangre), plumburia (concentración de Plomo en orina), determinación de Plomo en hueso. Otros no son tan comúnmente utilizados como son determinación de Plomo en cabello, uñas y semen. (Nordberg et al., 2007) (Tellez & Bautista, 2005)(Ramírez, 2006)

- **Biomarcadores de efecto**

Este biomarcador refleja la interacción de la sustancia exógena con los receptores biológicos, manifestados en alteraciones bioquímicas, fisiológicas, y de comportamiento. Estas alteraciones son previas al daño estructural y su adecuada detección permite la identificación precoz de exposiciones excesivas y permite tomar medidas preventivas. (Tellez & Bautista, 2005)(Ramírez, 2006) Estos biomarcadores pueden ser específicos o no específicos. Los primeros se utilizan para indicar el efecto biológico de una exposición

concreta, es decir, aportan datos que son valiosos para la prevención. Los biomarcadores no específicos no indican una causa individual del efecto, pero estos reflejan el efecto total debido a una exposición combinada.(Silbergeld, et al., 2010.)

Dentro de los biomarcadores de efecto para Plomo se tienen niveles de Zinc Protoporfirina Eritrocitaria (ZPP), niveles de Acido Delta Amino Levulínico (ALA) en orina, niveles de actividad de la Acido Delta Aminolevulínico Deshidratasa (ALAD). (Abadin et al, 2007) Como biomarcador de efecto no específico encontramos el hemograma con frotis periférico, BUN, creatinina y análisis de orina. (Díaz, 2011)

- ## Biomarcadores de susceptibilidad

Este biomarcador refleja la habilidad innata o adquirida de un organismo para responder ante la exposición a una sustancia o sus metabolitos. Con estos biomarcadores se puede detectar organismos con diferencias adquiridas o genéticas que los hace más susceptibles a la exposición y por consecuencia adquieren la enfermedad. (Tellez & Bautista, 2005)

El monitoreo biológico supone entonces cuatro características (Ramírez, 2006):

1. El xenobiótico o sus metabolitos deben estar presentes en algún tejido, excreción o fluido corporal con un nivel óptimo para su medición.
2. El método analítico para el análisis de la muestra sea validado y práctico.
3. La estrategia de medición sea adecuada y representativa en el tiempo.
4. Los resultados obtenidos sean correctamente interpretados.

Por esta razón, los Biomarcadores que se deciden evaluar en una población expuesta, van a variar acorde al tiempo y duración de la exposición, características fisiológicas de los individuos, susceptibilidad genética lo cual se verá reflejado finalmente en el efecto del Xenobiótico en el individuo. Es por esta razón que los valores de Plomo en sangre obtenidos en este estudio estarán afectados por condiciones ambientales de lugar de residencia y lugar de estudio (lugares de mayor permanencia de los menores), tiempo y duración de exposición al plomo; susceptibilidad del menor, etc.

2.1.8. **Plomo en sangre**

Como se revisó anteriormente, para determinar el nivel de exposición al Plomo se pueden utilizar diferentes marcadores biológicos, entre los que encontramos sangre venosa y capilar, orina, dientes, huesos y cabello. La sangre refleja la exposición reciente, por ende el marcador biológico más usado.

La mayoría de la información que se encuentra sobre la exposición a Plomo en seres humanos se realizó por medio de la determinación de la concentración de este metal en sangre.(Nordberg et al., 2007.) Es decir que un estudio realizado en esta matriz puede perfectamente relacionarse fácilmente con otros estudios realizados en otras partes del mundo.

Actualmente se puede determinar la concentración de Plomo en sangre, por espectroscopia de absorción atómica con horno de grafito y Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS).

La determinación de las concentraciones de Plomo en sangre se realizan en su mayoría por Espectroscopia de Absorción Atómica EAA.(World Health Organization International Agency for Research on Cancer IARC, 2006) Cuando se realice el análisis de Plomo por este método generalmente las concentraciones se reportan en µg/dL, que puede ser convertida a µM (µmol/L) dividiendo el valor reportado por 20.7.

Los métodos analíticos utilizados para determinar las concentraciones de Plomo en la sangre detectan tanto el Plomo asociado a proteínas en los eritrocitos, como el Plomo en el plasma. (World Health Organization International Agency for Research on Cancer IARC, 2006) El Plomo en sangre total esta en equilibrio entre el plasma y los eritrocitos.

Los métodos analíticos se deben actualizar a medida que las normas y directrices de los niveles máximos permitidos cambien. Es como vemos que el Centro para el Control y prevención de enfermedades (CDC) de los Estados Unidos ha reducido los niveles para intervención en adultos de 60 µg / dL a 35 µg / dL en 1975, en 1985 a 25 µg / dL, en 1991 a 10 µg / dL. Ahora en el 2015 ha encontrado una disminución de la función renal asociada con niveles de Plomo sanguíneo de 5 µg / dL y menor, y un mayor riesgo de

hipertensión y temblor a niveles de Plomo por debajo de 10 µg / dL. (CDC, 2015) (World Health Organization International Agency for Research on Cancer IARC, 2006)

2.2. Validación

Se define validación de un método analítico como la reunión de una serie de ensayos que permiten demostrar científicamente que el método analítico cumple con los parámetros y características de uso necesarias en el laboratorio, es decir, demuestran que el método es idóneo para el uso previsto. (Duffau et al., 2010) El objetivo de la validación de un método bioanalítico es demostrar la fiabilidad del método para la determinación de la concentración de la analito analizado en determinada matriz biológica.

La validación de un método bioanalítico es un paso fundamental para asegurar que los resultados entregados por el método son confiables .El objetivo principal de la realización de la validación del método por parte del Laboratorio, es determinar con fundamentos estadísticos que el método es adecuado para el análisis previsto. (Duffau et al., 2010)

Los métodos bioanalíticos son métodos que se utilizan para la determinación de sustancias como drogas, medicamentos, tóxicos y sus metabolitos en matrices biológicas, como son plasma, orina o tejidos entre otros.

Los métodos bioanalíticos son utilizados en farmacología clínica, bioequivalencia, toxicología y demás estudios que requieren una evaluación farmacocinética o toxicocinética de la aplicación de un fármaco o sustancia tóxica. (Swartz & Krull, 2012)

La validación de un método bioanalítico es compleja por la naturaleza de las matrices allí trabajadas, y por las concentraciones de los analitos (Fármaco, metabolitos, tóxicos) analizados.

Por lo anterior es de suma importancia la realización de la validación del métodos bioanalíticos para generar informes de resultados confiables y cumpliendo con lo establecido en normas y manuales de calidad, con pruebas interlaboratorio y calidad.

2.2.1. Parámetros de validación.

Los parámetros que se deben tener en cuenta para una validación de método bionalitico son los siguientes:

- **Selectividad**

La selectividad del método bioanalitico demuestra que el analito puede ser medido sin lugar a error en presencia de interferencias potenciales provenientes de componentes de la muestra (incluyendo la matriz). Las interferencias pueden ser tomadas de componentes endógenos de la matriz (proteínas, lípidos, etc), metabolitos, productos de degradación, medicamentos. (Swartz & Krull, 2012)

Normalmente la ausencia de interferentes es aceptada cuando la respuesta es menor del 20% del límite bajo de cuantificación.(EMEA/CHMP/EWP, 2012)

La guía de la FDA recomienda el análisis de 6 muestras blanco de la matriz biológica de seis diferentes fuentes. (FDA, 2011)

- **Exactitud**

La exactitud del método bioanalitico se define como la cercanía de los resultados obtenidos por el ensayo y los valores determinados como verdaderos, con réplicas del análisis de muestras que contienen el analito de interés en concentración conocida. El resultado se reporta como la desviación del valor verdadero. (Swartz & Krull, 2012) (EMEA/CHMP/EWP, 2012) La exactitud debe ser medida utilizando un mínimo de cinco determinaciones por concentración. Se recomienda un mínimo de tres concentraciones en el intervalo de concentraciones esperadas. El valor medio debe estar dentro del 15% del valor real, excepto en Límite inferior de cuantificación, donde no debe desviarse más de un 20%. La diferencia entre la media del valor real sirve como medida de precisión. (FDA, 2011)

- **Precisión**

La precisión del método Bioanalítico expresa la cercanía de las medidas individuales de un analito cuando el procedimiento analítico se aplica repetidamente. (EMEA/CHMP/EWP, 2012) La precisión se determina mediante análisis repetidos de las muestras que contienen cantidades conocidas del analito. (FDA, 2011)

La precisión se puede demostrar para el limite bajo de cuantificación LLOQ, nivel bajo, nivel medio y el nivel alto, entre una corrida de análisis o diferentes corridas de análisis. (EMEA/CHMP/EWP, 2012)

La precisión se determina mediante el coeficiente de variación (CV) ó como la desviación estándar relativa (RSD) de las medidas.(ICH, 2005)(EMEA/CHMP/EWP, 2012)

La precisión se subdivide en intraserial, precisión intra-ensayo o de repetición, que evalúa la precisión durante una sola serie de análisis, y entre las corridas de análisis, la precisión inter o lotes de repetición, que mide precisión con el tiempo. (FDA, 2011)

La precisión se evalúa como repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. (ICH, 2005)

Repetibilidad

La Repetibilidad del método bioanalítico se expresa como la precisión bajo las mismas condiciones de operación del método en un periodo corto de tiempo. Esta se llama también precisión intra ensayo. (ICH, 2005)

Precisión intermedia

La precisión intermedia del método se realiza con pequeñas variaciones dentro del laboratorio: Diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos, etc. (ICH, 2005)

Reproducibilidad

La reproducibilidad de un método bioanalítico expresa la precisión entre laboratorios (estudios colaborativos, usualmente aplicados a la estandarización de la metodología). (ICH, 2005).

- **Recuperación**

La recuperación del método bioanalitico es el cociente que resulta de la relación entre la cantidad de analito medida y el contenido en la muestra. El ensayo de recuperación puede ser tomado en tres concentraciones (baja, media y alta). (Swartz & Krull, 2012)

La recuperación permite observar el rendimiento de un método analítico en cuanto al proceso de extracción y se encuentra relacionada intrínsecamente con las características de la matriz .(Duffau et al., 2010)

La recuperación debe ser reproducible para cada concentración y algunos autores especifican que para métodos bioanalíticos debe ser mayor al 50% (Peters et al., 2007) (Mariño, 2013)

- **Curva de calibración – Linealidad**

Una curva de calibración o curva de estándares ilustra la relación existente entre la respuesta instrumental y la concentración conocida del analito. (Swartz & Krull, 2012)

Un suficiente número de estándares debería ser generada para cada analito en la muestra. Un número suficiente de estándares se definen en relación a la concentración esperada del analito y la respuesta del instrumento. La curva de calibración debe conformarse por una muestra blanco (muestra de la matriz procesada), y de seis a ocho muestras que cubren el rango de respuesta esperado. (FDA, 2001)

Al nivel más bajo de la curva se le llama límite inferior de cuantificación (LLOQ) y el nivel más alto de la curva se le llama límite superior de cuantificación (ULOQ). Cada uno de ellos de los puntos debe ser analizado en replica. (EMEA/CHMP/EWP, 2012)

El LLOQ se aceptara únicamente si cumple con las siguientes características: (Swartz & Krull, 2012)(EMEA/CHMP/EWP, 2012)

1. La respuesta del analito debe ser mayor de 5 veces la respuesta del blanco.
2. La respuesta del analito debe ser identificable, reproducible, con una precisión de 20% y una exactitud de 80-120%.

Al menos cuatro de los seis estándares distintos de cero deben cumplir con los criterios anteriores, incluyendo el Límite inferior de cuantificación y el estándar de calibración a la mayor concentración. (FDA, 2001)

- **Limites**

Límite de detección LOD

El límite de detección del método bioanalítico se define como la concentración o cantidad de analito en la matriz, que se puede detectar con la aplicación del método pero no necesariamente cuantificar. (ICH, 2005)

Límite inferior de cuantificación LLOQ

Es nivel más bajo de la curva de calibración y se le llama límite inferior de cuantificación (LLOQ). Debe ser analizado con sus réplicas. (EMEA/CHMP/EWP, 2012)

Límite superior de cuantificación ULOQ

Es nivel más alto de la curva de calibración y se le llama límite superior de cuantificación (ULOQ). Debe ser analizado con sus réplicas. (EMEA/CHMP/EWP, 2012)

- **Estabilidad**

La estabilidad nos permite determinar que la concentración del analito no se afecta con los pasos propios en el laboratorio. (Swartz & Krull, 2012)

La evaluación de la estabilidad debe llevarse a cabo para asegurar que cada paso durante la preparación de muestras y análisis de muestras, así como las condiciones de

almacenamiento usadas no afectan a la concentración del analito. (EMEA/CHMP/EWP, 2012)

En la estabilidad podemos evaluar, entre otras (EMEA/CHMP/EWP, 2012):

*La estabilidad del analito en la matriz cuando existe congelación y descongelación (condiciones de almacenamiento y condiciones de análisis).
*La estabilidad a corto plazo del analito a condiciones de procesamiento de la muestras.
*La estabilidad del analito a largo plazo cuando se almacena la matriz en el congelador.
*La estabilidad del analito en la fase de inyección.

- **Efecto matriz**

El efecto matriz evalúa si existe presencia de interferencias en la respuesta debido a la presencia de analitos no deseados para el análisis o de interferencias en la muestra. (FDA, 2001) Se evalúa mediante la comparación de la curva de estándares en la matriz biológica y la curva en solvente. (FDA, 2001)

- **Efecto memoria**

El efecto memoria, en inglés “carry over” debe tratarse y reducirse durante el desarrollo de la metodología bionalítica. (EMEA/CHMP/EWP, 2012)

Durante la validación debe evaluarse analizando muestras blanco despues de una muestra de concentración alta ó el estandar superior de cuantifiación ULOQ. Se acepta cuando se evalua esa concentración y no encuentra mas del 20% del límite de cuantificación del analito (LLOQ). (EMEA/CHMP/EWP, 2012)

2.3. Espectroscopía de Absorción Atómica

La espectroscopia atómica es la principal herramienta utilizada para la medición de metales a nivel de µg/mL, µg/L ó ng/L en los laboratorios de análisis ambiental o industrial. La medición se puede realizar por absorción o por emisión atómica. (Harris D., 2013) Tanto la espectrometría de Absorción Atómica y la espectrometría de Emisión Atómica fueron las primeras técnicas instrumentales utilizadas para el análisis elemental, siendo sus pioneros Bunsen y Kirchoff en el siglo XIX. (Gouglitz & Moore, 2014)

En 1955 Alan Walsh publicó el primer documento sobre absorción atómica mientras que Alkemade y Wilatz publican los resultados de sus experimentos en Espectroscopía de Absorción Atómica. Solo hasta los años sesenta, cuando se introdujo el Horno de Grafito y la técnica de Generador de Hidruros fue cuando se popularizó aún más la aplicabilidad de esta técnica. (Gouglitz & Moore, 2014)

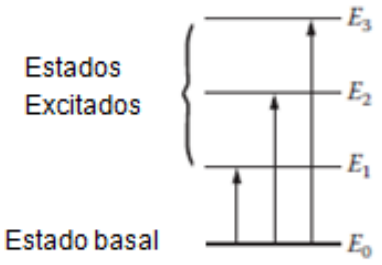
La base de la técnica es la absorción a longitudes de onda discretas de la luz por el cambio de los átomos en estado fundamental a átomos libres en fase gaseosa, que se forman a partir de la atomización de la muestra por las altas temperaturas. En los años 50 Alan Walsh contribuyó al desarrollo de la técnica y permitió convertirla en una herramienta analítica ampliamente utilizada. Esta técnica de análisis elemental puede proporcionar información cuantitativa de aproximadamente 70 elementos en casi cualquier tipo de muestra. (Robinson et al, 2014)

Esta técnica de análisis tiene una gran ventaja y es que el análisis del metal es independiente de la forma química del elemento. Es decir no importa el tipo de sal que esté conformando el metal, o si está en forma de complejo organometálico, esta técnica determinará la concentración total del metal. Otra ventaja que posee es que en la mayoría de las veces no es necesario separar el analito del resto de la muestra lo que facilita el análisis y elimina fuentes de error, no sin ello decir que no se presenten interferencias en el análisis (tanto interferencias químicas como espectrales). (Robinson et al, 2014)

La Espectroscopía de Absorción Atómica se basa en la absorción de la energía radiante por átomos que se encuentran libres en fase gaseosa. En el proceso de absorción, un tomo cambia de un estado de baja energía a un estado de energía más alto. Los átomos en fase gaseosa no vibran en el mismo sentido en que las moléculas lo hacen y no tienen energía de rotación, por lo que se concluye que no hay energía vibracional o rotacional implicada en la excitación electrónica de los átomos. (Robinson et al, 2014) (Gouglitz & Moore, 2014)

Cada elemento tiene un número específico de electrones situados en una estructura orbital que es única para cada elemento. La configuración electrónica más bajo de energía de un átomo se llama el estado fundamental. El estado fundamental es el estado electrónico más estable. Si la energía Δ E con la magnitud correcta es aplicada a un átomo en fase gaseosa libre, será absorbida. Un electrón exterior será promovido a una energía más alta, es decir a un nivel excitado menos estable. Las frecuencias y longitudes de onda de energía radiante capaz de ser absorbidas por un átomo se calculan por $\Delta E = h\nu = hc / \lambda$. La energía absorbida Δ E es la diferencia entre la energía en el estado más alto y la energía en el estado más bajo. (Robinson et al, 2014) (Gouglitz & Moore, 2014)

Figura 2-5: Esquema de niveles electrónicos de energía en un átomo



Tomado de Robinson J, Skelly E, Frame G. Undergraduate Instrumental Analisis. CRC Press. 2014

Cuando los átomos se encuentran libres por medio de un sistema atomizador que puede ser la llama del equipo ó el horno de grafito calentado eléctricamente, pueden absorber la radiación a una longitud de onda específica para cada elemento, emitida por una fuente que en este caso es una lámpara de cátodo hueco. Entonces la luz emitida por esta fuente, a una longitud de onda específica, será absorbida por el vapor atómico del elemento. (Robinson et al, 2014)

La configuración típica de un equipo de absorción atómica consta de una fuente de luz, usualmente denominada lámpara, un atomizador (quemador o llama), un monocromador y un detector con su respectivo amplificador y registrador. En el caso de un equipo de Absorción Atómica con Horno de Grafito, existe la cámara de atomización-horno de grafito, como se evidencia en la figura 2-6. (Robinson et al, 2014) (Gouglitz & Moore, 2014)

Figura 2-6: Esquema simple de Espectrofotómetro Absorción Atómica con Horno de Grafito

Fuente de radiación:

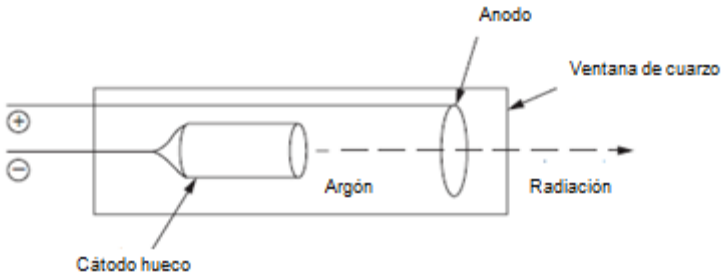
Para los métodos ópticos basados en absorción, se debe considerar una fuente de radiación que emita una línea específica que corresponda a la necesaria para efectuar la transición electrónica en los átomos del elemento a analizar. (Gouglitz & Moore, 2014)
La anchura de las líneas elementales es del orden de 0.002nm cuando se observa por Espectroscopía de emisión con llama o atomización electrotérmica.

Una de las fuentes más comúnmente utilizadas son las Lámparas de Cátodo Hueco (LCH ó HCL (Hollow Cathode Lamp). Son cilindros de vidrio sellado al vacío y con un gas inerte en su interior. El metal usado para el cátodo es el metal cuyo espectro será emitido por la lámpara. El cátodo y el ánodo se sellan en un cilindro de vidrio con un gas inerte (Argón o Neón) a baja presión. Una ventana de cuarzo sella el extremo de la lámpara (para metales que tienen líneas de emisión y absorción en el UV). Los átomos del gas de relleno son ionizados en el ánodo y se sienten atraídos y acelerados en el cátodo. Los iones golpean la superficie del cátodo y desalojan físicamente algunos átomos del metal de la superficie (“sputtering”). Los átomos desplazados son excitados

por la colisión con electrones y emiten el espectro característico de emisión atómica del metal utilizado para hacer el cátodo. (Robinson et al, 2014)

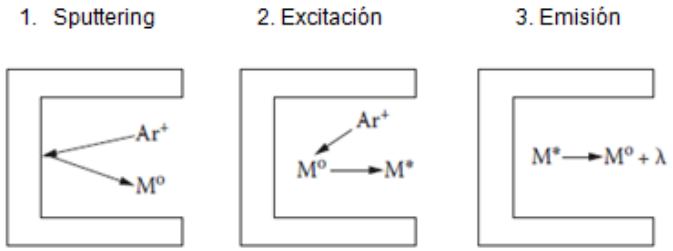
Dentro de este mismo cilindro se encuentran dos filamentos; uno de ellos es el cátodo y el otro el ánodo. El ánodo generalmente es un alambre grueso hecho de níquel o tungsteno, el cátodo es en forma de un cilindro hueco, en el interior del cual se encuentra depositado en forma de una capa el elemento metálico que se va a excitar. También regularmente y cuando esto es posible el cátodo está enteramente hecho del metal a analizar. (Harris D., 2013)

Figura 2-7: Esquema de Lámpara de Cátodo hueco



Adaptado y tomado de Undergarduate Instrumental Analysis 7ª edición

Figura 2-8: Proceso en la Lámpara de Cátodo Hueco.



Adaptado y tomado de Undergarduate Instrumental Analysis 7ª edición

(Ar $^{+}$ ion con carga positiva de Argón)
(M^0 Estado fundamental del átomo metálico)
(M^* átomo excitado del metal)
(λ Longitud de onda de emisión de la radiación característica del metal)

Cada lámpara de cátodo hueco emite el espectro del metal usado en el cátodo, por esta razón se debe usar una lámpara específica para cada elemento a determinar, aunque existen lámparas multielementos. (Robinson et al, 2014)

Atomizador

Los dos métodos más comúnmente utilizados para la producción de los átomos en estado gaseoso utilizan la energía térmica para vaporizar y atomizar el analito. (Gouglitz & Moore, 2014)

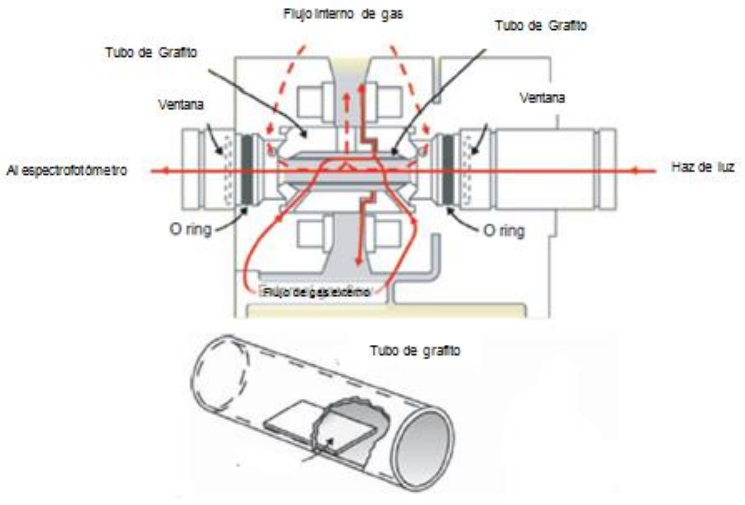
En el caso de Horno de Grafito se usa un atomizador Electrotérmico. A finales de los años 50, L´vov hizo los primeros experimentos utilizando horno de grafito para atomización en Absorción Atómica. (Gouglitz & Moore, 2014) (Lajunen, 1992).

Un ciclo de análisis comprende las siguientes etapas:

1. La muestra se introduce en frío.
2. El disolvente se evapora a temperaturas alrededor de 100 °C.
3. La muestra se incinera y cualquier constituyente volátil de la muestra es removido al mantener la muestra entre 450-900 °C.
4. La temperatura se incrementa rápidamente a 2000-3000 °C en un intervalo muy corto para vaporizar y atomizar la muestra.

Este ciclo se realiza alrededor de 1 minuto debido al calentamiento rápido y con corrientes por encima de 400 A y un voltaje en el orden de 8 V. (Gouglitz & Moore, 2014)

Figura 2-9: Corte transversal de horno de grafito y gráfico de horno de grafito con plataforma L´vov insertada.



Tomado de Handbook of Spextroscopy 4.

El tubo de grafito tiene una forma cilíndrica, abierto por ambos extremos, con una longitud aproximada de 18 a 28 mm y un diámetro interno de 6 a 10 mm. En su centro tiene un pequeño agujero por el cual la muestra se introduce automáticamente. En sus extremos el tubo de grafito es encajado en un par de electrodos de grafito que son refrigerados por el paso de una corriente de agua. Todo el horno se purga con Argón de alta calidad para excluir el aire en el tubo de grafito y así evitar su incineración a altas temperaturas. También el gas Argón va desde los extremos del tubo hacia el centro para purgar los vapores generados por la matriz en el proceso de vaporización y calcinación. El gas Argón tiene una transparencia óptica en la región UV que facilita la detección de elementos en longitudes de onda corta. De igual forma se deben reemplazar rutinariamente después de aproximadamente 100 análisis. (Robinson et al, 2014) (Gouglitz & Moore, 2014)

Esta técnica ofrece una mejor sensibilidad comparada con llama, pues toda la muestra se atomiza y la concentración de átomos libres es alta y se encuentra condensado en el espacio del tubo de grafito. (Gouglitz & Moore, 2014)

Cuando se realiza calentamiento eléctrico, aporta mayor sensibilidad y requiere menor cantidad de muestra, comparado con la espectroscopia de llama. Entre 1 y 100 μL de muestra es inyectado por un agujero en el centro del horno. La máxima temperatura recomendada para un horno de grafito es 2550ºC por no más de 7 segundos. Utilizar Argón sobre el grafito ayuda a prevenir la oxidación.

El horno de grafito tiene alta sensibilidad ya que confina los átomos de la muestra en el camino del haz de luz por varios segundos. En el horno de grafito se requiere solamente décimas de microlitro por las razones expuestas anteriormente. (Harris, 2001)

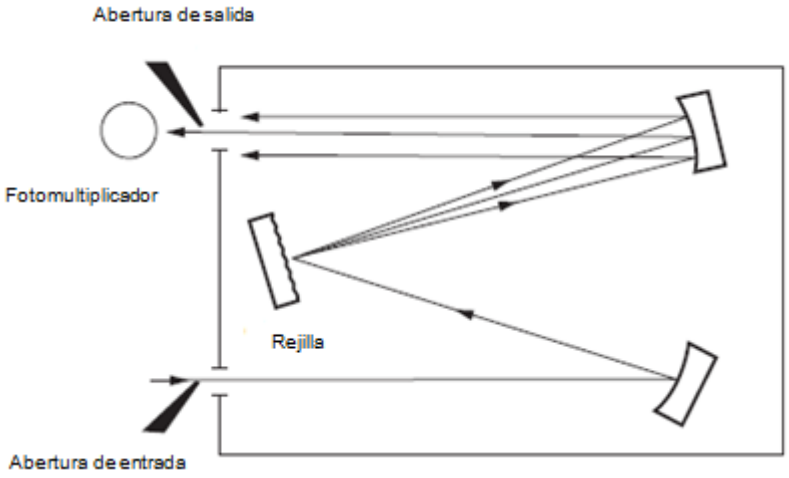
Con la etapa de secado, se evapora cuidadosamente el disolvente de la muestra. Después de esta etapa la temperatura de horno aumenta, en un intervalo de 400 a 800 °C, llamándose esta etapa calcinación, donde los componentes orgánicos (grasas y aceites) presentes en la matriz se carbonizan. En esta etapa se ayudan a reducir las interferencias. Finalmente la temperatura del horno aumenta rápidamente, puede llegar hasta 2700 °C, donde se volatilizan las sustancias inorgánicas y metálicas. Una vez volatilizado se genera una nube de vapor atómico, que se mide mediante la absorbancia y que cumple con las normas de la Ley de Beer-Lamber. (Harris, 2013)

Se recomienda que exista un sistema de ventilación encima del quemador o del horno para succionar los humos generados por el vapor de la llama y los generados desde el horno. Esta ventilación protege al personal que realiza los análisis, de los vapores tóxicos generados por los metales.

Monocromador

Se requiere un monocromador para separar las líneas de absorción de interés de otras líneas espectrales emitida desde la Lámpara de Cátodo Hueco y de otros elementos en el atomizador que también están emitiendo sus espectros. Debido a que la fuente de radiación produce líneas estrechas, la interferencia espectral no es común. Por lo tanto el monocromador no necesita ser de alta resolución. (Robinson et al, 2014).

Figura 2-10: Estructura típica de un monocromador.



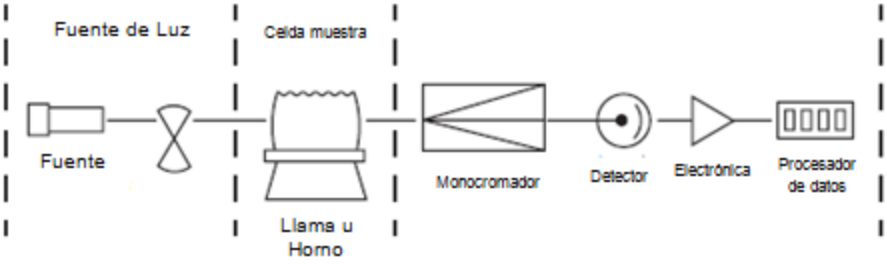
Tomado de Undergarduate Instrumental Analysis 7ª edición

El elemento de dispersión más comúnmente usado en Absorción Atómica es una rejilla de difracción. La rejilla dispersa diferentes longitudes de onda de luz a diferentes ángulos. La rejilla puede girar para seleccionar la longitud de onda que va a pasar a través de la rendija de salida al detector. Todas las demás longitudes de onda son bloqueadas y no llegan al detector. (Robinson et al, 2014)

Configuración óptica

El espectrofotómetro se puede configurar como un sistema de un solo haz o como un sistema de doble haz.

Figura 2-11: Sistema Básico de espectrofotómetro de un solo haz.



Tomado de Undergarduate Instrumental Analysis 7ª edición

A diferencia de un equipo de UV/VIS, la celda de la muestra se coloca en frente del monocromador. (Robinson et al, 2014).

Detectores

El detector más comúnmente utilizado es el tubo fotomultiplicador. Muchos sistemas pequeños, particularmente los dedicados a un elemento, como por ejemplo el analizador de mercurio, utilizan detectores de estado sólido en lugar de fotomultiplicadores. (Robinson et al, 2014)

En absorción atómica se requiere realizar corrección de background o corrección de línea base, independiente que el análisis se realice directamente sobre la llama o con horno de grafito, ya que los componentes de la matriz pueden absorber en la misma longitud de onda del metal que se está analizando.

Interferencias espectrales

Existen dos tipos de interferencias en Absorción Atómica, la interferencia espectral y la interferencia química. (Gouglitz & Moore, 2014) La interferencia Espectral es el resultado de la absorción de una especie de interferencia que bien se solapa con la señal de interés o se encuentra tan cerca de esta señal que el monocromador no la puede resolver y pueden ser hasta cierto punto eliminadas por los diseños instrumentales y los

procedimientos analíticos. La interferencia química puede resultar como consecuencia de diversos procesos químicos que se generan durante la atomización y alteran considerablemente las características de absorción del analito. (Gouglitz & Moore, 2014)

Origen de las interferencias espectrales

Como las líneas de emisión de la lámpara de Cátodo Hueco son muy estrechas, la interferencia producida por la superposición de las líneas es bastante improbable. La separación entre dos líneas espectrales tendría que ser inferior a 0,01 nm para que una interferencia se produzca. Por ejemplo, la línea de absorción del Vanadio en 308,211 nm interfiere en el análisis de aluminio a 308,215 nm. Para su análisis una alternativa es llevar a cabo la medición a una diferente línea de absorción del aluminio, por ejemplo, en 309,270 nm. Las interferencias espectrales también pueden resultar de los subproductos de combustión que exhiben la absorción de banda ancha o las partículas, lo que provoca la dispersión de la radiación incidente. Se genera una situación complicada si la absorción o dispersión surge de un producto asociado con la muestra o su matriz. Por ejemplo, una línea de absorción elemental puede ser interferida por una línea molecular de absorción de productos de reacción de elementos que coexisten en la muestra. En el caso de la determinación de Bario en presencia de Calcio, la línea de absorción elemental en 553,6nm puede ser solapada por una amplia banda de absorción en el rango de 548,0-558,0 nm de Ca(OH). En muchos casos, tal interferencia puede ser eliminada mediante la sustitución de de aire por el óxido nitroso como oxidante. (Gouglitz & Moore, 2014)

Interferencia química:

La interferencia química se produce cuando algún componente químico en la muestra afecta a la eficacia de atomización de la muestra en comparación con la solución estándar. El resultado es o bien un aumento o una depresión en la señal de analito de la muestra en comparación con la del estándar. Este efecto es más comúnmente asociado con los aniones predominantes presentes en la muestra. El anión afecta a la estabilidad del compuesto metálico a la que el analito se une, y esto a su vez, afecta a la eficiencia con la que el atomizador produce átomos del metal. Por ejemplo, una solución de Cloruro de Calcio, cuando es atomizado en una mezcla aire-acetileno, se descompone en

átomos de Calcio más fácilmente que una solución de Fosfato de Calcio. El Fosfato de Calcio es más estable térmicamente que el Cloruro de Calcio. Una solución de Cloruro de Calcio que contiene 10 ppm de Calcio dará una absorbancia mayor que una solución de Fosfato de Calcio que contiene 10 ppm Calcio. Si se añade ion Fosfato a una solución de Cloruro de Calcio, la absorbancia debido a Calcio disminuirá a medida que aumenta la concentración de fosfato. Se trata de una interferencia química. Se produce en el proceso de atomización. (Robinson et al, 2014)

La interferencia química es un resultado de tener energía insuficiente en la llama u horno para romper los enlaces químicos en las moléculas y formar átomos libres. (Robinson et al, 2014) Para compensarla se puede tener el mismo anión en la misma concentración tanto en estándares como muestras, añadir otro ion metálico que forme un compuesto más estable con el anión de interferencia ó eliminar la interferencia química por el cambio de la temperatura si es posible. (Robinson et al, 2014)

Modificador químico

La modificación química, también comúnmente llamada modificación de la matriz, es la adición de uno o más reactivos al tubo de grafito junto con la muestra. Se emplean estos modificadores químicos para controlar interferencias no espectrales mediante la alteración química que ocurre en el interior del horno. Los reactivos se eligen para mejorar la volatilidad de la matriz o para disminuir la volatilidad del analito o para modificar la superficie del atomizador. El uso de una gran cantidad de modificador químico puede, por ejemplo, convertir todo el analito en un único compuesto con propiedades bien definidas. (Robinson et al, 2014) La utilización de los modificadores químicos tiene como fin mejorar la exactitud y precisión del análisis permitiendo el uso de más alta temperatura de pirolisis, lo que permite la eliminación de la matriz sin pérdida de analito.

La intoxicación por Plomo es un caso notable en el avance de la analítica clínica, pues evidencia día a día las mejoras en las metodologías analíticas, para la determinación infalible de este metal. (Parson & Barbosa, 2007)

Durante la década de 1970, el CDC establece como límite por intoxicación con Plomo para la población pediátrica, niveles de concentración en sangre mayor de ≥40 µg / dL, unido a la sintomatología. Desde que se usa la matriz sangre para su análisis, se le ha atribuido mejoras en los programas de vigilancia y salud pública. En el año de 1978 se redujo el nivel de concentración máxima a 30 µg /dL y en 1985 a 25 µg / dL en 1985. Esta reducción en los niveles de concentración permitió la introducción de instrumentos de Absorción Atómica con Horno de Grafito más modernos que permitieran obtener resultados analíticos de mejor calidad. (Parson & Barbosa, 2007)

En la actualidad los niveles buscados no deben ser superiores a 5 µg / dL, lo que ha generado mejoras en los equipos con lo que se cuenta en la actualidad.

2.4. Incertidumbre de la medición

Según el Vocabulario Internacional de Metrología VIM 200:2008, la incertidumbre se define como "*el parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de la cantidad de valores que se atribuyen a un mensurando*". Es decir, la incertidumbre es el parámetro que se asocia al resultado de una medición y que contempla la dispersión de los valores.

Para la estimación de la incertidumbre dentro del laboratorio, es necesario contemplar las diferentes fuentes que pueden aportar a este valor.

Entre algunas fuentes se tienen:

a. Muestreo
b. Efectos de la muestra
c. Pureza y tipo de reactivo
d. Analista
e. Condiciones de medición

Se encuentran dos tipos de incertidumbre, incertidumbre estándar, la incertidumbre tipo A, la incertidumbre tipo B, incertidumbre combinada, incertidumbre expandida. (Duffau et al., 2010)

La incertidumbre estándar u(x) se define como la incertidumbre que resulta de una medición que se ha expresado como desviación estándar.

La evaluación de la incertidumbre Tipo A se hace por medio de un análisis estadístico de una serie de observaciones. Ejemplo: Cuando se realiza una repetibilidad en un análisis.

La evaluación de la incertidumbre Tipo B se hace mediante otro medio que no sea el estadístico de una serie de observaciones. Ejemplo: Cuando se determina mediante los certificados de calibración de los instrumentos utilizados para realizar la medición.

Incertidumbre estándar combinada es el resultado de tomar la raíz cuadrada positiva de la suma de diferentes términos.

La incertidumbre expandida se define como el intervalo de una medición, donde se espera que se abarque la mayor cantidad de valores que puedan atribuirse al mesurando. Para ello se multiplica la incertidumbre estándar por un factor de cobertura K=2, que nos da un nivel de confianza del 95%.

3. Justificación y Planteamiento del Problema

El principal riesgo del Plomo es su toxicidad. (Nordberg et al., 2007). Según la Organización Mundial de la Salud se estima que la exposición a este metal genera 143.000 muertes anuales, es decir, este metal es el responsable del 0,6% de la morbilidad mundial. (OMS, 2013)

El diagnóstico clínico juega un papel fundamental y crucial al momento de establecer la existencia de una intoxicación por plomo, pues en la mayoría de los casos no se puede establecer antecedentes a la exposición y los signos clínicos son en la mayoría inespecíficos. (OMS, 2013) Es por esto que el análisis de plomo en sangre brinda la posibilidad al cuerpo médico de realizar un tratamiento oportuno y evaluar por ejemplo una exposición ambiental u ocupacional. (OMS, 2013)

El análisis de plomo en sangre se puede realizar por diferentes métodos de laboratorio entre los que se tiene la Espectrometría de Absorción Atómica con ionización de llama, Espectrometría de Absorción Atómica con ionización electrotérmica (Horno de Grafito), Voltamperometría de redisolución anódica, ICP MS Plasma Inductivo Acoplado con Espectrometría de Masas. (OMS, 2013) (Gouglitz & Moore, 2014) Cada uno de ellos difieren en su capacidad analítica (Límites de detección, costo del análisis, etc.) y requisitos técnicos (preparación de muestras, entrenamiento del personal, reactivos, etc.).

Existen algunos laboratorios reconocidos en Colombia que realizan el análisis de Plomo en Sangre, entre los que encontramos el Laboratorio de Salud Ambiental del Instituto Nacional de salud que desde el año 1995 empezó a impulsar estudios de investigación sobre contaminantes ambientales en la población colombiana, dentro de los que se

encuentran los metales pesados como son el plomo, mercurio cromo, cobre, etc. (Instituto Nacional de Salud, 2012) y el laboratorio de Toxicología de la Secretaria de Salud de Bogotá que realiza análisis de niveles sanguíneos de plomo por Absorción Atómica con Horno de Grafito, además de contar con otras metodologías y técnicas validadas para análisis de otros metales en diferentes matrices biológicas.

El Laboratorio de Toxicología de la Universidad Nacional de Colombia busca ofrecer a la población Colombiana diferentes servicios en materia analítica entre los que se encuentra análisis de metales en diferentes fluidos biológicos y material no biológico.

En este trabajo se desarrolló y validó una metodología analítica que se aplicó en una población infantil, como ayuda a la exploración de un tema poco o nada investigado en nuestro país, no sin advertir que los resultados obtenidos no reflejarán completamente la situación actual de la contaminación por plomo en los niños de nuestro país y especialmente de Bogotá.

Como la matriz sangre es la más utilizada en el diagnóstico de contaminación por plomo, los resultados obtenidos pueden ser extrapolables a otros estudios realizados a nivel mundial.

Este trabajo pretende aportar una herramienta analítica para el análisis de plomo en sangre que permitirá realizar nuevos estudios en diferentes poblaciones con sospecha de exposición e intoxicación ambiental y/o ocupacional entre otros.

4. Metodología

Este estudio es de tipo experimental transversal, desarrollado en el laboratorio, por medio del cual se estandarizó y validó una metodología bioanalítica para el análisis de Plomo en sangre. Esta metodología se aplicó en muestras de sangre obtenidas de forma transversal, en un periodo de tiempo definido y a las cuales se les cuantificó los niveles de Plomo. Las muestras corresponden a muestras de sangre recolectadas a niños hospitalizados de edades comprendidas entre 3 meses a antes de 18 años en el Hospital La Misericordia de la ciudad de Bogotá. Este trabajo constituye parte del trabajo de proyecto docente HERMES 18840, por lo cual la parte a desarrollar en él corresponde únicamente al análisis químico de las muestras, aplicando una metodología bioanalítica validada para este fin. Las demás variables recolectadas en el formato de toma de datos (resultados de otros estudios clínicos, características del paciente, etc.) se trabajarán en el proyecto docente que integrará todos estos aspectos, incluyendo los obtenidos con este trabajo.

4.1. Población de estudio

La población en estudio corresponde a niños hospitalizados en el Hospital La Misericordia de Bogotá. Se recolectaron las muestras necesarias y que cumplieran las características de calidad y descritas en el criterio de inclusión, por un periodo de tres meses. Se aplicó la metodología bioanalítica validada para la determinación de los niveles de Plomo en las muestras de sangre.

4.1.1. Criterios de inclusión

- Que el individuo se encuentre entre los 3 meses a menores de 18 años de edad.
- Encontrarse hospitalizado.

4.1.2. Criterios de exclusión

- Que el individuo se encuentre en edades menores de 3 meses y mayores de 18 años.
- Ser de consulta externa.
- Ser de urgencias.
- Haber tenido transfusión de sangre.
- Ser paciente trasplantado
- Ser paciente oncológico

4.2. Recolección y toma de datos

Los datos generales de los pacientes fueron recolectados aplicando un instrumento desarrollado para tal fin (Ver anexo D) y se recolectó a partir de entrevista directa con representante legal del menor y/o se completó con la revisión de las historias clínicas en el programa HIS-ISIS. Los datos recolectados son ingresados y procesados en el programa Excel 2007.

4.3. Características de las muestras a analizar

Las muestras de sangre fueron recolectadas en tubo pediátrico de 2 mL tapa lila con conservante EDTA-K_2. Para el análisis mínimo se necesitó 1 mL de muestra.

Se tomaron las muestras remanentes recolectadas a los niños que ingresan a hospitalización para la realización del cuadro hemático por parte del hospital.

Las muestras deben tener la cantidad mínima de sangre, estar plenamente identificadas y no estar coaguladas.

Todas las muestras fueron almacenadas y trasportadas al laboratorio hasta su análisis a una temperatura de 4°C.

4.4. Metodología analítica

4.4.1. Equipos, materiales y reactivos

Equipos

- Espectrofotómetro de Absorción Atómica Thermo iCE 3400 AA con Horno Grafito GF95 y automuestreador para el horno de grafito FS95, sistema de refrigeración. Software para análisis de datos SOLAAR AA V 11,03.
- Balanza analítica digital ACCULAB ® LA-200. (División de escala 0,0001 g)
- Nevera para almacenamiento de muestras con control de temperatura a 4°C

Materiales

- Nevera para transportar muestras
- Lámpara de Deuterio
- Lámpara de cátodo hueco para análisis de Pb
- Cubetas (tubos) de grafito recubiertas pirolíticamente o de larga vida
- Cubetas para colocación de las muestras y posterior lectura
- Micropipeta de volumen variable de 10 a 100 µL
- Micropipeta de volumen variable de 100 a 1000 µL
- Micropipeta de volumen variable de 1 mL a 5 mL
- Vasos de precipitados de diferentes volúmenes
- Balones volumétricos de 10 y 100 mL de capacidad Clase A
- Probeta de 10 mL
- Probeta de 500 mL

- Argón grado 4.8 para espectrofotometría de absorción atómica
- Tubos de polietileno de 2 ml, con EDTA-K2 (sal dipotásica de ácido etilendiaminotetracético) como anticoagulante

Reactivos

- Agua tipo 1, TOC 3ppm
- Ácido nítrico 65 - 70 % p/v para análisis de trazas de metales Suprapur
- Octil-fenoxi-polietoxietanol (Tritón X-100)
- Dihidrógeno fosfato (V) de amonio (NH4)H2PO4
- Pirrolidinditiocarbamato de amonio (APDC)
- Cloroformo
- Metanol
- Solución certificada de Plomo AccuTrace ™ 1000 µg/mL

Preparación de reactivos

El reactivo de mayor uso es el modificador de matriz, que incluye diferentes soluciones que se preparan de la siguiente manera:

- **Solución de Pirrolidinditiocarbamato de amonio (APDC)**

Se preparó una solución de APDC pesando 1,0 g y llevándola a un balón de 100 ml. Se adicionaron 10 ml de agua tipo1, se llevó a ultrasonido hasta disolución. Se dejó enfriar y se completó con agua hasta volumen. Esta solución se utiliza en la preparación del modificador de matriz.

- **Solución de Tritón X-100 al 0,1% v/v**

En un balón aforado de 500 ml se adicionó 0,5 ml de Triton X-100 y se completó a volumen con agua. Esta solución se utiliza en la preparación del modificador de matriz.

- **Solución modificadora de matriz**

Se pesaron 5,0 g de Dihidrógeno fosfato (V) de amonio y se transfirieron a un balón aforado de 500 ml. Se lleva a disolución con 100 ml de la solución de Triton al 0,1% v/v. Una vez disuelta se completó a volumen con la solución de Tritón X-100 al 0,1% v/v.

Se llevaron 250 ml de la solución anterior a un embudo de decantación de 500 ml, se añadió 0,5 ml de la solución de APDC (preparada anteriormente) y se agitó vigorosamente. Se añadieron 10 ml de cloroformo y se agito nuevamente, se dejó decantar y se elimina la fase orgánica. Esta última etapa con cloroformo se realiza 3 veces.

El equipo necesita para su óptimo funcionamiento la preparación de una solución de lavado:

- **Solución de lavado del equipo:**

Se preparó la solución de lavado para el equipo en proporción de Tritón 0,1 % v/v, Ácido Nítrico al 5 % y Metanol al 10 % en agua tipo I.

4.4.2. Preparación de soluciones estándar

Tabla 4-1: Datos Solución Estándar de Referencia de Plomo

Sustancia	Proveedor	Concentración	Lote	Fecha de Vencimiento
Estándar de Referencia de Plomo	Accu Trace	1000 µg/mL	213015059	Enero-2018

(Certificado disponible en Anexo F)

- **Solución Estándar Madre de Plomo de 1000 µg/L**

A partir del estándar certificado de Plomo de 1000 µg/mL, se tomaron 100 µL y se llevaron a un balón aforado de 100 mL. Se le adicionó 5 mL de ácido nítrico, se aforó con

agua tipo I. Según literatura esta solución puede almacenarse hasta 6 meses en condiciones de refrigeración. (Norma Mexicana, 2002)

- **Solución estándar de calibración de Plomo de 250 µg/L**

A partir de la solución estándar madre de Plomo de 1000 µg/L, se tomaron 2,50 mL y se llevaron a un balón aforado de 10 mL. Se le adicionó 0,5 ml de ácido nítrico, se aforó con agua tipo I. Según literatura esta solución puede almacenarse hasta 1 mes. (Norma Mexicana, 2002)

- **Solución estándar de calibración de Plomo de 125 µg/L**

A partir de la solución estándar madre de Plomo de 1000 µg/L, se tomaron 1,25 mL y se llevaron a un balón aforado de 10 mL. Se le adicionó 0,5 ml de ácido nítrico, se aforó con agua tipo I. Según literatura esta solución puede almacenarse hasta 1 mes. (Norma Mexicana, 2002)

- **Solución estándar de calibración de Plomo de 100 µg/L**

A partir de la solución estándar madre de Plomo de 1000 µg/L, se tomaron 1 mL y se llevaron a un balón aforado de 10 mL. Se le adicionó 0,5 ml de ácido nítrico, se aforó con agua tipo I. Según literatura esta solución puede almacenarse hasta 1 mes. (Norma Mexicana, 2002)

- **Solución estándar de calibración de Plomo de 75 µg/L**

A partir de la solución estándar madre de Plomo de 1000 µg/L, se tomaron 750 µL y se llevaron a un balón aforado de 10 mL. Se le adicionó 0,5 ml de ácido nítrico, se aforó con agua tipo I. Según literatura esta solución puede almacenarse hasta 1 mes. (Norma Mexicana, 2002)

- **Solución estándar de calibración de Plomo de 50 µg/L**

A partir de la solución estándar madre de Plomo de 1000 µg/L, se tomaron 500 µL y se llevaron a un balón aforado de 10 mL. Se le adicionó 0,5 ml de ácido nítrico, se aforó con agua tipo I. Según literatura esta solución puede almacenarse hasta 1 mes. (Norma Mexicana, 2002)

- **Solución estándar de calibración de Plomo de 25 µg/L**

A partir de la solución estándar madre de Plomo de 1000 µg/L, se tomaron 250 µL y se llevaron a un balón aforado de 10 mL. Se le adicionó 0,5 ml de ácido nítrico, se aforó con agua tipo I. Según literatura esta solución puede almacenarse hasta 1 mes. (Norma Mexicana, 2002)

4.4.3. Determinación del contenido de Plomo

Previo a la validación del método y siguiendo las recomendaciones del fabricante, se debió optimizar las temperaturas de calcinación de la muestra y atomización del analito, siguiendo el software del equipo (Ver anexo H). En esta parte se seleccionó un rango de temperatura para la realización de la optimización, y el equipo automáticamente realiza combinaciones de temperaturas obteniendo diferentes respuestas. Se seleccionaron las mejores temperaturas de calcinación y atomización de acuerdo a las señales obtenidas.

Una vez obtenidas las temperaturas se procedió al diligenciamiento de los demás parámetros del equipo siguiendo las recomendaciones del fabricante y con base a la guía del Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo y la guía aplicativa del fabricante para análisis de Plomo en sangre.

Los parámetros utilizados fueron:

Parámetros Espectrómetro Pb
Elemento: Pb
Longitud de onda: 283,3 nm

Corrección de fondo: D2

Rejilla: 0,5 nm

Corriente de la lámpara: 75%

Temperatura de inyección 75°C

Gas de purga: Argón

Volumen de inyección: 15 µL

Tipo de tubo: Recubierto

Tabla 4-2: Programa del horno de grafito para la determinación de Plomo

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo (sg)	Rampa (°C/sg)	Gas Tipo	Gas Flujo
1	80	20	4	2	0,2 L/min
2	110	20	1	2	0,2 L/min
3	550	15	30	2	0,2 L/min
4	900	15	30	2	0,2 L/min
5	1200	4	0	2	Apagado
6	2700	10	300	2	0,2 L/min
7	20	10	0	2	0,2 L/min

- ## Preparación de muestras

La preparación de las curvas de calibración y montaje de las muestras se realizaron tomando como guía la NORMA Oficial Mexicana NOM-199-SSA1-2000 -Salud ambiental Niveles de Plomo en sangre y acciones como criterios para proteger la salud de la población expuesta no ocupacionalmente- y la guía de determinación de Plomo en sangre - Método de cámara de grafito Espectrofotometría de absorción atómica del INSHT.

Para el análisis de Plomo en sangre se debe tener rigurosidad en la limpieza del área a trabajar, debe ser un área limpia y libre de polvo.

Una vez preparadas las soluciones estándares de calibración de Plomo, y para la preparación de las curvas acuosas, se procedió a tomar el número de cubetas para

lectura necesaria, se marcaron con la concentración que se iban a preparar para lectura y se adicionaron en el orden el modificador de matriz y la solución estándar de cada concentración, se homogenizó con bombeo repetido de tres veces con la punta de la micropipeta.

Tabla 4-3: Cantidades para preparación de curva acuosa

Muestras para colocar en el equipo →	Blanco de reactivos	Estándar de 25 µg/L	Estándar de 50 µg/L	Estándar de 75 µg/L	Estándar de 100 µg/L	Estándar de 125 µg/L	Estándar de 250 µg/L
Modificador de matriz	450	450	450	450	450	450	450
Agua tipo I	50						
Solución Estándar de 25 µg/L		50					
Solución Estándar de 50 µg/L			50				
Solución Estándar de 75 µg/L				50			
Solución Estándar de 100 µg/L					50		
Solución Estándar de 125 µg/L						50	
Solución Estándar de 250 µg/L							50
Total	500	500	500	500	500	500	500

Para preparación de la curva sanguínea, se procedió a tomar un blanco de sangre, se homogenizó suavemente la muestra con invertido de 10 según recomendaciones internacionalmente aceptadas y reconocidas para el color de la tapa del tubo (lila), se tomaron el número de cubetas para lectura necesaria, se marcaron con la concentración que se iban a preparar para lectura. Se adicionaron en el orden modificador de matriz, sangre homogenizada y solución estándar de Plomo, se homogenizó con bombeo repetido 3 veces con la punta de la micropipeta.

Tabla 4-4: Cantidades para preparación de curva sanguínea

Muestras para colocar en el equipo →	Blanco de reactivos	Estándar de 25 µg/L	Estándar de 50 µg/L	Estándar de 75 µg/L	Estándar de 100 µg/L	Estándar de 125 µg/L	Estándar de 250 µg/L
Modificador de matriz	400	400	400	400	400	400	400
Agua tipo I	50						
Sangre	50	50	50	50	50	50	50
Solución Estándar de 25 µg/L		50					
Solución Estándar de 50 µg/L			50				
Solución Estándar de 75 µg/L				50			
Solución Estándar de 100 µg/L					50		
Solución Estándar de 125 µg/L						50	
Solución Estándar de 250 µg/L							50
Total	500	500	500	500	500	500	500

4.4.4. Validación del método bioanalítico

El método bioanalítico para la determinación de Plomo en sangre se desarrolla mediante una adaptación de los métodos presentados por el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT)del Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales de España (MTA/MB-011/R92); la Norma Oficial Mexicana de Emergencia, Salud Ambiental, criterios para la determinación de los niveles de concentración de Plomo en la sangre NOM-EM-004-SSA1; la guía C40 A Analytical Produces for Determination of Lead in Blood and Urine de Clinical and Laboratory Standards Institute - USA y las recomendaciones del fabricante del equipo.

La metodología bioanalítica se validó de acuerdo a los parámetros recomendados por la guía para la Industria de Validación de Métodos Bioanalítico de la FDA, la guía de Validación de Métodos Bioanalíticos de la EMEA/CHMP/EWP, Guía del Instituto de Salud Pública de Chile sobre la Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición. Los parámetros que se evaluaron fueron: Selectividad,

Linealidad y rango, Limites (LOD, LLOQ, ULOQ), exactitud, Precisión (repetibilidad, precisión intermedia), estabilidad, efecto matriz, efecto memoria.

Cuando el analito de interés se encuentra en preparación acuosa se llama sistema, cuando se fortifica con el analito de interés la matriz sangre se denomina método.

- **Selectividad**

La selectividad del método bioanalítico se evaluó con 6 muestras blanco de la matriz sangre de diferentes individuos, donantes.

Las seis fueron analizadas, para determinar que no existiese señal, pues según la guía de la EMEA/CHMP/EWP, la ausencia de componentes que interfieren es aceptada con la respuesta inferior a 20% del límite inferior de cuantificación para el analito.

- **Linealidad y rango**

La linealidad del método bioanalítico se determinó de acuerdo a la concentración máxima permitida esperada en niños por la CDC que es 5µg/dL, y de acuerdo a diferentes estudios consultados, como los realizados por Azcona y colaboradores en 2000, Zhang y colaboradores en 2015 y Yonghua y colaboradores en 2011. Se trabajó el rango entre 25,0 a 250,0 µg/L, comenzando por el límite inferior de cuantificación LLOQ de 25,0 µg/L y cinco concentraciones más, siendo la última de 250,0 µg/L el límite superior de cuantificación LLOQ.

Sistema

La curva de calibración se preparó en seis niveles de concentración de 25,0 µg/L, 50,0 µg/L, 75,0 µg/L, 100,0 µg/L, 125,0 µg/L y 250,0 µg/L. Se realizaron cinco replicas en cada concentración.

Método

La curva de calibración se preparó en seis niveles de concentración de 25,0 µg/L, 50,0 µg/L, 75,0 µg/L, 100,0 µg/L, 125,0 µg/L y 250,0 µg/L, pero en la matriz sangre, como se describe en el segmento de preparación de muestras del presente documento. Se realizaron cinco replicas en cada concentración.

- **Límites**

Límite de detección (LOD)

El límite de detección del método bioanalítico se determinó por medio de la desviación estándar de la respuesta y la pendiente**.**

La ICH (Internacional Conference on Harmonization of Technical) manifiesta que se puede multiplicar por 3 la desviación estándar para determinar el Limite de Detección y relacionarla con la pendiente.

$$LD = 3{,}3(\frac{S}{b})$$

Dónde: S es la desviación estándar de las mediciones
b es pendiente

Se realizó la medición de 10 blancos y se aplicó la anterior formula.

Límite de cuantificación (LLOQ)

Para el método bioanalítico validado se determina como la mínima concentración presente en la curva de calibración, cumpliendo con una precisión CV≤20% y su concentración media calculada dentro del ± 20% del valor nominal. La respuesta del LLOQ debe ser mayor de 5 veces la respuesta del blanco.

Límite superior de cuantificación (ULOQ)

Para el método bioanalítico validado se determina como la máxima concentración presente en la curva de calibración, cumpliendo con una precisión CV≤15% y su concentración media calculada dentro del ± 15% del valor nominal.

- **Precisión**

Repetibilidad

Se evaluó en 4 concentraciones, incluidas el LLOQ (25,0 µg/L), una concentración en el rango bajo (50,0 µg/L), una en el rango medio (100,0 µg/L) y una en el rango alto (250,0 µg/L), cumpliendo lo requerido de 5 réplicas cada uno. Se evalúa por el mismo analista el mismo día, tanto en sistema como en método.

Precisión intermedia

Se realizó el mismo ensayo de repetibilidad, pero hecho por dos analistas. Se evaluó en cuatro concentraciones que incluyen el LLOQ (25,0 µg/L), una concentración en el rango bajo (50,0 µg/L), una en el rango medio (100,0 µg/L) y una en el rango alto (250,0 µg/L). Para el analista uno se desarrolló en dos días y para el analista dos en un día. El criterio de aceptación se determina por los coeficientes de variación, los cuales no deben exceder el nivel 15%, a excepción del nivel más bajo, que puede ser hasta del 20%. Para determinar si no hay variación entre días y analistas, se realizó la comparación de los datos mediante un análisis de varianza ANOVA para cada nivel.

Exactitud

Se realiza entre el día y entre días. Se realiza con un análisis en las cuatro concentraciones que incluyen el LLOQ (25,0 µg/L), una concentración en el rango bajo (50,0 µg/L), una en el rango medio (100,0 µg/L) y una en el rango alto (250,0 µg/L) en el

mismo día y entre días diferentes. La exactitud se expresa utilizando el error medio relativo (MRE), que se calcula así:

$$MRE = \frac{Promedio\ de\ Resultados\ obtenidos - Concentración\ teórica}{Concentración\ teórica}\ x\ 100$$

Estabilidad

Se evaluó el parámetro de estabilidad en el carrusel, a dos concentraciones de 50,0 µg/L y 250,0 µg/L, a las 12 horas, 24 horas y 48 horas.

También se evaluó la estabilidad de la muestra en los ciclos de refrigeración y acondicionamiento de la muestra a condiciones de temperatura normal de trabaja, una muestra concentración conocida, a la semana 2, 4 y 6.

- **Recuperación**

La recuperación se determinó para las concentraciones de 25,0 µg/L, 50,0 µg/L, 100,0 µg/L y 250,0 µg/L, mediante comparación de los resultados del sistema con los resultados del método.

- **Efecto matriz**

El efecto matriz se determinó mediante comparación de las pendientes de la curva del método con la curva del sistema**.** (FDA, 2001) (Fernández, 2011)

- **Efecto Memoria**

Se determinó con la lectura un blanco (con tres replicas), en dos días diferentes, después de la lectura de un estándar preparado al doble de la concentración del ULOQ en la curva de calibración, un estándar de 500,0 µg/L. El valor obtenido como lectura del blanco no debe ser mayor del 20% del límite de cuantificación. (EMEA/CHMP/EWP, 2011).

Tabla 4-5: Resumen del estudio de validación de la metodología bioanalítica para determinación de Plomo en sangre

Parámetro a validar	Análisis	Criterio de aceptación
Selectividad	6 muestras blanco	Ausencia de interferencias
Linealidad y rango del sistema	Seis concentraciones 25,0 µg/L, 50,0 µg/L, 75,0 µg/L, 100,0 µg/L, 125,0 µg/L y 250,0 µg/L cinco replicas. Estándares acuosos y elaborados en Ácido nítrico	Prueba t para el coeficiente de correlación t exp>t tab. Se rechaza Ho. Existe correlación
		Prueba t para la pendiente t exp > t tab. Se rechaza Ho. La pendiente es significativamente diferente de 0
		Prueba t para el intercepto t exp < t tab. No se rechaza Ho. El intercepto es significativamente diferente de cero.
Linealidad y rango del método	Seis concentraciones 25,0 µg/L, 50,0 µg/L, 75,0 µg/L, 100,0 µg/L, 125,0 µg/L y 250,0 µg/L cinco replicas. Estándares elaborados en sangre	Prueba t para el coeficiente de correlación t exp>t tab. Se rechaza Ho. Existe correlación
		Prueba t para la pendiente t exp > t tab. Se rechaza Ho. La pendiente es significativamente diferente de 0
		Prueba t para el intercepto t exp < t tab. No se rechaza Ho. El intercepto es significativamente diferente de cero.
Limites	Límite de detección: Blancos 10 réplicas – Curva de calibración	Desviación estándar, pendiente, LDS =3,3*s/b
	Límite de Cuantificación LLOQ	CV≤20% y M.R.E ± 20%. La respuesta del LLOQ debe ser mayor de 5 veces la respuesta del blanco.
	Límite superior de cuantificación	CV≤15% y M.R.E ± 15%.
Precisión/Exactitud	Repetibilidad: Análisis de sistema y método en LLOQ (25,0µg/L), nivel bajo (50,0µg/L), nivel medio (100,0µg/L) y nivel alto (250,0 µg/L) Precisión intermedia: Dos analistas en sistema y método en LLOQ (25,0µg/L), nivel bajo (50,0µg/L), nivel medio (100,0µg/L) y nivel alto (250,0 µg/L)	CV≤ 20% (LLOQ) y CV≤ 15% (50,0; 100,0 y250,0 µg/L) M.R.E ± 20% (LLOQ) y M.R.E.± 15% (50,0; 100,0 y250,0 µg/L) CV≤ 20% (LLOQ) y CV≤ 15% (50,0; 100,0 y250,0 µg/L) Análisis de varianza ANOVA para cada concentración Hipótesis nula (H0): No existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos con el método para el nivel de

		concentración 25,0 µg/L Hipótesis alterna (H1): Existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos en la metodología para el nivel de concentración 25,0 µg/L.
Estabilidad	Automuestrador: Muestras a 50,0 µg/L y 250,0 µg/L leídas a tiempo 0, 12 horas, 24 horas y 48 horas Ciclos de refrigeración y atemperado (Condiciones normales del análisis) a la semana 0, 2, 4 y 6 de una muestra de concentración conocida.	Estabilidad 80% a 120% en relación a muestras control
Recuperación	Análisis del analito en sangre a concentración LLOQ, baja, media y alta comparada con la respuesta de las mismas concentraciones pero en el sistema.	Mayor del 50%
Efecto matriz	Comparación de las pendientes de las curvas de calibración del método y sistema	±25%
Efecto memoria	Análisis de blanco después de estándar de 500,0 µg/L	La respuesta del blanco no debe ser mayor que el 20% de LLOQ

4.5. Análisis y manejo de datos

Los datos fueron obtenidos y procesados por el equipo Espectrómetro de Absorción Atómica de la casa Thermo Scientific que tiene el software SOLAAR AA Versión 11.03.

El análisis de los datos para la validación se realizó en hoja de cálculo Excel 2013 de Microsoft Office 2013.

4.6. Consideraciones éticas del estudio

4.6.1. Tipo de investigación

El estudio se desarrolló siguiendo las consideraciones éticas de la Resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud y Protección Social, en la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. El proyecto

se clasificó como Investigación con riesgo mínimo, puesto que la muestra objeto de análisis se obtuvo de una muestra de sangre ya tomada previamente por punción venosa, debiendo cumplir lo expuesto en el artículo 24: "*Cuando se pretenda realizar investigaciones en menores de edad, se deberá asegurar que previamente se hayan hecho estudios semejantes en personas mayores de edad y en animales inmaduros; excepto cuando se trate de estudios de condiciones que son propias de la etapa neonatal o padecimientos específicos de ciertas edades*" (Ministerio de Salud, 1993).

También dicha resolución en su parágrafo primero : "*En el caso de investigaciones con riesgo mínimo, el Comité de Etica en Investigación de la institución investigadora, por razones justificadas, podrá autorizar que el Consentimiento Informado se obtenga sin formularse por escrito y tratándose de investigaciones sin riesgo, podrá dispensar al investigador de la obtención del mismo*".

Las muestras fueron tomadas por personal idóneo del área de la salud y perteneciente al Hospital La Misericordia. También se tiene acta de aprobación del comité de Ética del Hospital La Misericordia para el desarrollo del proyecto. (Ver anexos B y C)

Los datos y resultados se manejaron de forma confidencial, y una vez analizadas las muestras fueron descartadas en el laboratorio siguiendo los procedimientos internos establecidos para tal fin y bajo las precauciones de manejo de muestras biológicas, asegurando una segura disposición final.

4.6.2. Procedimiento para la toma de muestras y recolección de la información

En el desarrollo del estudio se revisaron cerca de 5000 tubos de muestras, donde se realiza el primer filtro que corresponde a calidad de muestra, edad, diagnóstico y que la muestra no se encuentre repetida dentro de las muestras ya seleccionadas. Luego se procede a aplicar el instrumento desarrollado (ver anexo D) para la consignación de datos obtenidos de la base de datos del Hospital, buscando por la historia clínica del paciente, donde se confirma la edad del paciente, el diagnóstico y si ha sido trasfundido.

Por ser un tipo de estudio donde se trabaja con los remanentes de las muestras ya tomadas para análisis propios del Hospital, se tiene consentimiento por parte del comité de Ética del mismo para la utilización de estas muestras sin consentimiento informado, puesto que el análisis se realiza con muestras de descarte, no implica punciones adicionales y se protegerá la intimidad del menor pues los resultados serán confidenciales. (Ver anexo C)

5. Resultados y Discusión

5.1. Tratamiento de la muestra

Una vez seleccionada la muestra fue transportada bajo condiciones óptimas de refrigeración (4°C) y llevadas al laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.

En el laboratorio, el auxiliar procede a realizar el ingreso de la muestra siguiendo lo establecido por los procedimientos internos del laboratorio, asignándole un número consecutivo y diligenciando el formato de registro de recepción de muestras LTFM-FR-10. La muestra es ahora reconocida y tratada durante todo el análisis con el número asignado, volviéndose un estudio ciego para el investigador analista.

5.2. Limpieza del material de vidrio

Siguiendo los lineamientos analíticos cuando se trabaja en metales y más en análisis de trazas, los elementos y materiales que se utilicen durante el análisis deben tener una limpieza y tratamiento especial, para evitar falsos positivos.

Por esta razón se estableció como primera medida un protocolo de limpieza del material para su uso en este análisis, siguiendo la Norma Oficial Mexicana NOM-EM-004-SSA1 y la guía C40-A del Instituto de Estándares de Laboratorios y Clínicos. (Ver anexo E)

5.3. Validación de la metodología Bioanalítica

Selectividad

Se analizaron seis blancos de matriz sangre de voluntarios. Los resultados obtenidos demuestran una ausencia de interferentes, pues las respuestas obtenidas fueron

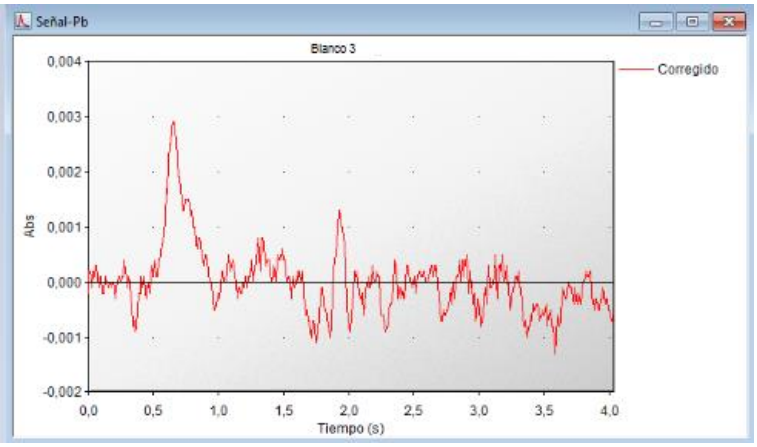
menores del 20% del límite bajo de cuantificación según la guía EMEA/CHMP/EWP, 2012. Es de resaltar que la lámpara utilizada es unielemento, es exclusiva para el análisis de Plomo. Evitando las posibles interferencias de absorción moleculares, el método utiliza una longitud de onda específica del elemento a analizar, en este caso Plomo. En cuanto a las interferencias espectrales, es poco probable que otro elemento químico tenga una línea de absorción solapada de intensidad significativa.

Tabla 5-1: Respuestas obtenidas para los seis blancos de sangre provenientes de diferentes donantes

Sangre	R1	R2	Promedio
1	0,0060	0,0063	0,0062
2	0,0052	0,0061	0,0057
3	0,0023	0,0027	0,0025
4	0,0016	0,0016	0,0016
5	0,0021	0,0020	0,0021
6	0,0024	0,0020	0,0022

En la figura 5-1 se presenta una señal de un blanco de sangre corrido de uno de los donantes.

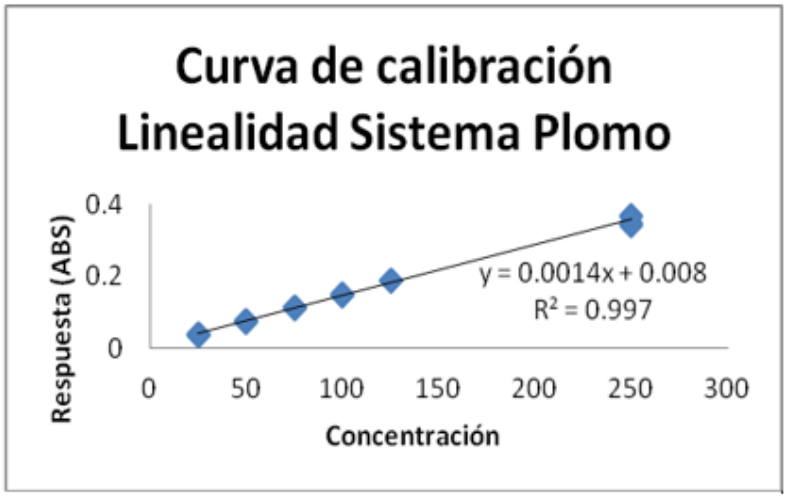
Figura 5-1: Señal de blanco de sangre



Linealidad y Rango

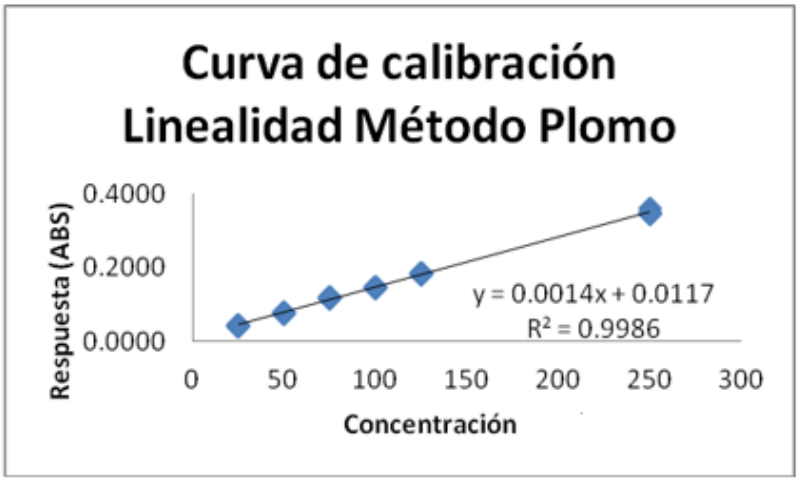
Para determinar la linealidad y sensibilidad del sistema se prepararon las soluciones estándar de trabajo a partir de estándar certificado. El rango lineal establecido fue de 25,0 a 250,0 µg/L. El límite de cuantificación LLOQ se estableció en 25,0 µg/L, seguido de las concentraciones de 50,0, 75,0, 100,0, 125,0, y 250,0 µg/L. El modelo de regresión es lineal, relacionando Concentración (µg/L) vs Respuesta (ABS).

Figura 5-2: Curva de calibración en el sistema para Plomo



Para el método se tiene en cuenta la preparación de la muestra con la matriz biológica a estudio que es sangre.

Figura 5-3: Curva de Calibración en el Método para Plomo



A cada calibración se le sometió a test estadísticos para la pendiente, intercepto y coeficiente de correlación.

El resumen de las pruebas de hipótesis se encuentran consignadas en la tabla 5-2 y se encuentran explicadas con las formulas aplicadas en el anexo H.

Tabla 5-2: Pruebas de Hipótesis aplicadas para la pendiente, intercepto y coeficiente de variación.

Prueba de Hipótesis	Hipótesis	Resultado esperado
Pendiente	H0 : m=0 H1 : m≠0	t m>t tab se rechaza H0, la pendiente es significativamente diferente de cero.
Intercepto	H0 : b=0 H1 : b≠0	t b<t tab no se rechaza H0, el intercepto no es significativamente diferente de cero.
Coeficiente de Correlación	H0 : No existe correlación entre las variables de concentración y respuesta H1 : Existe correlación entre las variables de concentración y respuesta	t r>t tab se rechaza H0, entonces existe correlación entre las variables de concentración y respuesta.

En las tablas 5-3 Y 5-4 se encuentran los resultados para las pruebas de hipótesis realizadas, teniendo presente que se tiene un n igual a 30, se trabaja con n-2 grados de libertad igual a 28, el valor de t tabulado es 2,048.

Tabla 5-3: Resultados de las pruebas de hipótesis para el intercepto, pendiente y coeficiente correlación del sistema para Plomo.

SISTEMA							
Día	**Parámetro**	**Valor**	**S(b ó m)**	**LCI**	**LCS**	**t calculado**	
1	Pendiente	0,0014	0,00012	0,0011	0,0016	Tm	11,019
	Intercepto	0,008	1,4323	-2,925	2,942	Tb	0,0056
	Coeficiente de correlación	0,997	--	--	--	Tr	5,2836

2	Pendiente	0,0015	0,0001	0,0014	0,0016	tm	58,444
	Intercepto	0,0033	0,6437	-1,315	1,322	tb	0,0051
	Coeficiente de correlación	0,9992	--	--	--	tr	5,2894

S(b ó m): Desviación estándar de la pendiente o el intercepto
tm,tb ó tr: Valores t calculados
LCI: Límite de confianza inferior
LCS: Límite de confianza superior

Tabla 5-4: Resultados de las pruebas de hipótesis para el intercepto, pendiente y coeficiente correlación del método para Plomo

METODO							
Día	**Parámetro**	**Valor**	**S(b ó m)**	**LCI**	**LCS**	**t calculado**	
1	Pendiente	0,0014	0,00013	0,0011	0,0017	tm	10,626
	Intercepto	0,0117	2,1272	-2,975	2,999	tb	0,0080
	Coeficiente de correlación	0,9986	--	--	--	tr	5,2878
2	Pendiente	0,0013	0,00019	0,0009	0,0017	tm	6,581
	Intercepto	0,0163	1,7860	-3,674	3,641	tb	0,0091
	Coeficiente de correlación	0,9976	--	--	--	tr	5,2851

S(b ó m): Desviación estándar de la pendiente o el intercepto
tm,tb ó tr: Valores t calculados
LCI: Límite de confianza inferior
LCS: Límite de confianza superior

Como se observa en las tablas 5-3 y 5-4donde se encuentran resumidos los resultados de las pruebas de hipótesis, se tiene que:

1. En el caso de la pendiente para el sistema y el método la prueba de hipótesis dio como resultado un tm>ttab, por tanto se rechaza H0, es decir las pendientes son significativamente diferentes de cero.

2. En el caso del intercepto para el sistema y el método la prueba de hipótesis dio como resultado un tb<ttab, por tanto se acepta H0, es decir el intercepto no es estadísticamente diferente de cero.

3. En el caso del coeficiente de correlación para el sistema y el método la prueba de hipótesis dio como resultado un tm>ttab, por tanto se rechaza H0, es decir existe correlación entre la variable de concentración en µg/L (eje x) y la variable respuesta ABS (eje y).

Los intervalos de confianza para cada una de las curvas de calibración del sistema y método, no presentan diferencias significativas y los coeficientes de correlación obtenidos son superiores a 0,99 tanto para sistema y método.

Se concluye que la metodología bioanalítica es lineal en el rango de concentraciones de 25,0 a 250,0 µg/L.

Limites

▪ Límite de Detección LOD

Para la determinación del límite de detección se siguió la recomendación de la guía ICH 2005 y las recomendaciones del fabricante del equipo, donde se puede determinar el límite de detección mediante la determinación de la desviación estándar de las lecturas de varios blancos y la pendiente de la curva de calibración del analito.

Esta relación se lleva a cabo mediante la fórmula:

$$DL = \frac{3.3\ \delta}{S}$$

Donde δ es la desviación estándar de la respuesta

S es la pendiente de la curva de calibración.

Tabla 5-5: Determinación del límite de Detección mediante DSR y Curva de Calibración

Calculo límite de Detección Plomo	
Blanco	**Respuesta (ABS)**
1	0,0018
2	0,0019
3	0,0021
4	0,0025
5	0,0021
6	0,0021
7	0,0024
8	0,0016
9	0,0023
10	0,002
Promedio	0,00208
Desviación estándar	0,00027
DL µg/L	0,65

Verificación LOD

Dentro de la metodología proporcionada por el fabricante del equipo Thermo®, el límite de detección para el equipo en horno de grafito es de 0,78 µg/L. Se realizó la verificación con la lectura de un estándar de concentración de 0,65 µg/L.

Tabla 5-6: Verificación del límite de detección

Lectura de muestra 0,65 µg/L	Concentración obtenida
0,0099	1,36
0,0102	1,57
0,0090	0,71
0,0104	1,71
0,0111	2,21
0,0091	0,79
Promedio	1,39
Desviación estándar	0,57
CV	41,12

Se observa entonces que a una concentración de 0,65 µg/L, es decir, 0,065 µg/dl la metodología bioanalítico es capaz de determinar Plomo, aunque no es reproducible pues da un CV mayor de 20%, que sería el máximo permitido para concentraciones bajas y pueda ser cuantificable.

- **Límite inferior de cuantificación LLOQ**

Se tomó como el límite inferior de cuantificación LLOQ al nivel más bajo de la curva de calibración.

Este debe cumplir con los siguientes parámetros:
1. La respuesta debe ser al menos 5 veces la respuesta del blanco.
2. La respuesta debe ser confiable con una precisión medida como CV≤20%.

Los resultados se encuentran en la tabla 5-7.

- **Límite superior de cuantificación ULOQ**

Es nivel más alto de la curva se le llama límite superior de cuantificación (ULOQ). Debe ser analizado con sus réplicas. (EMEA/CHMP/EWP, 2012). La respuesta debe ser confiable con una precisión medida como CV≤15% y la concentración media calculada dentro del ±15% del valor nominal. Los resultados se encuentran en la tabla 5-7.

Tabla 5-7: Resultados para el Límite inferior de Cuantificación LLOQ y el Límite superior de Cuantificación

Concentración µg/L				
	25 µg/L LLOQ		250 µg/L ULOQ	
	Sistema	Método	Sistema	Método
	24,4	22,4	239,1	255,9
	22,5	22,4	245,0	248,5
	21,3	22,8	241,2	248,7
	21,7	23,8	257,8	244,9
	22,1	23,9	255,4	245,4
Promedio	22,4	23,0	247,7	248,7
DESV	1,2	0,7	8,4	4,4
CV	5,3	3,2	3,4	1,8

Como se observa, para el LLOQ, se tiene una respuesta mayor de 5 veces la respuesta del blanco (0,00208), correspondientes a las respuestas presentadas en la tabla 5-5.

También presenta un porcentaje de coeficiente de variación menor a 20%, como se observa en la tabla 5-7.

Para el ULOQ se observa que la respuesta es confiable por presentar un coeficiente de variación menor de 15%, siendo 3,2% para el sistema y 1,8% para el método.

Precisión y Exactitud

Repetibilidad

Se realizaron determinaciones en mismo día, por el mismo analista y se evaluaron en tres concentraciones y en el LLOQ. El criterio de aceptación se evaluó mediante el coeficiente de variación, menor al 15%, a excepción del LLOQ que debe ser menor del 20%.

Los resultados esperados para la precisión del método y sistema se expresan como CV (%). Se esperan valores menores del 15%, a excepción del LLOQ que debe tener valores menores del 20%.

Tabla 5-8: Precisión y Repetibilidad del sistema y método para el LLOQ, 50,0 µg/L, 100, 0 µg/L y 250,0 µg/L.

Concentración µg/L	**Sistema**			**Método**		
	Repetibilidad CV (%)	Precisión intermedia día análisis CV (%)	Precisión intermedia analista CV (%)	Repetibilidad CV (%)	Precisión intermedia día análisis CV (%)	Precisión intermedia analista CV (%)
25,0	5,3	3,7	4,7	3,2	5,8	4,1
50,0	2,2	2,2	1,8	2,5	2,2	2,5
100,0	0,9	1,0	0,9	1,2	1,8	1,4
250,0	3,4	2,4	2,6	1,8	1,5	1,6

El método bioanalítico cumple con el parámetro de repetibilidad.

Precisión intermedia

Se evaluó como un ensayo de repetibilidad pero por dos analistas. El criterio de aceptación se basa en los coeficientes de variación, los cuales no deben ser mayores del 15%, excepto para el LLOQ que debe ser menor del 20%.

Se realiza también un Análisis de Varianza ANOVA para determinar si existen diferencias significativas ente los resultados obtenidos por cada uno de los analistas y para el segundo día.

Las hipótesis planteadas para cada nivel fueron:

1. 25,0 µg/L

Hipótesis nula (H0): No existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos con el método para el nivel de concentración 25,0 µg/L

Hipótesis alterna (H1): Existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos en la metodología para el nivel de concentración 25,0 µg/L.

2. 50,0 µg/L

Hipótesis nula (H0): No existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos con el método para el nivel de concentración 50,0 µg/L.

Hipótesis alterna (*H1*): Existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos en la metodología para el nivel de concentración 50,0 µg/L.

3. 100,0 µg/L

Hipótesis nula (H0): No existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos con el método para el nivel de concentración 100,0 µg/L

Hipótesis alterna (H1): Existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos en la metodología para el nivel de concentración 100,0 µg/L.

4. 250,0 µg/L

Hipótesis nula (H0): No existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos con el método para el nivel de concentración 100,0 µg/L

Hipótesis alterna (H1): Existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos en la metodología para el nivel de concentración 100,0 µg/L.

Los resultados obtenidos se encuentran en la tabla 4-9.

Tabla 5-9: Resultados del Análisis de Varianza para la precisión intermedia del método y sistema.

Concentración µg/L	CV global		F. crítico	F Calculado	
	Sistema	Método		Sistema	Método
25,0	4,2	5,1	3,89	3,65	2,59
50,0	1,9	2,4		1,73	1,70
100,0	1,0	1,7		3,60	3,25
250,0	2,1	1,5		3,16	2,28

Como se observa los F calculados para cada una de las concentraciones del método y sistema son menores que el F crítico, por lo cual se aceptan las hipótesis nulas, es decir no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos por diferentes analistas y diferentes días en la metodología, para los niveles de concentración de 25,0 µg/L, 50,0 µg/L, 100,0 µg/L y 250,0 µg/L.

Exactitud

La exactitud se evaluó en los niveles de concentración de 25,0µg/L, 50,0µg/L, 100,0µg/L y 250,0 µg/L y se tiene como criterio la evaluación del error relativo medio (MRE) que debe estar entre ± 15% a excepción del LLOQ que puede estar en ± 20%. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5-10.

Tabla 5-10: Exactitud del Sistema y método para el LLOQ 50,0µg/L, 100,0µg/L y 250,0 µg/L

Concentración µg/L	Sistema			Método		
	Exactitud MRE (%)	Exactitud día de análisis MRE (%)	Exactitud analista MRE (%)	Exactitud MRE (%)	Exactitud día de análisis MRE (%)	Exactitud analista MRE (%)
25,0	-10,5	-11,0	-8,4	-7,7	-10,6	-9,6
50,0	-1,9	-0,8	-1,2	-3,1	-4,3	-3,4
100,0	1,2	1,0	1,0	-0,5	0,6	0,1
250,0	-0,9	-0,7	-0,4	-0,5	-0,9	-1,0

Como se observa la metodología bioanalítica cumple con este parámetro.

Recuperación

Se evaluó el porcentaje de recuperación en las concentraciones de 25,0µg/L, 50,0 µg/L, 100,0 µg/L y 250,0 µg/L.

En la tabla 5-11 se encuentran los resultados de recuperación.

Tabla 5-11: Resultados del porcentaje de recuperación para las concentraciones de 25,0 µg/L, 50,0 µg/L, 100,0 µg/L y 250,0 µg/L.

Concentración nominal	Porcentaje de recuperación %	CV
25,0	103,5	7,1
50,0	98,8	1,8
100,0	98,3	1,1
250,0	100,6	5,0

Se obtienen buenos resultados de porcentaje de recuperación y los CV cumplen los requerimientos de ser menores del 15% y menores del 20% para el LLOQ. Podemos concluir que tiene mínimo un 98,3% de recuperación.

Efecto matriz

Para realizar la evaluación del efecto matriz se llevó a cabo la comparación de las Funciones de Calibración del método y del sistema.

Se realiza entonces un test de t-Student con las siguientes hipótesis.

H0= b1 = b2 donde tcal < ttab. Se acepta la hipótesis nula. No existen diferencias significativas entre las pendientes

H1= b1 ≠ b2 donde tcal ≥ ttab. Se rechaza la hipótesis nula. Existen diferencias significativas entre las pendientes

Se aplican para determinar el valor de t_{cal} las fórmulas encontradas en el anexo I y el desarrollo de las mismas. El valor de t_{tab} con (n1+n2-4) grados de libertad y significancia

de 5%, siendo n1 y n2 el número de patrones empleados en la preparación de las curvas de calibración.

En la tabla 5-12 se encuentra registrado el efecto que tiene la matriz sangre en la metodología.

Tabla 5-12: Evaluación del efecto matriz por comparación de pendientes

Efecto matriz	
t calculado	**t tabla**
0,0064	1,8946

El t calculado es menor que el t de la tabla por lo que se acepta la Hipótesis Nula H0, es decir no existe diferencia significativa entre las pendientes, lo que nos muestra que no existe un efecto matriz notorio en el método bioanalítico.

Efecto memoria

El efecto memoria se evaluó mediante el análisis de blancos después de realizar la lectura de un estándar de concentración de 500,0 µg/L.

Se determinó con la lectura un blanco (con tres replicas), en dos días diferentes después de la lectura de un estándar preparado al doble de la concentración del ULOQ en la curva de calibración, un estándar de 500,0 µg/L. El valor obtenido como lectura del blanco no debe ser mayor del 20% del límite de cuantificación. (EMEA/CHMP/EWP, 2011).

Tabla 5-13: Resultados de Efecto Memoria

	Concentración	Respuesta (ABS)			Promedio
Día 1	25,0	0,0432	0,0428	0,0443	0,0434
	500,0	0,5439	0,5797	0,5792	0,5676
	Blanco	0,0032	0,0026	0,0031	0,0029
Día 2	25,0	0,0418	0,0404	0,0405	0,0409
	500,0	0,5750	0,5661	0,5744	0,5718
	Blanco	0,0036	0,0038	0,0035	0,0036

Como se observa en la tabla 5-13, los valores obtenidos por el blanco después de realizar la lectura de un estándar de 500,0 µg/L no excede el 20% de la lectura obtenida por el LLOQ, lo que demuestra que el sistema de limpieza del inyector y el ciclo de limpieza del tubo de grafito después de la lectura es el adecuado para el análisis.

Estabilidad

El equipo de Absorción Atómica utilizado, no posee un sistema de refrigeración controlado en su automuestreador, por lo que al realizar una preparación de muestras es aconsejable leerlas y descartarlas, pues las condiciones de temperatura no son controladas , lo que genera un proceso de descomposición natural de estas muestras y variación rápida en la concentración de las mismas. Para evidenciarlo se evalúa a un tiempo 0 las concentraciones de 50,0 µg/L y 250,0 µg/L a las 12 horas, 24 horas y 48 horas. La estabilidad se evalúa en porcentaje (%) respecto a la muestra control. (Ver resultados en tabla 5-14)

Para evaluar la influencia de los ciclos de refrigeración y acondicionamiento de la muestra para su análisis (condiciones normales de trabajo) de las muestras, se trabajó con un estándar control de concentración conocida de 9,10 µg/dL, a lo largo de 2,4 y 6 semanas. La estabilidad se evalúa en porcentaje de acuerdo a la concentración inicial de semana 0 y con la siguiente ecuación:

$$Porcentaje = \frac{Concentración\ hallada * 100}{Concentración\ inicial}$$

(Ver resultados en la tabla 5-15)

Tabla 5-14: Resultados de estabilidad en el automuestreador a las 12horas, 24 horas y 48 horas para concentración de 50,0µg/L y 250,0 µg/L, expresados en porcentaje en relación a la muestra control.

	Automuestreador		
Concentración	**12 horas**	**24 horas**	**48 horas**
50,0µg/L	104,0	117,9	77,1
250,0µg/L	102,9	112,2	65,0

Como se evidencia en la tabla anterior, existe una concentración de la muestra, posiblemente por evaporación de la misma, dado que como se mencionó anteriormente, el equipo no posee un sistema cerrado de control ambiental de las condiciones de temperatura de las muestras, y al final, después de dos días, una degradación de la misma. Por consiguiente se aconseja descartar las muestras después de 12 horas de preparadas y estar en el carrusel.

Tabla 5-15: Resultados de estabilidad de una muestra de concentración conocida, en ciclos de refrigeración y atemperado propios del análisis en semana 2, 4 y 6, expresados en porcentaje en relación a la muestra control.

Concentración	Semana 2	Semana 4	Semana 6
9,1 µg/dL	99,7	106,2	93,6

Como se observa en la tabla anterior, existe una estabilidad del analito en condiciones de refrigeración y acondicionamiento de la muestra previo al análisis, propios del análisis del laboratorio, además que observamos que el analito es estable hasta por seis semanas en condiciones normales de almacenamiento (2 a 8 °C)

5.4. Estimación de la Incertidumbre de la metodología bioanalítica.

Para la estimación de la incertidumbre se tuvo como base la Guía del CENAM de la técnica sobre trazabilidad e incertidumbre en las mediciones analíticas que emplean técnicas de espectrofotometría de absorción atómica y de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente.

La incertidumbre de una Medición se define como el parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores atribuidos a un mensurando, es decir que la incertidumbre es un parámetro asociado con el resultado de una medición. (VIM, 2008)

Para la estimación de la incertidumbre se siguieron los siguientes pasos:

- Identificación de lo que se mide.
- Iidentificación las fuentes de incertidumbre.

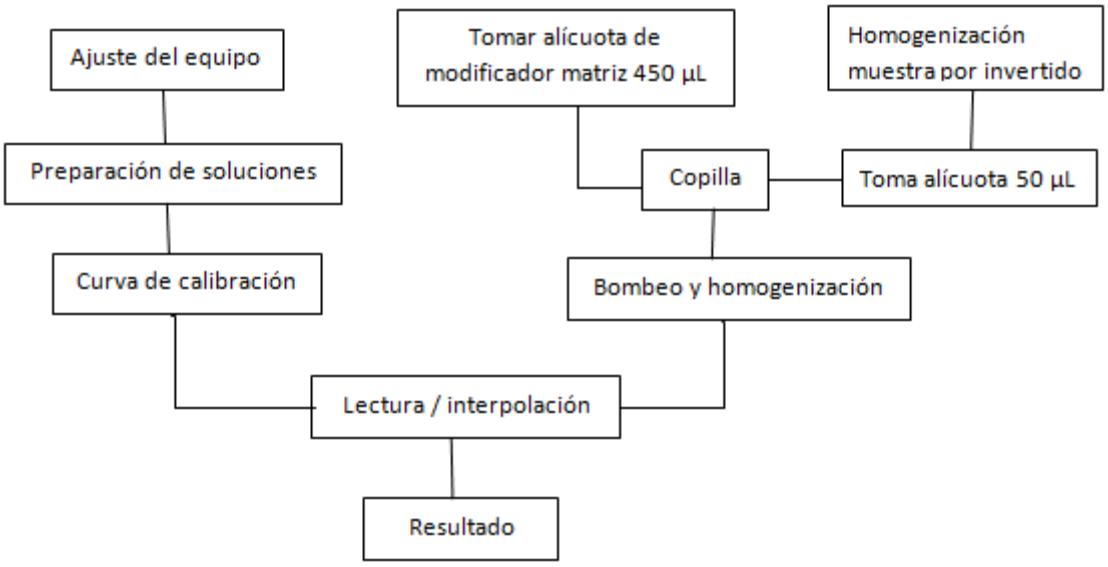
- Cuantificación de los componentes de la incertidumbre estándar y asociación a una distribución.
- Calcular la incertidumbre combinada.
- Calcular la incertidumbre expandida.
- Expresión de la incertidumbre.

Identificación de lo que se mide

El analito objeto del estudio es el Plomo y la validación que se realizó fue en matriz biológica sangre.

El proceso analítico se realiza de forma general de la siguiente manera:

Figura 5-4: Diagrama de flujo del proceso analítico



La fórmula para la medición del analito es:

$$Concentración\ plomo\ \mu g/dL = \frac{y-b}{m} * \frac{1}{10}$$

Donde:

y es la lectura de Absorbancia

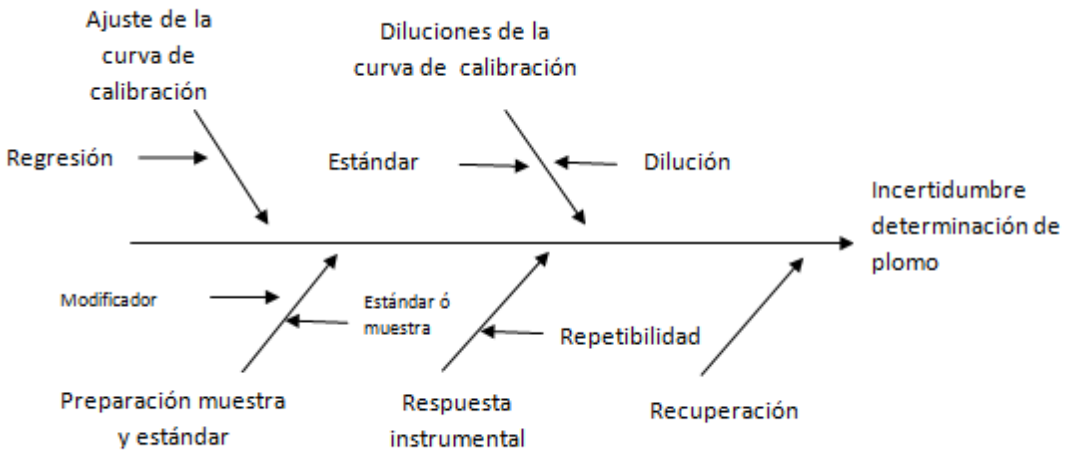
b es el intercepto

m es la pendiente

1/10 es el factor de conversión para pasar de µg/L a µg/dL

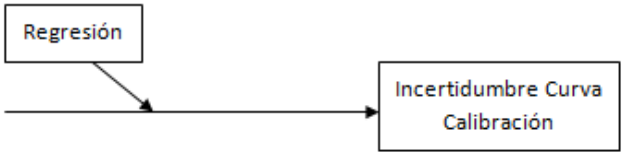
Identificación las fuentes de incertidumbre

Para la identificación de las fuentes de incertidumbre se realiza un diagrama de Causa Efecto.



Identificación de las incertidumbres individuales:

Ajuste de la curva de Calibración



Donde se aplica la siguiente ecuación:

$$u\ (\text{Curva calibración}) = \frac{S}{B_1}\sqrt{\frac{1}{P}+\frac{1}{n}+\frac{(C_0-\bar{C})^2}{Sxx}}$$

$$Sxx = \sum_{j=1}^{n}(C_j-\overline{C})^2$$

Donde:

S = Desviación estándar de los residuos

B_1 = Pendiente

p = Número de determinaciones de lectura de la muestra

n = Número de medidas para calibración

C_o = Concentración de analito

$\bar{C}$= Valor promedio de la concentración de los patrones de la curva de calibración

C_j =Cada una de las concentraciones de los patrones de la curva de calibración

Dilución de la curva de calibración

Determinado mediante:

$$u\ (\text{Curva de calibración (Dilución)}) = \sqrt{u(\text{Estándar})^2+u(\text{Dilución})^2}$$

Donde:

- u (Estándar) se obtiene del certificado del estándar
- u (Dilución) = $\sqrt{u(\text{Balón 100ml})^2+u(\text{Micropipeta}))^2}$ contemplando los volúmenes de alícuotas y volúmenes finales

Para u (Balón) = $\sqrt{u(\text{Calibración})^2+u(\text{Temperatura})^2+u(\text{Precisión})^2}$

u (Calibración) = $\frac{\text{Tolerancia}}{\sqrt{6}}$

u(Temperatura) = Volumen x Coeficiente de expansión x ΔTemperatura

u(Precisión) = Desviación estándar de 5 mediciones de volumen en el balón

Para u (Micropipeta)= $\sqrt{u\ (micropipeta)^2 + u\ (analista)^2}$

u (micropipeta)= Certificado de calibración

u(Analista) = Desviación estándar de 5 mediciones de volumen pesados

Preparación de la muestra y estándar

Se tienen en cuenta cada uno de los volúmenes adicionados.

Respuesta instrumental

Se obtiene a partir de los datos de la repetibilidad y contempla la desviación estándar de los datos y el promedio de estos.

Recuperación

Para este caso se tiene que:

- $u(Recuperación) = Recuperación\sqrt{u\ (precisión)^2 + u\ (estandar)^2}$

u (Precisión) = $\frac{S}{X}$

Dónde: S = Desviación estándar en el ensayo de precisión

X = Promedio

u (Estándar) = $\sqrt{u(\text{Certificado})^2+u(\text{Micropipeta})^2+u(\text{Dilución})^2}$

Los datos se encuentran en el anexo K.

Cuantificación de los componentes de la incertidumbre estándar y asociación a una distribución.

Tabla 5-16: Componentes de la incertidumbre

Descripción	VALOR X	Incertidumbre estándar u(x)	incertidumbre estándar relativa u(x)/x
Curva calibración	250	3,0242	0,0121
Dilución curva calibración	250	0,0816	0,0003
Muestra	0,5	0,0033	0,0066
Respuesta instrumental	0,3489	0,0027	0,0077
Recuperación	0,9831	0,0820	0,0834

Estimación de la incertidumbre combinada

La u(c)/c es calculada sumando los cuadrados de las Incertidumbre estándar relativa u(x)/x y sobre este valor se aplica la raíz cuadrada.

U(c)/c = 0,08489463

Estimación la incertidumbre expandida

Para hallar la incertidumbre expandida se usa el factor de cobertura k: 2.

La incertidumbre está basada en el cálculo de una incertidumbre estándar multiplicada por un factor de cobertura k=2 para un nivel de confianza del 95%.

$U = C \times 2 \times u$

$U = 0{,}1697\ C$ (Se debe aplicar el factor para ajustarlo a las mismas unidades de la concentración)

U= C*0,01697 U=C*0,02

5.5. Análisis de las muestras de sangre de niños por medio de la metodología bioanalítica validada.

Se recolectaron 300 muestras que cumplían con todas las características de calidad y cuyos individuos cumplían con los criterios de inclusión del estudio. La descripción de los individuos en cuanto a edad, género y procedencia se encuentra en el anexo L.

5.5.1. Análisis socio demográfico de los individuos del estudio

Se realizó una caracterización descriptiva de los individuos del estudio, referente a su edad, género y procedencia.

Caracterización según su género

Figura 5-5: Individuos según su género incluidos en el estudio

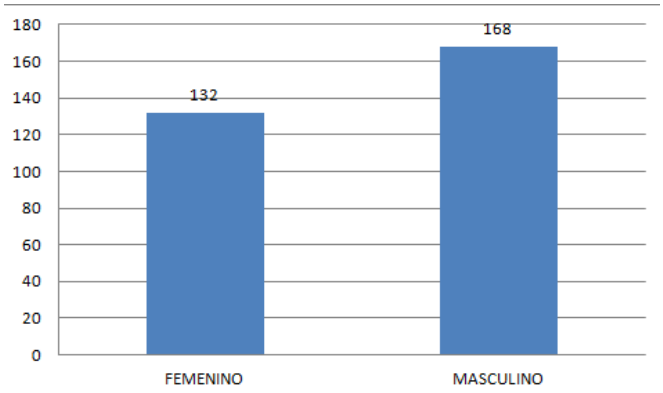
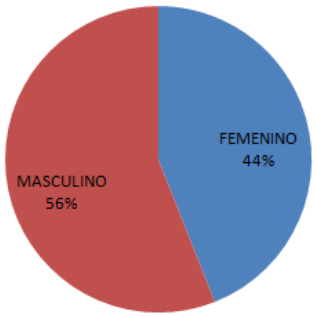


Figura 5-6: Porcentaje de individuos según su género en el estudio

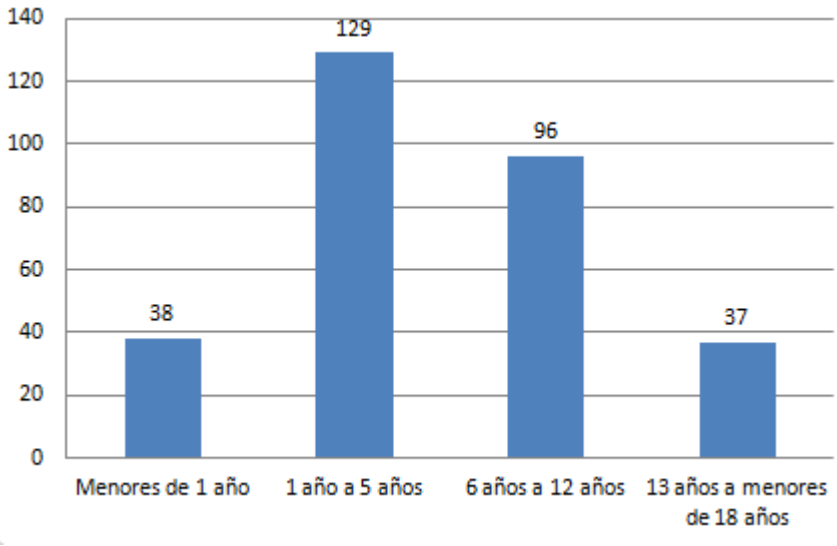


En el estudio se analizaron 56 % de muestras pertenecientes a niños y 44 % de muestras pertenecientes a niñas.

Caracterización según su edad

Para este estudio se clasificaron de acuerdo a la edad así:

Figura 5-7: Número de individuos de acuerdo a la edad



Esta clasificación corresponde a revisiones realizadas en la literatura y dado que:

- **Menores de 1 año**: Se decide tomar el grupo de niños menores de un año, pues es la etapa de lactancia. Pueden ser niños que no estén expuestos directamente a una fuente primaria de contaminación ambiental de Plomo, pero que su madre puede estar expuesta ocupacionalmente a éste y por medio de la leche materna, pueda trasmitir ese Plomo a su hijo. También encontramos que se han realizado diferentes estudios en leche y otros productos lácteos ó en empaques de comida para bebés, como el realizado por Tripathi R. y colaboradores en 1999. Un estudio realizado por Hermoza J. en 2006 determinó en una población de madres lactantes de la Provincia Constitucional del Callo –Perú, un promedio de concentración de Plomo en leche materna que excedía en un 433% los valores permitidos por la OMS.

- **Niños entre 1 año y 5 años**: Estas edades comprenden las edades de gateo, exploración de nuevos objetos, llevarse objetos a la boca, exploración en general y se presenta en estas edades el fenómeno de *Pica*. Aunque por piel la absorción de Plomo es mínima, si se puede tener una exposición a una fuente de polvo con contenido de Plomo y este es llevado a la boca a través de sus manos.

- **Niños de 6 a 12 años**: Constituye el grupo de etapa escolar, y el grupo seleccionado donde se encuentran reportados varios estudios a nivel mundial, de manifestaciones de deficiencia cognitiva por contaminación por este metal.

- **Niños entre 13 y menores de 18 años**: Constituye el grupo donde se puede evidenciar manifestaciones clínicas de una intoxicación crónica (acumulación en tejido óseo). Según Sanin en 1972 se utilizó por primera vez la decidua dental para medir la exposición acumulada a plomo en población infantil. Desafortunadamente no es un biomarcador práctico pues no siempre se encuentran disponibles y la acumulación de plomo en los dientes varía a lo largo de la vida (Sanin, 1998). Entonces el tejido óseo se convierte en el principal compartimento mineral y se toma como un elemento importante en el estudio de la exposición acumulada a plomo. Los análisis químicos revelan que el plomo se almacena en un 70 % en los huesos de los niños (Sanin, 1998). Por otra parte la cantidad de plomo en tejido óseo refleja una exposición acumulada a plomo (Sanin, 1998). Gulson, B, et all.1996

Figura 5-8: Porcentaje de individuos pertenecientes a la clasificación etaria

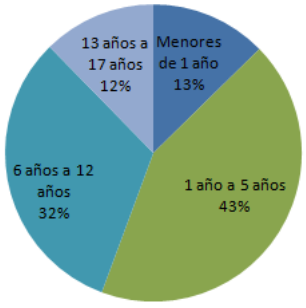
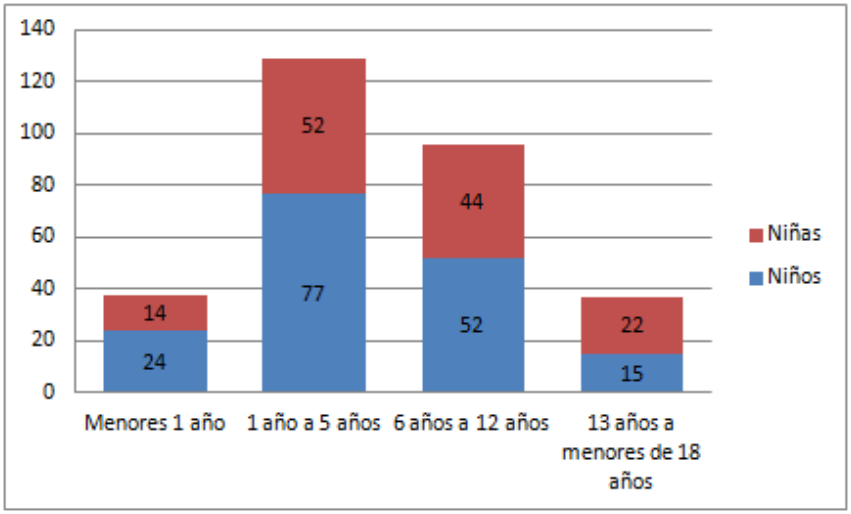


Figura 5-9: Número de individuos pertenecientes a la clasificación etaria de acuerdo al género



En el estudio se analizaron 38 muestras pertenecientes a niños menores de 1 año y mayores de 3 meses, 129 muestras de niños en edades comprendidas de 1 a 5 años, 96 muestras de niños en edades comprendidas de 6 a 12 años y 37 muestras de niños en edades comprendidas de 13 y menores de 18 años.

En los grupos de niños menores de 1 año, 1 a 5 años y 6 a 12 años se analizaron mayor cantidad de muestras pertenecientes al género masculino

De acuerdo a su procedencia

Figura 5-10: Número de individuos de acuerdo al lugar de procedencia

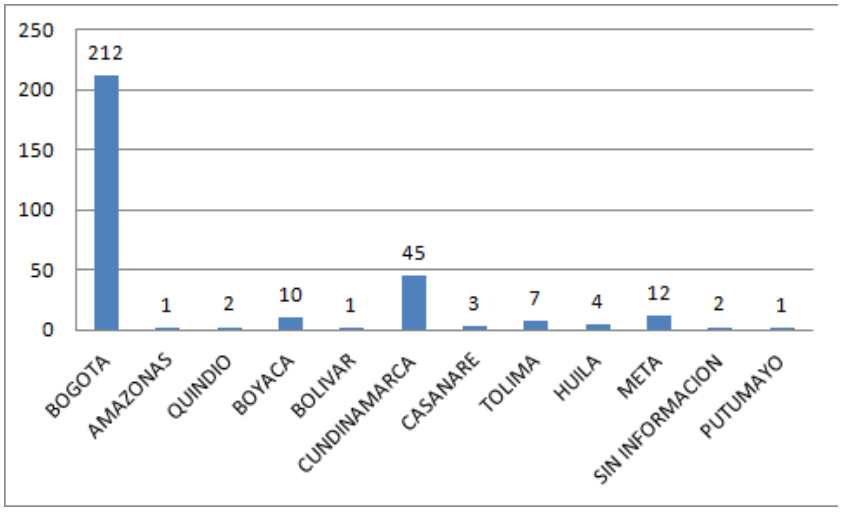
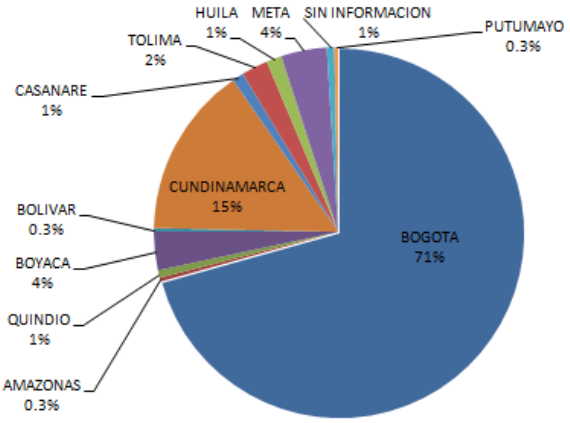


Figura 5-11: Porcentaje de individuos de acuerdo al lugar de procedencia



Lugar Procedencia	Individuos	Porcentaje
Bogotá	212	71
Cundinamarca	45	15
Meta	12	4
Boyacá	10	3
Tolima	7	2
Huila	4	1
Casanare	3	1
Quindío	2	1
S/I	2	1
Bolívar	1	0,3
Amazonas	1	0,3
Putumayo	1	0,3

Se analizaron 212 muestras pertenecientes a individuos que viven en Bogotá, 45 muestras de individuos que viven en Cundinamarca, 12 muestras de individuos que viven en Meta, 10 muestras de individuos que viven en Boyacá, 7 muestras de individuos que viven en Tolima, 4 muestras de individuos que viven en Huila, 3 muestras de individuos que viven en Casanare, 2 muestras de individuos que viven en Quindío, 1 muestra de individuos que vive en Putumayo, 1 muestra de individuos que vive en Bolívar, 1 muestra de individuos que vive en Amazonas y 2 muestras de individuos que no tienen información de procedencia.

Como se observa en las figuras 5-9 y 5-10 el mayor porcentaje de muestras provienen de Bogotá y Cundinamarca, con un 71% y 15% de muestras respectivamente.

5.5.2. Análisis de muestras

El análisis de las muestras recolectadas se realizó aplicando la metodología bioanalítica validada en el Laboratorio de Toxicología de la Facultada de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.

Para la realización de los análisis se tuvo en cuenta un protocolo de aseguramiento de calidad, que contempla los siguientes pasos:

1. Todo el material debió someterse a tratamiento de limpieza expuesto en el anexo E del presente documento.
2. El gas argón debe estar en la entrada del equipo a una presión alrededor de 13 psi.
3. Se realizó una limpieza del tubo de grafito antes de iniciar el análisis.
4. Se realizó una limpieza y purga del tip de toma de la muestra.
5. La secuencia tuvo en su orden: Blanco, Estándar de 25,0µg/L, Estándar de 50,0 µg/L, Estándar de 75,0 µg/L, Estándar de 100,0 µg/L, Estándar de 125,0 µg/L y Estándar de 250,0 µg/L, Estándar de 500,0 µg/L, Blanco, Control de 9,1 µg/dL, Control de 20,6 µg/dL, Blanco, Muestra 1, Muestra 2, Muestra 3, Blanco, Muestra 4, Muestra 5, Muestra 6, Blanco.
6. Blanco Final.

Las concentraciones de los controles se evalúan en exactitud y no deben variar más del ±15 %, aplicando la fórmula de error máximo permitido, para que la corrida tenga validez.

Se coloca dentro de la secuencia un Estándar de 500,0 µg/L que no es tenido en cuenta dentro del rango de análisis, seguido de un blanco de reactivos, esto con el fin de evaluar entre esa corrida el efecto memoria o carry over, verificando que el blanco corrido después de este estándar no reporte una señal mayor del 20% del límite de cuantificación, de ser así, se debe invalidar la corrida pues el equipo no está realizando una correcta limpieza en su sistema de inyección entre corrida y corrida, lo que puede desencadenar en una contaminación cruzada de muestra a muestra.

Este protocolo se siguió para cada una de las corridas analíticas del análisis de las 300 muestras recolectadas.

En la Tabla 5-17 se presentan los resultados del análisis en sangre. Los valores arrojados por el equipo están expresados en µg/L, se deben transformar a µg/dL que es la unidad internacionalmente utilizada para expresar la concentración de Plomo en sangre. Para valores menores de 0,065 µg/dL (Limite de Detección) el resultado se expresa como *Menor de 0,065* µg/dL, para valores menores de 2,50 µg/dL (Limite de Cuantificación) el resultado se expresa como *Menor de 2,50 µg/dL*, para valores mayores de 2,50 µg/dL hasta 25,0 µg/dL el resultado se expresa numéricamente con la incertidumbre.

Como se observa en la Tabla 5-17 de los resultados obtenidos por el análisis de Plomo en sangre, ninguna muestra analizada se encuentra por encima del límite establecido por el CDC, de 5 µg/dL.

Tabla 5-17: Resultados de los niveles sanguíneos de Plomo

Número muestra	Resultado final	Incertidumbre de la medida +/-
1	< 2,50 µg/dL	N.A.
2	< 2,50 µg/dL	N.A.
3	< 2,50 µg/dL	N.A.
4	< 2,50 µg/dL	N.A.
5	< 2,50 µg/dL	N.A.
6	< 2.50 µg/dL	N.A.
7	< 2.50 µg/dL	N.A.
8	< 2.50 µg/dL	N.A.
9	< 2.50 µg/dL	N.A.
10	< 2.50 µg/dL	N.A.
11	< 2.50 µg/dL	N.A.
12	2,86 µg/dL	0,06
13	< 2.50 µg/dL	N.A.
14	< 2.50 µg/dL	N.A.
15	< 2.50 µg/dL	N.A.
16	< 2.50 µg/dL	N.A.
17	< 2.50 µg/dL	N.A.
18	< 2.50 µg/dL	N.A.
19	< 2.50 µg/dL	N.A.
20	< 2.50 µg/dL	N.A.
21	< 2.50 µg/dL	N.A.
22	< 2,50 µg/dL	N.A.
23	< 2,50 µg/dL	N.A.
24	< 2,50 µg/dL	N.A.
25	< 2,50 µg/dL	N.A.
26	< 2,50 µg/dL	N.A.
27	2,66 µg/dL	0,05
28	< 2,50 µg/dL	N.A.
29	< 2,50 µg/dL	N.A.
30	< 2,50 µg/dL	N.A.
31	< 0,065 µg/dL	N.A.
32	< 2,50 µg/dL	N.A.
33	< 2,50 µg/dL	N.A.
34	< 2,50 µg/dL	N.A.
35	< 2,50 µg/dL	N.A.
36	< 2,50 µg/dL	N.A.
37	2,58 µg/dL	0,05
38	< 2,50 µg/dL	N.A.
39	< 2,50 µg/dL	N.A.
40	< 2,50 µg/dL	N.A.
41	< 2,50 µg/dL	N.A.
42	< 2,50 µg/dL	N.A.
43	< 2,50 µg/dL	N.A.

Número muestra	Resultado final	Incertidumbre de la medida +/-
151	4,11 µg/dL	0,08
152	< 2,50 µg/dL	N.A.
153	< 2,50 µg/dL	N.A.
154	< 2,50 µg/dL	N.A.
155	< 2.50 µg/dL	N.A.
156	< 2.50 µg/dL	N.A.
157	< 2.50 µg/dL	N.A.
158	< 2.50 µg/dL	N.A.
159	< 0,065 µg/dL	N.A.
160	2,58 µg/dL	0,05
161	< 2.50 µg/dL	N.A.
162	< 2.50 µg/dL	N.A.
163	< 0,065 µg/dL	N.A.
164	< 0,065 µg/dL	N.A.
165	< 2.50 µg/dL	N.A.
166	< 2.50 µg/dL	N.A.
167	< 2.50 µg/dL	N.A.
168	< 2.50 µg/dL	N.A.
169	< 2.50 µg/dL	N.A.
170	< 2.50 µg/dL	N.A.
171	< 0,065 µg/dL	N.A.
172	< 0,065 µg/dL	N.A.
173	< 0,065 µg/dL	N.A.
174	< 2,50 µg/dL	N.A.
175	< 2,50 µg/dL	N.A.
176	< 2,50 µg/dL	N.A.
177	< 2,50 µg/dL	N.A.
178	< 2,50 µg/dL	N.A.
179	< 2,50 µg/dL	N.A.
180	< 2,50 µg/dL	N.A.
181	< 2,50 µg/dL	N.A.
182	< 2,50 µg/dL	N.A.
183	< 2,50 µg/dL	N.A.
184	< 2,50 µg/dL	N.A.
185	< 2,50 µg/dL	N.A.
186	< 2,50 µg/dL	N.A.
187	< 2,50 µg/dL	N.A.
188	< 2,50 µg/dL	N.A.
189	< 2,50 µg/dL	N.A.
190	< 2,50 µg/dL	N.A.
191	< 2,50 µg/dL	N.A.
192	< 2,50 µg/dL	N.A.
193	< 2,50 µg/dL	N.A.

Número muestra	Resultado final	Incertidumbre de la medida +/-
44	3,36 µg/dL	0,07
45	3,03 µg/dL	0,06
46	< 2,50 µg/dL	N.A.
47	< 2,50 µg/dL	N.A.
48	< 2,50 µg/dL	N.A.
49	< 2,50 µg/dL	N.A.
50	< 2,50 µg/dL	N.A.
51	< 2,50 µg/dL	N.A.
52	2,88 µg/dL	0,06
53	< 2,50 µg/dL	N.A.
54	< 2,50 µg/dL	N.A.
55	< 2,50 µg/dL	N.A.
56	< 2,50 µg/dL	N.A.
57	< 2,50 µg/dL	N.A.
58	< 2,50 µg/dL	N.A.
59	< 2,50 µg/dL	N.A.
60	2,68 µg/dL	0,05
61	< 2,50 µg/dL	N.A.
62	< 2,50 µg/dL	N.A.
63	< 2,50 µg/dL	N.A.
64	< 2,50 µg/dL	N.A.
65	< 2,50 µg/dL	N.A.
66	< 2,50 µg/dL	N.A.
67	< 2,50 µg/dL	N.A.
68	< 2,50 µg/dL	N.A.
69	< 2,50 µg/dL	N.A.
70	< 2,50 µg/dL	N.A.
71	< 2,50 µg/dL	N.A.
72	< 2,50 µg/dL	N.A.
73	< 2,50 µg/dL	N.A.
74	< 2,50 µg/dL	N.A.
75	< 2,50 µg/dL	N.A.
76	< 2,50 µg/dL	N.A.
77	< 2,50 µg/dL	N.A.
78	< 2,50 µg/dL	N.A.
79	2,92 µg/dL	0,06
80	< 2,50 µg/dL	N.A.
81	< 2,50 µg/dL	N.A.
82	3,86 µg/dL	0,08
83	< 2,50 µg/dL	N.A.
84	< 2,50 µg/dL	N.A.
85	< 2,50 µg/dL	N.A.
86	< 2,50 µg/dL	N.A.
87	3,20 µg/dL	0,06
88	< 2,50 µg/dL	N.A.
89	< 2,50 µg/dL	N.A.
90	< 2,50 µg/dL	N.A.
91	< 2,50 µg/dL	N.A.
92	4,84 µg/dL	N.A.

Número muestra	Resultado final	Incertidumbre de la medida +/-
194	3,78 µg/dL	0,08
195	< 2,50 µg/dL	N.A.
196	< 2,50 µg/dL	N.A.
197	< 2,50 µg/dL	N.A.
198	< 2,50 µg/dL	N.A.
199	< 2,50 µg/dL	N.A.
200	< 2,50 µg/dL	N.A.
201	< 2,50 µg/dL	N.A.
202	< 2,50 µg/dL	N.A.
203	< 2,50 µg/dL	N.A.
204	< 2,50 µg/dL	N.A.
205	< 2,50 µg/dL	N.A.
206	< 2,50 µg/dL	N.A.
207	< 2,50 µg/dL	N.A.
208	< 2,50 µg/dL	N.A.
209	< 2,50 µg/dL	N.A.
210	< 2,50 µg/dL	N.A.
211	< 2,50 µg/dL	N.A.
212	< 2,50 µg/dL	N.A.
213	< 2,50 µg/dL	N.A.
214	< 2,50 µg/dL	N.A.
215	< 2,50 µg/dL	N.A.
216	< 2,50 µg/dL	N.A.
217	< 2,50 µg/dL	N.A.
218	< 2,50 µg/dL	N.A.
219	< 2,50 µg/dL	N.A.
220	< 2,50 µg/dL	N.A.
221	< 2,50 µg/dL	N.A.
222	< 2,50 µg/dL	N.A.
223	< 2,50 µg/dL	N.A.
224	< 2,50 µg/dL	N.A.
225	< 2,50 µg/dL	N.A.
226	< 2,50 µg/dL	N.A.
227	< 2,50 µg/dL	N.A.
228	< 2,50 µg/dL	N.A.
229	< 2,50 µg/dL	N.A.
230	< 2,50 µg/dL	N.A.
231	< 2,50 µg/dL	N.A.
232	4,26 µg/dL	0,09
233	< 2,50 µg/dL	N.A.
234	< 2,50 µg/dL	N.A.
235	< 2,50 µg/dL	N.A.
236	< 2,50 µg/dL	N.A.
237	< 2,50 µg/dL	N.A.
238	< 2,50 µg/dL	N.A.
239	< 2,50 µg/dL	N.A.
240	< 2,50 µg/dL	N.A.
241	< 2,50 µg/dL	N.A.
242	2,89 µg/dL	0,06

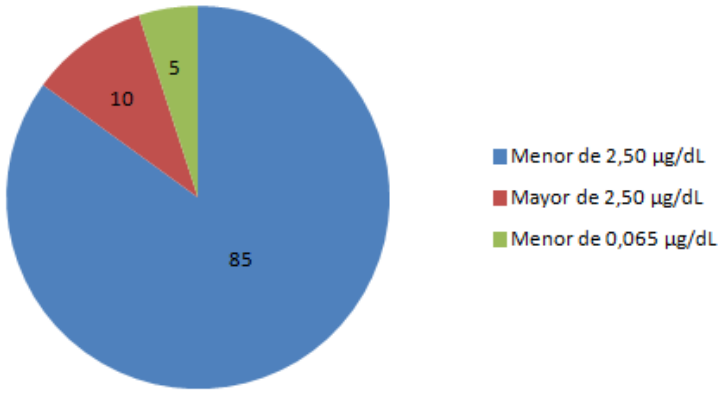
Número muestra	Resultado final	Incertidumbre de la medida +/-
93	< 2,50 µg/dL	N.A.
94	< 2,50 µg/dL	N.A.
95	< 2,50 µg/dL	N.A.
96	< 2,50 µg/dL	N.A.
97	< 2,50 µg/dL	N.A.
98	< 2,50 µg/dL	N.A.
99	< 2,50 µg/dL	N.A.
100	3,09 µg/dL	0,06
101	3,96 µg/dL	0,08
102	< 2,50 µg/dL	N.A.
103	< 2,50 µg/dL	N.A.
104	< 2,50 µg/dL	N.A.
105	< 2,50 µg/dL	N.A.
106	< 2,50 µg/dL	N.A.
107	< 0,065 µg/dL	N.A.
108	< 2,50 µg/dL	N.A.
109	< 2,50 µg/dL	N.A.
110	< 2,50 µg/dL	N.A.
111	< 2,50 µg/dL	N.A.
112	< 2,50 µg/dL	N.A.
113	< 2,50 µg/dL	N.A.
114	< 2,50 µg/dL	N.A.
115	< 0,065 µg/dL	N.A.
116	< 2,50 µg/dL	N.A.
117	< 0,065 µg/dL	N.A.
118	< 2,50 µg/dL	N.A.
119	< 2,50 µg/dL	N.A.
120	< 2,50 µg/dL	N.A.
121	< 0,065 µg/dL	N.A.
122	< 2,50 µg/dL	N.A.
123	< 2,50 µg/dL	N.A.
124	< 2,50 µg/dL	N.A.
125	< 0,065 µg/dL	N.A.
126	< 2,50 µg/dL	N.A.
127	< 2,50 µg/dL	N.A.
128	< 0,065 µg/dL	N.A.
129	< 2,50 µg/dL	N.A.
130	< 0,065 µg/dL	N.A.
131	< 2,50 µg/dL	N.A.
132	4,04 µg/dL	0,08
133	< 2,50 µg/dL	N.A.
134	3,65 µg/dL	0,07
135	3,04 µg/dL	0,06
136	3,57 µg/dL	0,07
137	< 2,50 µg/dL	N.A.
138	< 2,50 µg/dL	N.A.
139	3,81 µg/dL	0,08
140	4,12 µg/dL	0,08
141	4,88 µg/dL	0,09
142	3,60 µg/dL	0,07

Número muestra	Resultado final	Incertidumbre de la medida +/-
243	< 2,50 µg/dL	N.A.
244	< 2,50 µg/dL	N.A.
245	< 2,50 µg/dL	N.A.
246	< 2,50 µg/dL	N.A.
247	< 2,50 µg/dL	N.A.
248	< 2,50 µg/dL	N.A.
249	< 2,50 µg/dL	N.A.
250	< 2,50 µg/dL	N.A.
251	< 2,50 µg/dL	N.A.
252	< 2,50 µg/dL	N.A.
253	< 2,50 µg/dL	N.A.
254	< 2,50 µg/dL	N.A.
255	< 2,50 µg/dL	N.A.
256	< 2,50 µg/dL	N.A.
257	< 2,50 µg/dL	N.A.
258	< 2,50 µg/dL	N.A.
259	< 2,50 µg/dL	N.A.
260	< 2,50 µg/dL	N.A.
261	< 2,50 µg/dL	N.A.
262	< 2,50 µg/dL	N.A.
263	< 2,50 µg/dL	N.A.
264	< 2,50 µg/dL	N.A.
265	2,57 µg/dL	0,05
266	< 2,50 µg/dL	N.A.
267	< 2,50 µg/dL	N.A.
268	< 2,50 µg/dL	N.A.
269	< 2,50 µg/dL	N.A.
270	< 2,50 µg/dL	N.A.
271	< 2,50 µg/dL	N.A.
272	< 2,50 µg/dL	N.A.
273	< 2,50 µg/dL	N.A.
274	< 2,50 µg/dL	N.A.
275	< 2,50 µg/dL	N.A.
276	< 2,50 µg/dL	N.A.
277	< 2,50 µg/dL	N.A.
278	< 2,50 µg/dL	N.A.
279	< 2,50 µg/dL	N.A.
280	< 2,50 µg/dL	N.A.
281	< 2,50 µg/dL	N.A.
282	< 2,50 µg/dL	N.A.
283	< 2,50 µg/dL	N.A.
284	< 2,50 µg/dL	N.A.
285	< 2,50 µg/dL	N.A.
286	< 2,50 µg/dL	N.A.
287	< 2,50 µg/dL	N.A.
288	2,61 µg/dL	0,05
289	< 2,50 µg/dL	N.A.
290	< 2,50 µg/dL	N.A.
291	< 2,50 µg/dL	N.A.
292	2,74 µg/dL	0,05

Número muestra	Resultado final	Incertidumbre de la medida +/-
143	< 2,50 µg/dL	N.A.
144	< 2,50 µg/dL	N.A.
145	< 2,50 µg/dL	N.A.
146	3,82 µg/dL	0,08
147	2,91 µg/dL	0,06
148	< 2,50 µg/dL	N.A.
149	< 2,50 µg/dL	N.A.
150	< 2,50 µg/dL	N.A.

Número muestra	Resultado final	Incertidumbre de la medida +/-
293	< 2,50 µg/dL	N.A.
294	< 2,50 µg/dL	N.A.
295	< 2,50 µg/dL	N.A.
296	< 2,50 µg/dL	N.A.
297	< 2,50 µg/dL	N.A.
298	< 2,50 µg/dL	N.A.
299	< 2,50 µg/dL	N.A.
300	< 2,50 µg/dL	N.A.

Figura 5-12: Porcentaje de niños según resultado de análisis de concentraciones sanguíneas de Plomo



El 5 % de las muestras están por debajo del límite de detección, en el 85% de las muestras analizadas su resultado es menor de 2,50 µg/dL y el 10 % de las muestras analizadas su concentración es mayor de 2,50 µg/dL y menor de 5,00 µg/dL.

Análisis de las concentraciones sanguíneas de Plomo encontradas en relación a los grupos etarios

- Menores de 1 año

Tabla 5-18: Número de individuos y porcentaje de acuerdo a las concentraciones sanguíneas de Plomo encontradas, para niños menores de 1 año

	Niños	Niñas	Total	Porcentaje
Menores 0,065 µg/dL	4	0	4	10
Menores 2,50 µg/dL	18	13	31	82
Mayores 2,50 µg/dL	2	1	3	8
Total	24	14	38	100

Como se observa en la tabla anterior, el 82% de los niños que se encuentran clasificados en este grupo, presentan concentraciones de Plomo menores de 2,50 µg/dL, 3 niños presentan concentraciones mayores de 2,50 µg/dL, siendo el menor valor 2,58 µg/dL y el mayor 3,57 µg/dL.

- Entre 1 año a 5 años

Tabla 5-19: Número de individuos y porcentaje de acuerdo a las concentraciones sanguíneas de Plomo encontradas, para niños entre 1 año a 5 años

	Niños	Niñas	Total	Porcentaje
Menores 0,065 µg/dL	3	1	4	3
Menores 2,50 µg/dL	68	43	111	86
Mayores 2,50 µg/dL	6	8	14	11
Total	77	52	129	100

Como se observa en la tabla anterior, el 86% de los niños que se encuentran clasificados en este grupo, presentan concentraciones de Plomo menores de 2,50 µg/dL, 14 niños presentan concentraciones mayores de 2,50 µg/dL, siendo el menor valor 2,57 µg/dL y el mayor 4,11 µg/dL.

- Entre 6 años a 12 años

Tabla 5-20: Número de individuos y porcentaje de acuerdo a las concentraciones sanguíneas de Plomo encontradas, para niños entre 6 años a 12 años

	Niños	Niñas	Total	Porcentaje
Menores 0,065 µg/dL	3	2	5	5
Menores 2,50 µg/dL	45	33	78	81
Mayores 2,50 µg/dL	4	9	13	14
Total	52	44	96	100

Como se observa en la tabla anterior, el 81% de los niños que se encuentran clasificados en este grupo, presentan concentraciones de Plomo menores de 2,50 µg/dL, 14 niños presentan concentraciones mayores de 2,50 µg/dL, siendo el menor valor 2,88 µg/dL y el mayor 4,88 µg/dL.

- Entre 13 años a 18 años

Tabla 5-21: Número de individuos y porcentaje de acuerdo a las concentraciones sanguíneas de Plomo encontradas, para niños entre 13 años a menores de 18 años

	Niños	Niñas	Total	Porcentaje
Menor 0,065 µg/dL	0	1	1	3
Menores 2,50 µg/dL	15	20	35	94
Mayores 2,50 µg/dL	0	1	1	3
Total	15	22	37	100

Como se observa en la tabla anterior, el 94% de los niños que se encuentran clasificados en este grupo, presentan concentraciones de Plomo menores de 2,50 µg/dL, 1 niño presenta una concentración mayores de 2,50 µg/dL, siendo esta de 2,66 µg/dL.

Con los resultados obtenidos podemos realizar algunas asociaciones, sin que los resultados de estas reflejen la situación actual de la población infantil, sólo ofrecen una orientación y ubicación para dar inicio a nuevos estudios de investigación.

- **Concentración vs Genero:**

Para abordar este análisis se realizan las tablas de frecuencias absolutas y de porcentajes con el fin de observar como es la distribución de los datos con respecto al Género.

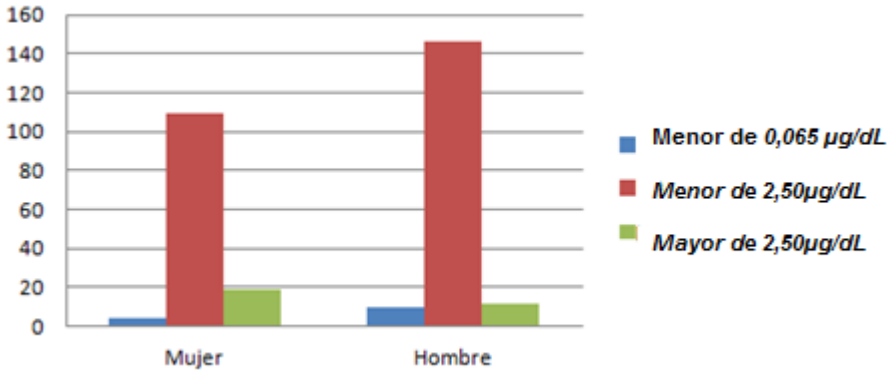
Tabla 5-22: Frecuencias Absolutas, Concentración vs Género

Concentración	Femenino	Masculino	Total
Menor 0,065 µg/dL	4	10	14
Menor 2,50 µg/dL	109	146	255
Mayor 2,50 µg/dL	19	12	31
Total	132	168	300

Tabla 5-23: Porcentajes (Total Columna) Concentración vs Género

Concentración	Femenino	Masculino	Total
Menor 0,065 µg/dL	3%	6%	5%
Menor 2,50 µg/dL	83%	87%	85%
Mayor 2,50 µg/dL	14%	7%	10%
Total	100%	100%	100%

Figura 5-13: Concentración vs Género



Primero se observa el peso que toma la categoría "*Menor 2,50 µg/dL"* que representa el *85%* de los datos, contra un *10%* y un *5%* de las categorías de "*Mayor 2,50 µg/dL"* Y *"Menor 0,065 µg/dL".* Esto hace que la muestra sea difícil de comparar en la distribución de los datos, sin embargo se observa como el comportamiento entre hombres y mujeres es muy similar luego se pensaría que la distribución entre hombres y mujeres es la misma, luego se espera que el comportamiento de la variable dosis no se vea influenciado por el tipo de sexo que posee la persona.

Para determinar esta relación y dado que ambas variables son categóricas, se emplea el test de independencia basado en una Chi-Cuadrado el cual tiene como hipótesis nula y alterna:

$$H_0 = Las\ variables\ son\ independientes$$

$$vs$$

$$H_1 = Las\ variables\ poseen\ algún\ tipo\ de\ asociación$$

Este test se realizó en el programa estadístico R, usando simulación de Monte Carlo para estimar el valor del P-valor, usando 10000 réplicas, obteniendo un *valor-P* del *0.06* que para un nivel de significancia del *5%* no se rechaza la hipótesis nula mientras que para un nivel del *10%* sí.

Pearson's Chi-squared test with simulated p-value (based on 10000 Replicates)

Data: tabla_2

X-squared = 3.8447, Df = NA, p-value = 0.05829

Comparando lo observado en el Gráfico 5-12 con lo obtenido en el test, se observa que la distribución en ambas categorías es prácticamente la misma, luego se puede concluir que a pesar del resultado del test, realmente no existe una mayor influencia por parte de la variable *Género* hacia la *Concentración*. Esto se debe al peso tan grande que posee la categoría Menor 2,50 *µg/dL*, donde cualquier cambio en esta categoría hace que el test se vea muy influenciado, arrojando este valor tan cercano al 5% de significancia.

- **Concentración vs Edad:**

Para abordar este análisis se realizan las tablas de frecuencias absolutas y de porcentajes (Tablas 5.24 y 5.25), con el fin de observar como es la distribución de los datos con respecto al Edad.

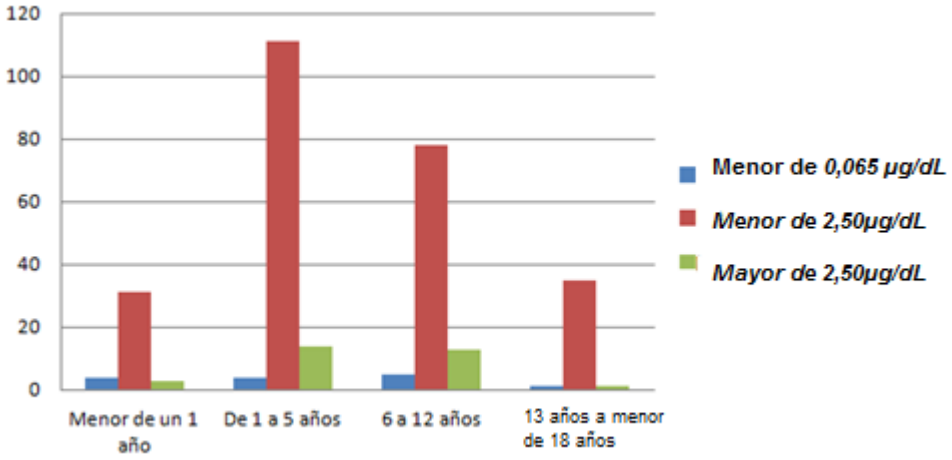
Tabla 5-24: Frecuencias Absolutas, Concentración vs Edad

Concentración	Menor de un 1 año	De 1 a 5 años	6 a 12 años	13 a menor de 18 años	Total
Menor 0,065 µg/dL	4	4	5	1	14
Menor 2,50 µg/dL	31	111	78	35	255
Mayor 2,50 µg/dL	3	14	13	1	31
Total	38	129	96	37	300

Tabla 5-25: Porcentajes (Total Columna) Concentración vs Edad

Concentración	Menor de un 1 año	De 1 a 5 años	6 a 12 años	13 a menor de 18 años	Total
Menor 0,065 µg/dL	11%	3%	5%	3%	5%
Menor 2,50 µg/dL	82%	86%	81%	95%	85%
Mayor 2,50 µg/dL	8%	11%	14%	3%	10%
Total	100%	100%	100%	100%	100%

Figura 5-14: Concentración vs Edad



Primero se observa el peso que toma la categoría "*Menor 2,50 µg/dL"* que representa el *85%* de los datos es la que más determina la distribución de los casos, al igual que en el caso anterior, por esta razón en el caso pasado se rechazó la hipótesis nula, debido al peso que posee esta categoría en la muestra.

Al igual que en caso anterior se observa la distribución porcentual y se observa que la distribución porcentual para cada intervalo de edad es muy similar, la cual también se aprecia en el Gráfico 5.13.

Igualmente, para determinar esta relación y dado que ambas variables son categóricas, se emplea el test de independencia basado en una Chi-Cuadrado. Este test se realizó también con el programa estadístico R, obteniendo un *valor-P* del *0.298* que para un nivel de significancia del *5%*.

Pearson's Chi-squared test with simulated p-value (based on 10000 Replicates)

Data: tabla_1_2

X-squared = 3.699, Df = NA, p-value = 0.298

Concluyendo así, que debido al peso tan fuerte de la categoría menor 2,50 *µg/dL*, es difícil determinar si *efectivamente* existe algún tipo de asociación entre las variables *Género, Edad* y *Concentración.* Sin embargo se determina que la variable Género es la

que más se relaciona con la Concentración y que parece más influenciar su comportamiento.

Como la mayoría de los niños incluidos en el estudio, pertenecen a Bogotá, se realiza un estudio de tendencia según Localidad en que habitan los menores, siendo una exploración no concluyente sobre el estado de todos los niños que habitan en Bogotá, es sin embargo, una exploración orientativa de su situación.

- **Concentración Vs Lugar de Procedencia**

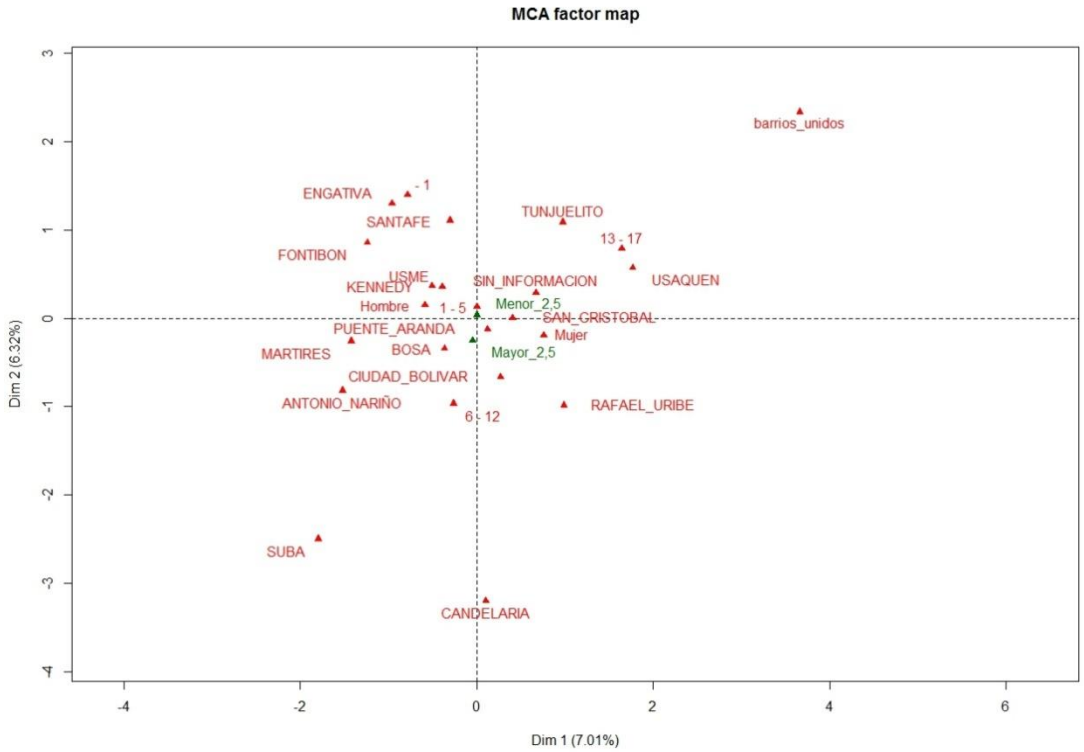
De los 31 niños que obtienen concentraciones mayores de 2,50 µg/dL, 25 pertenecen a la ciudad de Bogotá, 4 a Cundinamarca y 2 a Boyacá. De estos resultados observamos que los 6 individuos con valores mayores de 4,00 µg/dL pertenecen a la ciudad de Bogotá, en un 50% a la localidad de Usme.

Localidad de Bogotá que presenta mayor concentración.

A manera de estudio descriptivo, basado en la muestra de 300 niños obtenida, y de la cual 212 niños pertenecen a la ciudad de Bogotá, se realizó un análisis de correspondencias múltiples (ACM), para observar que localidades tienden a asociarse con las concentraciones más altas de Plomo en la sangre.

Es importante insistir que este es solo un análisis exploratorio con el que no se puede realizar ningún tipo de inferencia, basada en los resultados obtenidos, pero invita a la comunidad académica y científica a abordar estudios por localidades en la ciudad de Bogotá.

Figura 5-15: Análisis de Correspondencia Múltiple



El análisis en componentes principales en una técnica multivariada, que determina las características más influyentes en la nube de individuos, basado en un centro de gravedad, encuentra las categorías promedio ubicándolas en el centro de la nube, y a partir de este centro, calcula las coordenadas de cada individuo basado en sus respuestas y dependiendo de cuantas dimensiones resulte el análisis multivariado.

En el ACM los ejes 1 y 2 son los que resultan más importantes y los porcentajes al lado de estos reflejan el porcentaje de inercia (o varianza) capturada dentro del plano, entre mayor sea este porcentaje, mejor será la interpretación y la realización de las variables dentro de la nube.

Observando la salida, se presenta la ubicación de las categorías observadas. Basado en este análisis se puede ver como las categorías más comunes resultan "*Menor 2,50 µg/dL"* y "*1 - 5*" ésta última siendo el intervalo de edad de 1 a 5 años de edad, que en los anteriores análisis observamos los pesos tan grandes que estas dos categorías presentaban en la base.

Finalmente para el objetivo del estudio observamos como la categoría "*Mayor 2,50 µg/dL*" toma valores cercanos a las localidades Bosa, Kennedy y Usme, y como las categorías de la variable Género se ubica justo en diagonal una de otra significa que no discriminan de una forma correcta la variable observada, sin embargo se puede apreciar como los hombres tienden a tomar más datos mayores a 2,50 µg/dL que las mujeres, como característica final se puede apreciar que el intervalo de edad que parece ser influyente es la de los 6 a los 12 años.

Con esto se determina que las localidades que tienden a tomar valores más altos son Bosa, Kennedy y Usme, contemplando también aunque no tan cercano la localidad de San Cristóbal, sin embargo se destaca la importancia de que no se realiza ninguna inferencia al respecto y que este resultado es solo descriptivo para esta muestra. Así es el caso del estudio desarrollado por Geney y colaboradores, donde obtienen seis menores residentes de las localidades de San Cristóbal, Rafael Uribe Uribe y Antonio Nariño con concentraciones altas de plomo, pudiendo indicar que geográficamente allí hay una mayor exposición al plomo respecto a otras áreas de la ciudad, aunque se explica también que por el pequeño número de niños no se puede realizar inferencias poblacionales, solo plantear la necesidad de detectar y controlar las fuentes de exposición de las localidades mencionadas. (Geney et al, 2016)

La sangre es la matriz biológica que se emplea con mayor frecuencia para evaluar la exposición aguda, dando la posibilidad de obtener la dosis promedio recibida en las semanas anteriores y se puede repetir o confirmar resultados con el remanente de la misma. (Amador, 2015) Por esta razón se decidió tomar esta matriz para evaluar la concentración de Plomo en niños, realizando el análisis de estas mediante la técnica bioanalítica validada y haciendo uso de la rama de la Toxicología que es la Toxicología analítica. La Organización Mundial de la Salud ha declarado que los niños son el grupo social más vulnerable a las amenazas ambientales, pues como se ha explicado anteriormente, tienen diferencia biológica a un adulto, su organismo está en formación y los tejidos aun están inmaduros (como en el caso del Sistema Nervioso Central). (Geney et al, 2016)

Aunque los valores obtenidos de concentración de plomo en sangre se encuentran por debajo del nivel permisible para población infantil según el CDC de 5 µg/dL, no se descarta la posibilidad de que con valores por debajo de este se presenten problemas de salud y efectos manifestándose en sensibilidad auditiva, habilidades motoras, disminución del Coeficiente intelectual y perdida de habilidades diarias de correr, trazar, etc. (CDC, 2015) (Ascona et al, 2000) (Kyoung, 2016)

Es el caso de la investigación realizada por Kyoung et al 2016, donde en un estudio de cohorte entre los años 2005 y 2010 se investigaron los factores de riesgo ambientales y los desórdenes en la etapa escolar , mediante análisis de concentraciones de Plomo en sangre en asociación con examen exploratorio y aplicando un cuestionario de Screening Espectro Autista (ASSQ) . Los resultados demostraron una asociación entre la concentración de Plomo en la sangre a los 7-8 años de edad y comportamientos relacionados con autismo de acuerdo a la evaluación con el ASSQ. Los autores manifiestan al final de su estudio que aunque se han realizado reglamentaciones para disminuir las fuentes de contaminación de Plomo, como aquellas reglamentaciones para contenido en gasolina, pintura, juguetes, etc; la exposición a Plomo en bajos niveles pueden estar asociados a comportamientos autistas, déficit en las interacciones sociales y comunicación, presentando una problemática de salud importante y que debe ser vigilada por las autoridades sanitarias.

A nivel mundial la intoxicación por Plomo a nivel pediátrico genera gran importancia pues los problemas y efectos perjudiciales se manifiestan en organismos en su etapa de desarrollo (neurofisiológico). (Ascione, 2001)

Anteriormente en el año 2004, Verbel J, y colaboradores realizaron un estudio de medición de niveles de Plomo en sangre en niños de 5 a 9 años en Cartagena-Colombia, este constituyó el primer acercamiento a los valores de niveles de Plomo en niños que viven en nuestro país. En este estudio se encontró que el valor medio para esta ciudad fue de 5,49 µg/dL, que se considera en esa época bajo en comparación con otros estudios similares realizados en la región, como por ejemplo los realizados en Venezuela por Rojas y Colaboradores, en Perú desarrollado por Naeher y Colaboradores, con valores de 11,60 µg/dL y 7,10 µg/dL respectivamente. (Verbel et al, 2004)

Estudios similares han relacionado variables clínicas como son estudios de Coeficiente intelectual, examen físico exploratorio, relación con otros exámenes clínicos (Cuadro hemático, creatinina, otros metales, etc), lo que enriquece los valores de plumbemia obtenidos, como por ejemplo el realizado por Zhang y colaboradores en el año 2015, desarrollado en Lu´an- China, en niños de 1 año a 18 años que fueron pacientes ambulatorios en el hospital Universitario Anhuf, ejecutando correlación de los valores de Plomo encontrado con IQ y niveles de metales esenciales como calcio, hierro, magnesio y Zinc.

Para este estudio en particular, los resultados obtenidos de análisis de Plomo en sangre se correlacionarán con los hallazgos presentados en el cuadro hemático de la muestra analizada y otros exámenes médicos practicados a los menores, en el marco del proyecto docente al cual este trabajo pertenece, esto con el fin de dar un enfoque más concluyente y enriquecedor al estudio.

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1. Conclusiones

- Se desarrolló y validó una metodología Bioanalítica para la determinación de Plomo en sangre mediante Espectroscopia de Absorción Atómica con Horno de grafito en el Laboratorio de Toxicología de la Universidad Nacional de Colombia, de acuerdo a los parámetros recomendados por la guía para la Industria de Validación de Métodos Bioanalítico de la FDA, la guía de Validación de Métodos Bioanalíticos de la EMEA/CHMP/EWP, Guía del Instituto de Salud Pública de Chile sobre la Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición.

- La validación de la metodología bioanalítica permitió demostrar que la metodología es selectiva, precisa, exacta en el rango lineal evaluado de 25,0 µg/L a 250,0 µg/L.

- Se determinó un límite de detección de 0,65 µg/L, siendo el límite de detección expresado por el proveedor del equipo de 0,78 µg/L para este análisis.

- El límite de cuantificación determinado fue de 25,0 µg/L y el límite superior de cuantificación fue de 250,0 µg/L.

- Se obtuvo una recuperación entre el 98% a 103%, siendo una muy buena recuperación para metodologías bioanalíticas y comparada con otros estudios como el realizado por Dos Santos & colaboradores conde obtuvieron una recuperación de 103%.

- Se estimó la incertidumbre del método bioanalítico, cuyo valor es ± 0,02

- La metodología validada sirvió para el análisis de 300 muestras de sangre de niños hospitalizados en el Hospital la Misericordia de Bogotá, muestras pertenecientes al trabajo docente al cual este proyecto pertenece.

- 212 muestras pertenecientes a individuos que viven en Bogotá, 45 muestras de individuos que viven en Cundinamarca, 12 muestras de individuos que viven en Meta, 10 muestras de individuos que viven en Boyacá, 7 muestras de individuos que viven en Tolima, 4 muestras de individuos que viven en Huila, 3 muestras de individuos que viven en Casanare, 2 muestras de individuos que viven en Quindío, 1 muestra de individuos que vive en Putumayo, 1 muestra de individuos que vive en Bolívar, 1 muestra de individuos que vive en Amazonas y 2 muestras de individuos que no tienen información de procedencia.
- Ninguna muestra sobrepasó el límite permitido para análisis de Plomo en sangre, valor declarado por el CDC y que corresponde a 5 µg/dL.
- Este estudio es uno de los pioneros en el País y nos permite observar un poco más la realidad de la situación actual de la salud de los niños de nuestro país.

6.2. Recomendaciones

- Se recomienda realizar el análisis de los resultados obtenidos en este trabajo con los demás análisis recolectados de las historias clínicas de los niños, para obtener un estudio más completo y establecer relaciones estadísticas.
- Este es uno de los primeros acercamientos para determinar el estado actual de intoxicación por Plomo en la población infantil. Se recomienda empezar a realizar estudios más detallados que permitan tomar medidas sanitarias para prevenir situaciones de intoxicación por este metal.
- Se recomienda que la autoridad sanitaria realice reglamentación que permita establecer obligatoriedad en análisis de metales en la población infantil Colombiana, como se realiza en otras partes del mundo.
- Se recomienda a la Maestría en Toxicología fomentar estudios de análisis de metales en leche materna, pues ya posee una metodología implementada previamente en el laboratorio y realizar correlación con niveles sanguíneos de niños lactantes.

- Se recomienda a la Maestría en Toxicología fomentar estudios de análisis de metales en otros elementos que puedan estar relacionados con la población infantil, como son juguetes, envases de comida infantil, comida infantil, etc.

Bibliografía

Abadin, H., & Ashizawa, A. (2007). TOXICOLOGICAL PROFILE FOR LEAD..

Alamazán, S., Garcia, P., & Hernandez, E. (2006). Manual para el manejo ambientalmente responsable del Plomo. *Centro de Calidad Ambiental del Tecnológico de Monterrey*.

Amador, L., et al (2015). Niveles de metales pesados en muestras biológicas y su importancia en salud. Revista Nacional Odontología . 11(21): 83:99.

Ascione, I. (2001). Intoxicación por Plomo en pediatría, *72*(2), 133–138.

Azcona-cruz, M. I., C, M., Rothenberg, S. J., & Ph, D. (2000). Niveles de Plomo en sangre en niños de 8 a 10 años y su relación con la alteración en el sistema visomotor y del equilibrio, *42*(4).

Barlandas N., Quintana S., Reyes E.,et all. (2008). Guía para la validación y verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico. *CENAM & EMA.*

Bedolla, C., Lorena, E., & Ordaz, A. (2008). Niveles de Plomo en sangre y factores de riesgo por envenenamiento de Plomo en niños mexicanos Blood lead levels and risk factors for lead poisoning in mexican children, 10–14.

Begoña, M., Aurrekoetxea J., Ibarluzea J., Arenaza M., Basterretxea M., Rodriguez C. (2008). Metales Pesados (Pb, Cd, Cr y Hg) en población general adulta próxima a una planta de tratamiento de residuos urbanos de Bizkaia. *Revista Española de Salud Pública.* 82: 481-492

Bocca B., Mattei D., Pino A., Alimonti A. (2010). Italian network for human biomonitoring of metals: Preliminary results from two Regions. *Ann Ist Super Sanitá.* 46:3: 259-265

Cardenas O., Varona M., Núñez S., Ortiz J., Peña G. (2001).Correlación de protoporfirina zinc y plomo en trabajadores de fábricas de baterías de Bogotá, Colombia. *Salud pública de México.* Vol 43

CDC, 2015. http://www.atsdr.cdc.gov/es/csem/plomo/es_pb-fisiologia.html

CENAM (2004). Guía Técnica sobre trazabilidad e incertidumbre en las mediciones analíticas que emplean las técnicas de espectrofotometría de absorción atómica y de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente.

Choi W., Kwon H., Lim M., Lim J., Mina H. (2016). Blood lead, parenteral marital status and the risk of attention-deficit/hyperactivity disorder in elementary school children: A longitudinal study. *Psychiatry Research.*236(pp42-46).

Cousillas A. (2001).Evaluación de la exposición al plomo en la población infantil de Uruguay. Tesis Doctoral

Cubadda F., Raggi A. (2005). Determination of cadmiun, lead, iron, nickel and chromiun in selected food matrices by plasma spectrometric techniques. Microchemical Journal. 79 (pp91-96)

Díaz, P. (2011). Alteraciones Neurológicas por Exposición a Plomo en Trabajadores de Procesos de Fundición, Soacha, 2009.

Dol I., Feola G., Garcia G., Alonzo C. (2004). Contaminación Ambiental de plomo en asentamientos urbanos en Montevideo Uruguay y su repercusión en los niveles de plomo en sangre en población infantil. *Retel Revista de Toxicología en Línea.*

Dos Santos C., Rodrigues R., Silva C., Nascimento E. (2006). Determination of lead in whole blood by electrothermal atomic absorption spectrometry usin Zeeman correction and sample stability. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry.* Vol 269(481-485)

Duffau, B., Rojas, F., & Guerrero, I. (2010). Validación de métodos y determinación de incertidumbre de la medición: “Aspectos generales sobre la validación de métodos.” *Instituto de Salud Publica*.

Dursun N., Dogan P., Domez H. (2000). Plasma and erythrocyte Lipid Peroxide Levels in workers with Occupational Exposure to Lead. *Biological Trace Element Research.* Vol 82

EMEA/CHMP/EWP, 2011. (2012). Guideline on bioanalytical method validation Guideline on bioanalytical method validation Table of contents, *44*(July 2011).

Espinosa C., Nobrega D., Seijas D., Sarmiento A., Medina E. (2008). Niveles de plomo en sangre y factores amnientales asociados, en una población infantil venezolana. *Facultad de Ciencias de la Salud.* 116(4): 307-314

FDA. (2001). Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, (May).

Ferrer, A. (2003). Intoxicación por metales Metal poisoning, *26*(ext 3900).

Fernandez, M. (2011). Desarrollo y Validación de métodos analíticos para la determinacion en disitntas matrices medioambientales de tensioactivos anionicos derivados de alcoholes: Alcoholes, sulfatos y etoxisulfatos. Univeridad de Granada

Forte G., Madeddu R., Tolu P., Asara Y., Marchal J., Bocca B. (2010). Reference intervals for blood Cd and Pb in the general population of Sardinia (Italy). *International Journal of Hygiene and Environmental Health.*

Fuentes, A. (2008). Evaluacion y analisis de plomo presente en ambientes interiores a traves de monitoreo personal en dos jardines infantiles de las respectivas localidades de Puente aranda, Fontibon y Kennedy de Bogota D.C. Universidad la Salle

García J., Mendez J. (2010). Genotoxic effects of Lead: An update review. *Environment International.* 623-636

García, S. (2013). Guía de prevención, diagnóstico, tratamiento y vigilancia epidemiológica de las intoxicaciones ambientales infantiles con Plomo. - 1a ed. - Buenos Aires: Ministerio de Salud de la Nación. Programa Nacional de Prevención y Control de las Intoxicaciones

Geney, C. et al (2016). Menores de 17 años con concentraciones de plomo por exposición ambiental en Bogotá. Univ Med. 57(2): 182-192.

Gouglitz, G.; More, D. (2014). Handbook of Spectroscopy. Willey CVH. Segunda Edición.

Gulson, B. et al (1996). Impact on Blood Lead in Children and Adults Following Relocation from Their Source of Exposure and Contribution of Skeletal Tissue to Bloos Lead. Environmental Contamination and Toxicology. 56:543-550.

Harris, D. (2013). Análisis Químico Cuantitativo. Sexta Edición. Editorial Reverté. Capitulos 18, 19, 20 y 21.

Hermoza, J. (2006). Determinación toxicológica de Plomo en leche de madres lactantes del Cnetrol de Salud San Juan Bosco de la Provincia Constitucional del Callao. *Universidad Nacional Mayor de San Marcos-Perú.*

Hernández, F. G. (2000). The role of biomarkers in human toxicology.

ICH. (2005). ICH H ARMONISED T RIPARTITE G UIDELINE V ALIDATION OF A NALYTICAL P ROCEDURES :, *1994*(November 1996).

Instituto Nacional de Salud. Laboratorio de Salud Ambiental. http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/investigacion/paginas/salud-ambiental-y-laboral.aspx#.UgK9UZJE-d4

Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Determinación de plomo en sangre - Método de cámara de grafito Espectrofotometría de absorción atómica.

Kakkar, P. Biological markers for metal toxicity. Environmental Toxicology and Pharmacology. 19 (pp 335-349)

Kyoung, K. (2016). Low Level lead exposure ans autistic behaviors in school-age children. Neurotoxicology. V53: 193-200.

Kobayashi G., Bastos M., et all (2010). Lead levels in milk and blood from donors to the Breast Milk Bank in Southern Brazil. *Environmental Research.* 110 (265-271)

Lajunen, L. (1992). *Spectroquemical analysis byAtomic Absorption and Emission.* Royal Society of Chemistry . Chapter 3.

Luo W., Ruan D., Yan C. (2012). Effects of chronic lead exposure on functions of nervous system in Chinese children and developmental rats. *Neurotoxicology.*

Mariño, D. (2013). Determinación de los plaguicidas Aldicarb, Carbofurano y Metamidofos en sangre provenientes de casos forenses mediante Cromatografía Líquida con Espectrometría de Masas Tándem LC-ESI-MS/MS en Cundinamarca, Boyacá y Bogotá.

Martinez, A. (2002). Plomo en suelo y su asociación con niveles sanguineo en niños y mujeres embarazadas. Universidad de Colima, Mexico.

Markowitz, M. (2003) Manejo de la Intoxicación por plomo en la niñez. Salud Pública de México. Vol 45

Min ming, L., Jia C,. et al (2014). The national trend of blood lead levels among Chinese children aged 0-18 years old, 1990-2012. Environment International. 71 (109-117)

Moncada, R. (2008) Estimación de la incertidumbre de las determinaciones de alcalinidad total, dureza total, hierro total, aluminio y pH para el laboratorio de analisis de aguas y alimentos de la universidad tecnologica de Pereira.

Naeher, L., et al (2004). Blood Lead Survey of Children, Pregnant women, Professional Drivers, Street Workers, and Office Workers in Trujillo, Peru. Enviromental Health: An International Journal. Volume 59, Issue 7.

Nordberg G., Bruce, F., Monica, N., & Lars, F. (2007). *Handbook on the Toxicology of metals*.

Nordberg G., Langard S., (n.d.). *Metales, Propiedades Químicas y Toxicidad.* Productos Químicos. Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo. Consultado en

http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tomo2/63.pdf

Norma Oficial Mexicana NOM 199 SSA1-2000. Salud Ambiental. Niveles de Plomo en sangre y acciones como criterios para proteger la salud de la población expuesta no ocupacionalmente.

Nixon D., Moyer T. (1996). Routine clinical determination of Lead, arsenic, cadmiun, and thallium in urine and whole blood by inductively coupled plasma mass spectrometry. Spectrochimica Acta Part B. 13-25

Ochoa, M., Rivera, M., Diaz, I. (1998) Efectos de la Intoxicación por plomo en niños escolares. Revista Medica Hondureña. Vol66

Olivero J., Duarte D., Echenique M. (2007). Blood lead levels in children aged 5-9 years living in Cartagena, Colombia. Science of Total Environment. 372 (pp 707-716)

Olmedo P., Hernandez A., Lopez O., Rodrigo L. (2010) Validation of a method to quantify chromiun, cadmiun, manganese, nickel and lead in human whole blood, urine, saliva and hair samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. Analytica Chimica Acta. 659 (pp 60-87)

Organizacion Mundial de la Salud.(2013). Guía Breve de métodos analíticos para determinar las concentraciones de plomo en sangre. Poma, P. A. (2008). REVISIONES Lead effects on humans, 69(2).

Parsons, P., Barbosa, F. (2007). Atomic spectrometry and trends in clinical laboratory medicine. Spectrochimica Acta. 62(992-1003)

Peña, A., Lobo, M. Monitoring lead in hair of children and adolescents of Alcala de Henares, Spain.Environment International. 72(pp170-175)

Peters, F., Drummer, O., Musshoff, F. (2007). Validation of new methods. Forensic Science International. 165 (pp 216-224)

Poma, P. A. (2008). REVISIONES Lead effects on humans, An Fac Med. 69(2).

Ramírez, A. V. (2006). Biomarcadores en monitoreo de exposición a metales pesados en metalurgia, 67(1), 49–58.

Rivas H. (2006). Estimación de incertidumbre para medicion de Zn por espectrofotometría de Absorcion Atómica- Flama.Simposio de Metrología

Robinson, J,; Skelly, E., Frame, G. (2014). Undergraduate Instrumental Analysis. 6 Edition. CRC Press.

Rojas, M., Espinosa, C., Seijas , D. (2003). Association between blood lead and sociodemographic parameters among children. Revista Saúde Pública (4): 503-9.

Rubio, C., Aj, G., Re, M., Revert, C., & A, L. G. H. (2004). El Plomo como contaminante alimentario, 21, 72–80.

Sanin, L. H., Gonzalez, T., & Romieu, I. (1998). Acumulación de Plomo en los huesos y su efecto en la salud .Salud Pública de México, 40, 359–368.

Services, H. (2007). Toxicological Profile of Lead. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.

Silbergeld, E. K., Holmberg, B., Högberg, J., Trump, B. F., & Misra, R. R. (2010). Toxicologia.

Swartz, M., Krull, I.(2012). Handbook of Analytical Toxicology. CRC Press. Taylor & Francis Group

Tellez, J., & Bautista, F. (2005). Exposicion ocupacional a Plomo: aspectos toxicológicos, 31–44.

Trasobares E.(2010). Plomo mercurio en sangre en una población laboral hospitalaria y su relación con factores de exposición. Universidad Complutense de Madrid

Tripathi R.M. Raghunath R., Sastry V.N. (1999) Daily intake of heavy metals by infants through milk and milk products. *The Science of the Total Environment* 227: 229-235

Valdivia, M.. (2005). Intoxicación por Plomo Lead poisoning, Rev. Soc. Per. Med. Inter. 18(1) .

Verbel,J. et al. (2007). Blood lead levels in children aged 5-9 years living in Cartagena, Colombia. Science of Total Environment, 372, 707-716

VIM (2012). Vocabulario Internacional de Metrología. Conceptos Fundamentales y generales y términos asociados.

WORLD HEALTH ORGANIZATION INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans VOLUME 87 Inorganic and Organic Lead Compounds Inorganic and Organic. (2006), *87*.

Wu Y. Yang X. (2011). Blood lead level and its relationship to certain essential in the children aged 0 to 14 years from Beijing, China. *Science of the total Environment.* . 409 (pp 3016-3020)

Yonghua, W., et al. (2011). Blood lead level and its relationship to certain essential elements 0 to 14 years from Beijing, China. Science of the Total Environment. 409, 3016-3020.

Zhang, M., el al. (2015). The Blood Lead levels of oitpatients aged 1-18 years from Lu´an, China, 2012-2014. Journal of trace elements in Medicine and Biology. 33, 48-53.

Anexos

A. Anexo: Comité de Ética Universidad Nacional de Colombia

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA
ACTA DE EVALUACIÓN

CE – 010
ACTA DE EVALUACIÓN: N°. 82
Fecha: 28 de noviembre de 2013

*Nombre completo del proyecto: "**DETERMINACIÓN DE NIVELES SANGUÍNEOS DE PLOMO EN UNA MUESTRA DE NIÑOS MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON HORNO DE GRAFITO**".*

***Versión número:** 01*

***Sometido por:** la estudiante Tatiana del Pilar Cortes*

***Presentado por:** profesor Jairo Alonso Téllez Mosquera, Coordinador*

***Departamento o Sección:** Maestría en Toxicología de la Facultad de Medicina.*

Fecha en que fue sometido a consideración del Comité: 28 de noviembre de 2013

El COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACION DE LA FACULTAD DE MEDICINA. Se constituyó mediante la Resolución 152, (Acta No. 43 del 5 de diciembre de 1995 actualizado mediante resolución 008 (acta 03 de 27 de enero de 2011), de Consejo de Facultad el Comité de Ética de investigación, el cual está regido por la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia que estableció las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Medica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última revisión del año 2000; y el código de regulaciones federales, título 45, parte 46, para la protección de los sujetos humanos, del departamento de salud y servicios humanos de los institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (junio 18 de 1991).

El Comité de Ética de la Facultad de Medicina certifica que:

1. Sus miembros revisaron los siguientes documentos del presente proyecto:

- ✓ *Carta de presentación del proyecto generada por la unidad básica o el departamento.*
- ✓ *Copia de la evaluación de los jurados o pares académicos que evaluaron y aprobaron el trabajo)*
- ✓ *Copia del proyecto completo de investigación,*
- ✓ *Dos resúmenes ejecutivos*
- ✓ *Dos copias del consentimiento informado (en español y cuando la investigación lo amerite).*
- ✓ *Hojas de vida resumidas de los investigadores y coinvestigadores del proyecto*
- ✓ *Consideraciones éticas según resolución 8430 Ministerio de Salud.*
- ✓ *Resultados de evaluación por otros comités (si aplica)*

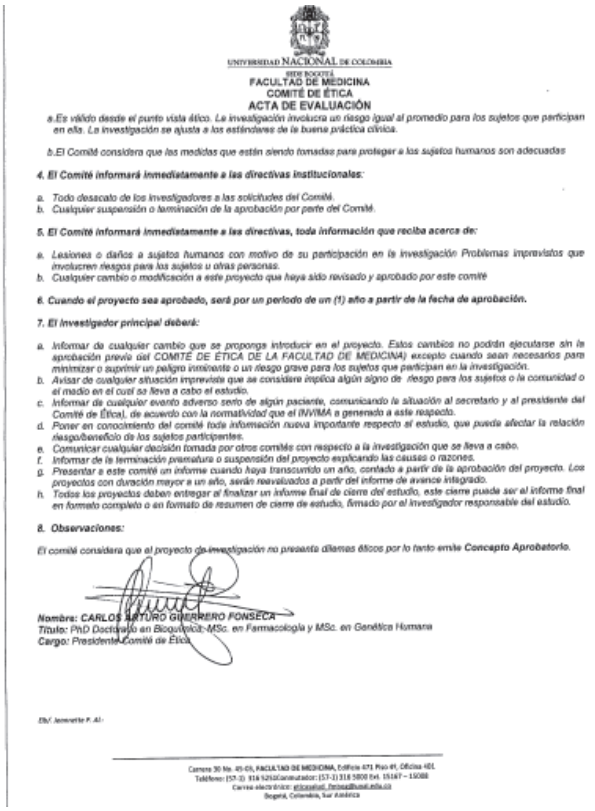
2. El presente proyecto fue evaluado y aprobado por los siguientes miembros del Comité:

1	*Amador Luis Roberto*	*Departamento de Patología*
2	*Arteaga Díaz Clara Eugenia*	*Departamento de Obstetricia y Ginecología*
3	*Guerrero Fonseca Carlos Arturo*	*Departamento de Ciencias Fisiológicas*
4	*Parra Pineda Mario Orlando*	*Departamento de Obstetricia y Ginecología*

3. El Comité consideró que el presente estudio:

Ella. Jeannette P. Al.-

Carrera 30 No. 45-03, **FACULTAD DE MEDICINA**, Edificio 471 Piso 4º, Oficina 401
Teléfono: (57-1) 316 5251/Conmutador: (57-1) 316 5000 Ext. 15167 – 15008
Correo electrónico: eticasalud_fmbog@unal.edu.co
Bogotá, Colombia, Sur América



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA
ACTA DE EVALUACIÓN

a.Es válido desde el punto vista ético. La investigación involucra un riesgo igual al promedio para los sujetos que participan en ella. La investigación se ajusta a los estándares de la buena práctica clínica.

b.El Comité considera que las medidas que están siendo tomadas para proteger a los sujetos humanos son adecuadas

4. El Comité informará inmediatamente a las directivas institucionales:

a. Todo desacato de los investigadores a las solicitudes del Comité.
b. Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.

5. El Comité informará inmediatamente a las directivas, toda información que reciba acerca de:

a. Lesiones o daños a sujetos humanos con motivo de su participación en la investigación Problemas imprevistos que involucren riesgos para los sujetos u otras personas.
b. Cualquier cambio o modificación a este proyecto que haya sido revisado y aprobado por este comité

6. Cuando el proyecto sea aprobado, será por un periodo de un (1) año a partir de la fecha de aprobación.

7. El investigador principal deberá:

a. Informar de cualquier cambio que se proponga introducir en el proyecto. Estos cambios no podrán ejecutarse sin la aprobación previa del COMITÉ DE ÉTICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA) excepto cuando sean necesarios para minimizar o suprimir un peligro inminente o un riesgo grave para los sujetos que participan en la investigación.
b. Avisar de cualquier situación imprevista que se considere implica algún signo de riesgo para los sujetos o la comunidad o el medio en el cual se lleva a cabo el estudio.
c. Informar de cualquier evento adverso serio de algún paciente, comunicando la situación al secretario y al presidente del Comité de Ética), de acuerdo con la normatividad que el INVIMA a generado a este respecto.
d. Poner en conocimiento del comité toda información nueva importante respecto al estudio, que pueda afectar la relación riesgo/beneficio de los sujetos participantes.
e. Comunicar cualquier decisión tomada por otros comités con respecto a la investigación que se lleva a cabo.
f. Informar de la terminación prematura o suspensión del proyecto explicando las causas o razones.
g. Presentar a este comité un informe cuando haya transcurrido un año, contado a partir de la aprobación del proyecto. Los proyectos con duración mayor a un año, serán reavaluados a partir del informe de avance integrado.
h. Todos los proyectos deben entregar al finalizar un informe final de cierre del estudio, este cierre puede ser el informe final en formato completo o en formato de resumen de cierre de estudio, firmado por el investigador responsable del estudio.

8. Observaciones:

El comité considera que el proyecto de investigación no presenta dilemas éticos por lo tanto emite ***Concepto Aprobatorio.***

***Nombre:** CARLOS ARTURO GUERRERO FONSECA*
***Título:** PhD Doctorado en Bioquímica, MSc. en Farmacología y MSc. en Genética Humana*
***Cargo:** Presidente Comité de Ética*

Ella. Jeannette P. Al.-

Carrera 30 No. 45-03, FACULTAD DE MEDICINA, Edificio 471 Piso 4º, Oficina 401
Teléfono: (57-1) 316 5251/Conmutador: (57-1) 316 5000 Ext. 15167 – 15008
Correo electrónico: eticasalud_fmbog@unal.edu.co
Bogotá, Colombia, Sur América

B. Anexo: Comité de Ética Hospital la Misericordia

Fundación HOMI Hospital de la Misericordia

Bogotá, enero 14 de 2016

Doctora
ALBA ISABEL RODRIGUEZ PULIDO
Docente Departamento Toxicología Universidad Nacional de Colombia
Ciudad

CEI-01-16
Ref. Respuesta evaluación Comité de Ética e Investigación de protocolo

Reciba un cordial saludo,

El Comité de Ética e Investigación de la Fundación Hospital de la Misericordia se constituyó mediante Acta No. 02-02-10 el 12 de febrero de 2010, certifica que evaluó los siguientes documentos del trabajo de investigación con título: **"Determinación de niveles sanguíneos de plomo en una muestra de niños mediante espectroscopia de absorción atómica con horno de grafito"**:

- Protocolo de investigación
- Hoja de vida de los investigadores
- Consentimiento informado

Considerando viable desde el punto de vista ético su realización en la Fundación, motivo por el cual da su concepto de **APROBACIÓN.**

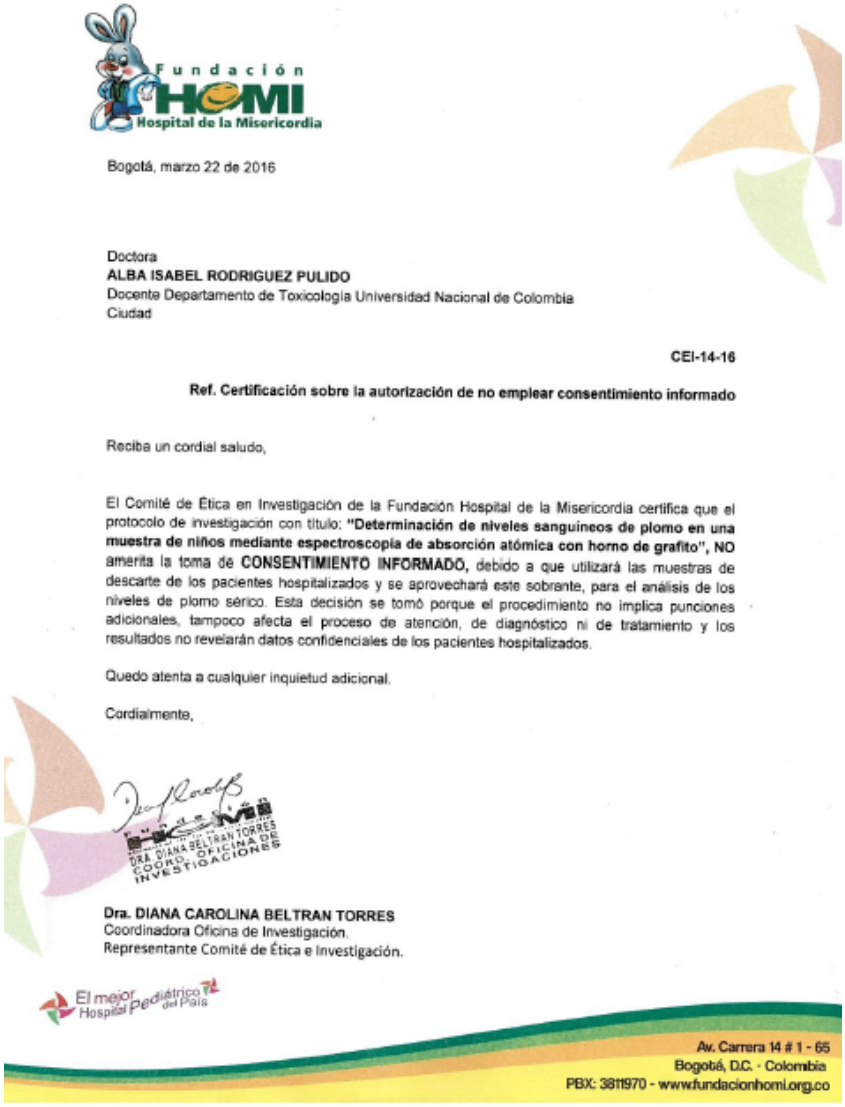
El comité informará a las directivas institucionales cualquier desacato de los investigadores a las solicitudes del comité, cualquier suspensión o terminación de la aprobación de este comité, lesiones o daños a sujetos humanos por la participación en esta investigación o cualquier cambio o modificación a este proyecto que haya sido revisado y aprobado por este comité. El investigador principal deberá informar cualquier cambio que se proponga con este proyecto y no podrá ejecutar ningún cambio hasta no tener aprobación nuevamente del comité, a menos que esto implique minimizar o suprimir un riesgo grave que se presente para los sujetos que participan en la investigación y debe avisar cualquier situación que considere implica un riesgo para los sujetos o la comunidad en la cual se lleva a cabo la investigación, informar cualquier evento adverso que se presente y al final, debe entregar un informe final de cierre del estudio, firmado por el investigador principal.

Cordialmente,

DRA. DIANA BELTRAN TORRES
COORD. OFICINA DE INVESTIGACIONES

Dra. DIANA CAROLINA BELTRAN TORRES
Coordinadora Oficina de Investigación.
Representante Comité de Ética e Investigación

C. Anexo: Autorización del No Uso de Consentimiento Informado



Fundación HOMI
Hospital de la Misericordia

Bogotá, marzo 22 de 2016

Doctora
ALBA ISABEL RODRIGUEZ PULIDO
Docente Departamento de Toxicología Universidad Nacional de Colombia
Ciudad

CEI-14-16

Ref. Certificación sobre la autorización de no emplear consentimiento informado

Reciba un cordial saludo,

El Comité de Ética en Investigación de la Fundación Hospital de la Misericordia certifica que el protocolo de investigación con título: **"Determinación de niveles sanguíneos de plomo en una muestra de niños mediante espectroscopia de absorción atómica con horno de grafito", NO** amerita la toma de **CONSENTIMIENTO INFORMADO,** debido a que utilizará las muestras de descarte de los pacientes hospitalizados y se aprovechará este sobrante, para el análisis de los niveles de plomo sérico. Esta decisión se tomó porque el procedimiento no implica punciones adicionales, tampoco afecta el proceso de atención, de diagnóstico ni de tratamiento y los resultados no revelarán datos confidenciales de los pacientes hospitalizados.

Quedo atenta a cualquier inquietud adicional.

Cordialmente,

DRA DIANA BELTRAN TORRES
COORD. OFICINA DE INVESTIGACIONES

Dra. DIANA CAROLINA BELTRAN TORRES
Coordinadora Oficina de Investigación.
Representante Comité de Ética e Investigación.

El mejor Hospital Pediátrico del País

Av. Carrera 14 # 1 - 65
Bogotá, D.C. - Colombia
PBX: 3811970 - www.fundacionhomi.org.co

D. Anexo: Formato de Toma de Datos

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA – HOSPITAL LA MISERICORDIA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA – DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA

Proyecto: Determinación de niveles sanguíneos de Plomo en una muestra de niños mediante espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito.

Muestra consecutivo número: _____
Fecha de diligenciamiento (año/mes/día): _____

HISTORIA CLINICA – DATOS GENERALES

NOMBRES Y APELLIDOS:	
FECHA DE NACIMIENTO:	N° HC:
EDAD:	
LUGAR DE RESIDENCIA:	LOCALIDAD:
DIRECCIÓN	TELEFONO:
DEPARTAMENTO	
EPS:	
ESTUDIA: SI NO	CURSO:
REPRESENTANTE LEGAL	
CONDICIONES DE LA VIVIENDA	

HISTORIA CLINICA- EXAMEN FISICO

FECHA DE INGRESO					
PESO:	kg	TALLA:	cm	TEMPERATURA:	°C
FRECUENCIA RESPIRATORIA:	resp/min	TENSION ARTERIAL:	mmHg		
ESTADO EN EL HOSPITAL: Hospitalizado:		Servicio:			

HISTORIA CLINICA – DIAGNOSTICO (Resumen)

HISTORIA CLINICA- OTROS EXAMENES DIAGNOSTICOS

RESULTADOS DEL CUADRO HEMÁTICO, FECHA DE REPORTE DEL CH

HB:	**HTO:**	**VCM:**	**HBCM:**		
RTO GB	**% NEUTRÓFILOS**	**% LINFOCITOS**	**% MONOS**	**% EOS**	**% BASOS**
RTO PLAQUETAS:			**VSG:**		
HALLAZGOS EN EL ESP					
OTROS HALLAZGOS					

FECHA DE LA TOMA DE MUESTTRA DE SANGRE PARA PLOMO: _____
OBSEVACIONES DE LA MUESTRA: _____

E. Anexo: Procedimiento de limpieza de materiales para análisis de Plomo en sangre

PROCEDIMIENTO DE LIMPIEZA DE MATERIALES PARA ANALISIS DE PLOMO EN SANGRE

1. **Objetivo**:

Establecer el procedimiento a seguir para la limpieza de los materiales involucrados en el análisis de Plomo en sangre

2. **Materiales y reactivos**

- Jabón o solución limpiadora catiónica al 2%
- Solución de acido nítrico 10%
- Agua desionizada con TOC menor o igual al 3ppm
- Recipiente de plástico grande

3. **Procedimiento**

- Lavar con agua de grifo el material que se le va a realizar la limpieza.
- Sumergir el material en una solución detergente de lavado convencional de material del laboratorio al menos por dos horas.
- Enjuagar con agua desionizada
- Sumergir en el recipiente plástico grande que contiene ácido nítrico al 10% y dejar reposar por lo menos 12 horas.
- Enjuagar con suficiente agua desionizada.
- Dejar aparte del resto de materiales del laboratorio, en un lugar limpio y seco, protegido del polvo.

F. Anexo: Certificado Estándar de Plomo

125 Market Street
New Haven, CT 06513
USA

Tel (203)786-5290
Fax (203)786-5287
www.AccuStandard.com

AccuStandard® Inc.

CERTIFICATE OF ANALYSIS

AccuTrace™ Reference Standard

Item Number: AA29N-1

Element: Lead
Storage Condition: Ambient
Hazards: CORROSIVE
Matrix: 2-5% Nitric acid

Lot: 213015059
Date Certified: 1/15/2013
Expiration: Jan / 2018
Sample Size: 100 mL

[x] Included on ISO/IEC 17025 Scope of Accreditation
[x] Included on ISO Guide 34 Scope of Accreditation

Actual Lot Analysis

Lead 1000µg/mL

The gravimetric uncertainty for this product is ±0.24%. The CRM uncertainty is ±5%. See reverse side for details.

The concentration of the final solution was verified by ICP against NIST SRM# 3128

RESULTS: This solution standard was certified for accuracy of major elemental constituency via * methodology traceable to primary or well characterized secondary standards. All trace level elements and impurities were determined via plasma emission spectroscopy on the concentrate.

This standard was prepared gravimetrically to contain the elemental concentrations shown above. Balances, used in the preparation, are calibrated regularly using NIST-traceable weights. All glassware is Class A.

Use good laboratory procedure when diluting this product. Shake bottle prior to use and do not pipette directly out of the bottle. Use only cleaned Class A volumetric glassware.

We certify the accuracy of this standard to be ± 0.5% of the stated value until the expiration date listed above, provided it is kept tightly capped and stored under normal laboratory conditions.

L. Snyder

Lydia Snyder
Inorganic QC Supervisor

For use in routine laboratory analysis.

AccuStandard is accredited to ISO Guide 34, ISO/IEC 17025 and certified to ISO 9001

G. Anexo: Datos para cálculos de Parámetros de Validación

Tabla No. 1. Datos para elaborar la curva de calibración método y sistema día uno y día dos

Concentración µg/L	Respuesta (ABS)			
	Sistema		Método	
	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
25,0	0,0420	0,0358	0,0421	0,0438
	0,0394	0,0354	0,0421	0,0468
	0,0377	0,0352	0,0426	0,0434
	0,0383	0,0359	0,0439	0,0473
	0,0389	0,0355	0,0442	0,0440
50,0	0,0754	0,0789	0,0765	0,0791
	0,0755	0,0760	0,0750	0,0799
	0,0790	0,0758	0,0788	0,0786
	0,0767	0,0758	0,0785	0,0796
	0,0760	0,0757	0,0782	0,0786
75,0	0,1121	0,1205	0,1159	0,1180
	0,1132	0,1169	0,1153	0,1214
	0,1140	0,1170	0,1173	0,1194
	0,1127	0,1150	0,1203	0,1196
	0,1136	0,1151	0,1194	0,1187
100,0	0,1475	0,1499	0,1445	0,1492
	0,1490	0,1502	0,1488	0,1539
	0,1490	0,1512	0,1459	0,1514
	0,1507	0,1530	0,1466	0,1543
	0,1503	0,1480	0,1470	0,1502
125,0	0,1903	0,1878	0,1829	0,1839
	0,1872	0,1855	0,1854	0,1888
	0,1894	0,1873	0,1854	0,1917
	0,1885	0,1846	0,1834	0,1915
	0,1881	0,1855	0,1830	0,1891
250,0	0,3418	0,3699	0,3588	0,3514
	0,3501	0,3666	0,3486	0,3468
	0,3448	0,3706	0,3489	0,3440
	0,3679	0,3657	0,3438	0,3421
	0,3646	0,3627	0,3445	0,3409

Tabla No. 2 Datos para el cálculo de precisión intermedia entre analistas para método y el sistema.

	Método				Sistema			
	25,0µg/L	50,0µg/L	100,0µg/L	250,0µg/L	25,0µg/L	50,0µg/L	100,0µg/L	250,0µg/L
Analista 1	22,4	47,8	97,9	255,9	24,3	48,3	99,9	239,1
	22,4	46,7	101,1	248,5	22,5	48,3	100,9	245,0
	22,8	49,5	98,9	248,7	21,3	50,8	100,9	241,2
	23,8	49,3	99,5	244,9	21,7	49,2	102,2	257,7
	23,9	49,1	99,8	245,4	22,1	48,7	101,9	255,4
Analista 2	22,9	49,5	99,2	255,6	22,5	49,4	100,4	252,7
	22,5	49,3	101,1	246,8	22,9	49,8	98,3	247,8
	23,8	50,9	101,9	245,4	21,4	47,3	101,7	243,3
	24,2	49,4	100,2	251,3	22,7	47,7	102,2	244,1
	23,7	49,7	101,3	253,5	20,9	46,5	100,9	244,9

Tabla No. 3 Datos para el cálculo de precisión intermedia entre días para método y el sistema.

	Método				Sistema			
	25,0µg/L	50,0µg/L	100,0µg/L	250,0µg/L	25,0µg/L	50,0µg/L	100,0µg/L	250,0µg/L
Día 1	22,4	47,8	97,9	255,9	24,3	48,3	99,9	239,1
	22,4	46,7	101,1	248,5	22,5	48,3	100,9	245,0
	22,8	49,5	98,9	248,7	21,3	50,8	100,9	241,2
	23,8	49,3	99,5	244,9	21,7	49,2	102,2	257,8
	23,9	49,1	99,8	245,4	22,1	48,7	101,9	255,4
Día 2	20,7	47,2	99,9	251,8	22,3	51,8	100,4	250,9
	22,9	47,8	103,4	248,3	22,0	49,8	100,6	248,7
	20,4	46,8	101,5	246,2	21,9	49,7	101,3	251,4
	23,3	47,6	103,7	244,8	22,4	49,7	102,5	248,1
	20,8	46,8	100,6	243,9	22,1	49,6	99,1	246,0

H. Anexo : Fórmulas para cálculos de los parámetros de validación

Linealidad

$$b = \frac{\sum\sum x_i y_i - \sum x_i \,.\, \sum y_i}{\sum . \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}$$

$$a = \frac{\sum x_i^2 \,.\, \sum y_i - \sum x_i . \sum x_i y_i}{\sum\sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}$$

$$r = \frac{\sum x_i y_i - \sum x_i . \sum y_i}{\sqrt{\sum}\ \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2 \,.\, \sqrt{\sum}\ \sum y_i^2 - (\sum y_i)^2}$$

Donde $\boldsymbol{x_i}$ y $\boldsymbol{y_i}$ son el i-esimo par de datos de los ***n*** par de datos totales.

Repetibilidad y precisión intermedia

Coeficiente de variación (CV): $CV = \frac{s}{x} * 100$

Donde, *S* es la desviación estándar y *X* el promedio.

Prueba de t para la correlación

H0: no existe correlación entre x – y
H1: existe correlación entre x – y
Grados de libertad = n-2, siendo n = k * c, donde k: niveles y c: réplicas

t experimental para el coeficiente de correlación (tr): $t_r = \frac{|r| \sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}}$

Criterio de aceptación: Si tr > t tab entonces se rechaza Ho, existe correlación lineal significativa.

Prueba de t para el intercepto

H0: b = 0
H1: b ≠ 0
Grados de libertad = n-2, siendo n = k * c, donde k: niveles y c: réplicas

t experimental para el intercepto ***(tb):*** $t_b = \frac{b}{S_b}$

Donde,
b: intercepto de la curva
Sb: desviación estándar del intercepto
Criterio de aceptación: Si ***tb*** < ***t*** tab entonces no se rechaza Ho, el intercepto no es significativamente diferente de cero.

Límites de confianza

Límites de confianza para el intercepto ***(LCb):*** $LCb = b \pm t_{(n-2)} \times Sb$

Desviación estándar del intercepto ***(Sb):*** $Sb = S_{yx} \text{ x } \sqrt{\left(\frac{\sum x_i^2}{\left(\sum\sum x_i^2 - (\sum x_i)^2\right)}\right)}$

Donde, *n = número de datos*

$$S_{yx} = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$$

Donde, $\hat{y}_i$ es el y estimado del modelo lineal.

Prueba de t para la pendiente

Ho: m = 0
H1: m ≠ 0
Grados de libertad = n-2, siendo n = k * c, donde k: niveles y c: réplicas

t experimental para la pendiente ***(tm):*** $t_m = \frac{m}{S_m}$

Criterio de decisión: Si ***tm*** > ***t*** tab entonces se rechaza Ho, la pendiente es significativamente diferente de cero.

Límites de confianza

Límites de confianza para el intercepto ***(LCm):*** $LCm = m \pm t_{(n-2)} \times Sm$

Desviación estándar del intercepto ***(Sm):***

$$S_m = \frac{S_{yx}}{\sum \left(x_i - \frac{\sum x_i}{1} \right)^2}$$

Prueba de F para la regresión

H0: el desvío no es significativo

H1: el desvío es significativo

Criterio de decisión: Si F exp < F tab entonces no se rechaza Ho, el desvío no es significativo.

ANOVA

Fuente	gl	SC	CM	F exp	F tab
Regresión	1	SCR	$\frac{CM\ regresión}{gl\ regresión}$	$\frac{CM\ regresión}{CM\ error}$	$FA = 0{,}05 \frac{gln}{gld}$
Linealidad	k – 2	SCL	$\frac{SC\ linealidad}{gl\ inealidad}$	$\frac{CM\ linealidad}{CM\ error}$	$FA = 0{,}05 \frac{gln}{gld}$
Error	n – k	SCE	$\frac{SC\ error}{gl\ error}$		

Donde,

gl: Grados de libertad

SC: cuadro de varianzas

CM: media de los cuadrados

gln: 1 y gld: n – 2

n: número de datos n = k * m

Donde, k: número de niveles

m: número de niveles

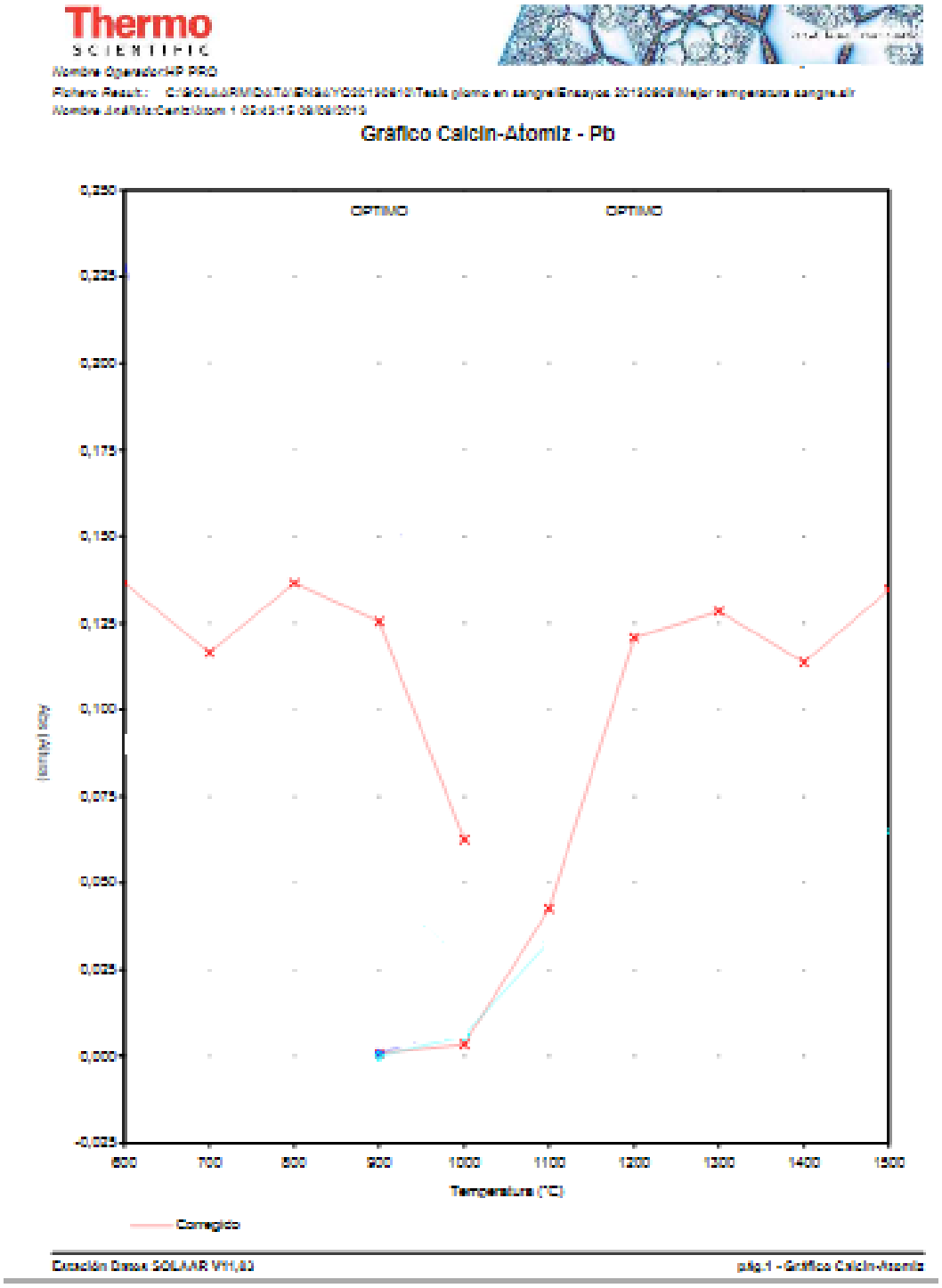
Suma de cuadrados de la regresión (SCR): $SCR = \frac{(Sxy)^2}{Sxx}$

Suma de cuadrados entre respuestas (SCRta): $SCRta = \frac{\sum yf^2/m}{(\sum y)^2/n}$

Suma de cuadrados del error puro (SCE): $SCE = \sum y^2 - \frac{\sum yf^2}{k}$

Suma de cuadrados de la linealidad (SCL): $SCL = SCRta - SCR$

I. Anexo: Optimización del método



J. Anexo: Efecto matriz

Para la determinación t cal para realizar la prueba t Student se tiene:

$$S_p = \sqrt{\frac{(n_1 - 2)S_1^2 + (n_2 - 2)S_2^2}{n_1 + n_2 - 4}}$$

Donde $\mathbf{n_1}$ y $\mathbf{n_2}$ son el número de datos experimentales de cada una de las curvas de calibración.

$$\boldsymbol{t_{cal}} = \frac{|b_1 - b_2|}{S_p \sqrt{\frac{1}{\sum(c_i - \hat{c})_1^2} + \frac{1}{\sum(c_i - \hat{c})_2^2}}}$$

Tabla No. 1 Datos para el cálculo de efecto matriz

	Sistema	**Método**
Suma Concentraciones (ĉ)	3125	3125
Desviación Estándar (S)	74,1216	74,0620
S^2	5494,0046	5485,1857
N	30	30
Sumatoria relación de concentraciones al cuadrado $\sum(c_i - \hat{c})^2$	273922347,0	273922091,2
Sp	74,09180198	
Pendientes (b)	0,0013962	0,0013560
Tcal	0,0064	

K. Anexo: Tablas y análisis de datos para la estimación de la incertidumbre

Cuadro 1: Datos para calcular la incertidumbre debida a la curva de calibración

Concentración	X predictivo	(xpred-xcal)²	(Xi-Xcal)²	ucal
25,0	22,4411	6679,0761	6267,3611	2,7026
25,0	22,4411	6679,0761	6267,3611	2,7026
25,0	22,8098	6618,9421	6267,3611	2,7013
25,0	23,7685	6463,8664	6267,3611	2,6981
25,0	23,9897	6428,3407	6267,3611	2,6973
50,0	47,8099	3176,0828	2934,0278	2,6287
50,0	46,7037	3301,9902	2934,0278	2,6313
50,0	49,5061	2987,7781	2934,0278	2,6246
50,0	49,2849	3012,0132	2934,0278	2,6251
50,0	49,0636	3036,3463	2934,0278	2,6257
75,0	76,8661	745,3195	850,6944	2,5761
75,0	76,4236	769,6752	850,6944	2,5766
75,0	77,8986	690,0124	850,6944	2,5749
75,0	80,1110	578,6760	850,6944	2,5725
75,0	79,4473	611,0490	850,6944	2,5732
100,0	97,9577	38,5515	17,3611	2,5606
100,0	101,1140	9,3185	17,3611	2,5600
100,0	98,9901	26,7964	17,3611	2,5604
100,0	99,5064	21,7184	17,3611	2,5603
100,0	99,8014	19,0560	17,3611	2,5602
125,0	126,2764	488,8413	434,0278	2,5705
125,0	128,1201	573,7665	434,0278	2,5724
125,0	128,1201	573,7665	434,0278	2,5724
125,0	126,6452	505,2825	434,0278	2,5709
125,0	126,3502	492,1078	434,0278	2,5706
250,0	255,9969	23052,4165	21267,3611	3,0242
250,0	248,4747	20824,8156	21267,3611	2,9825
250,0	248,6960	20888,7180	21267,3611	2,9837
250,0	244,9349	19815,6906	21267,3611	2,9634
250,0	245,4511	19961,2937	21267,3611	2,9662
Suma	3125,0	3125,0000	5302,3461	158854,1667	2,6738
Varianza	5477,7299				
Promedio	104,1667				
Sy/x	0,005732256				

Cuadro 2: Verificación de micropipetas

	100 µl	2,5 ml
	0.1000	2,5001
	0,1000	2,5008
	0,1001	2,5016
	0,1000	2,5001
	0,0999	2,4997
	0,1000	2,5005
	0,1000	2,5004
	0,0999	2,4998
	0,1000	2,5003
	0,1000	2,5004
Promedio	0,1000	2,50037
DSR	0,0000	0,00054

Cuadro 3: Verificación de balones

	100ml	10ml
	100,0125	10,0174
	99,9955	9,9985
	99,9982	10,0111
	100,0131	10,0162
	100,0156	10,0187
Promedio	100,0070	10,0124
DSR	0,0094	0,0083

L. Anexo: Tabla resumen con datos de muestras de género, edad y ubicación geográfica

	GENERO	EDAD(años)	CIUDAD
1	M	4	BOGOTA
2	F	12	BOGOTA
3	M	5	BOYACA
4	M	4	HUILA
5	F	15	BOGOTA
6	M	7	BOGOTA
7	F	9	CUNDINAMARCA
8	M	12	BOGOTA
9	F	Menor de 1	BOGOTA
10	F	13	BOGOTA
11	F	5	CUNDINAMARCA
12	M	5	BOGOTA
13	F	4	CUNDINAMARCA
14	F	7	CUNDINAMARCA
15	M	5	BOGOTA
16	M	9	CUNDINAMARCA
17	M	7	BOGOTA
18	M	5	TOLIMA
19	F	5	BOGOTA
20	F	4	BOGOTA
21	F	12	CUNDINAMARCA
22	F	9	BOGOTA
23	M	12	CUNDINAMARCA
24	F	3	BOGOTA
25	M	Menor de 1	CUNDINAMARCA
26	M	17	BOGOTA
27	F	14	CUNDINAMARCA
28	M	1	BOGOTA
29	F	1	CUNDINAMARCA
30	M	Menor de 1	BOGOTA
31	F	10	BOGOTA
32	F	1	PUTUMAYO
33	M	9	BOGOTA

	GENERO	EDAD(años)	CIUDAD
34	F	1	BOGOTA
35	M	7	BOGOTA
36	M	10	BOGOTA
37	M	Menor de 1	BOGOTA
38	F	14	CASANARE
39	F	12	BOGOTA
40	F	4	BOGOTA
41	M	2	BOGOTA
42	M	4	BOGOTA
43	F	14	CUNDINAMARCA
44	M	3	BOGOTA
45	F	12	BOGOTA
46	F	Menor de 1	AMAZONAS
47	F	3	TOLIMA
48	M	3	BOYACA
49	M	4	VILLAVICENCIO
50	F	12	BOGOTA
51	F	Menor de 1	BOGOTA
52	M	12	BOGOTA
53	M	7	VILLAVICENCIO
54	M	Menor de 1	BOGOTA
55	F	16	BOGOTA
56	M	4	BOGOTA
57	M	8	BOGOTA
58	M	13	BOGOTA
59	M	1	BOGOTA
60	F	Menor de 1	BOGOTA
61	F	1	BOGOTA
62	M	12	BOGOTA
63	F	5	BOGOTA
64	M	5	BOGOTA
65	F	8	VILLAVICENCIO
66	F	Menor de 1	VILLAVICENCIO
67	F	1	BOGOTA
68	F	4	BOGOTA
69	F	5	BOGOTA

	GENERO	EDAD(años)	CIUDAD
70	M	14	BOYACA
71	F	Menor de 1	CUNDINAMARCA
72	M	12	BOGOTA
73	F	7	BOGOTA
74	M	1	CUNDINAMARCA
75	F	1	HUILA
76	M	11	BOGOTA
77	F	11	VILLAVICENCIO
78	F	Menor de 1	BOGOTA
79	F	9	CUNDINAMARCA
80	F	10	BOGOTA
81	M	11	BOGOTA
82	F	1	BOGOTA
83	M	5	BOGOTA
84	M	6	BOGOTA
85	M	10	BOGOTA
86	M	10	BOGOTA
87	F	3	BOGOTA
88	F	1	BOGOTA
89	F	2	BOGOTA
90	F	1	BOGOTA
91	M	12	BOGOTA
92	F	12	BOGOTA
93	M	8	BOGOTA
94	F	6	BOGOTA
95	M	13	TOLIMA
96	M	1	BOGOTA
97	F	8	QUINDIO
98	M	8	CUNDINAMARCA
99	M	5	BOGOTA
100	M	12	BOGOTA
101	M	12	BOGOTA
102	F	7	BOGOTA
103	F	17	BOGOTA
104	M	7	BOGOTA
105	M	3	BOGOTA

	GENERO	EDAD(años)	CIUDAD
106	F	15	CUNDINAMARCA
107	M	8	BOGOTA
108	F	8	BOGOTA
109	F	3	CUNDINAMARCA
110	M	3	BOGOTA
111	F	6	BOGOTA
112	M	6	CASANARE
113	M	9	CUNDINAMARCA
114	M	Menor de 1	BOGOTA
115	M	Menor de 1	CUNDINAMARCA
116	M	17	CUNDINAMARCA
117	M	Menor de 1	BOGOTA
118	M	15	BOGOTA
119	M	3	HUILA
120	M	15	BOGOTA
121	F	14	BOGOTA
122	F	5	BOGOTA
123	F	13	BOGOTA
124	F	7	BOGOTA
125	F	7	HUILA
126	M	9	BOGOTA
127	M	2	BOGOTA
128	M	8	BOGOTA
129	M	1	BOGOTA
130	M	Menor de 1	BOGOTA
131	F	13	BOGOTA
132	F	10	BOGOTA
133	F	10	BOGOTA
134	F	5	BOYACA
135	F	5	BOGOTA
136	M	Menor de 1	BOGOTA
137	F	13	BOGOTA
138	M	1	TOLIMA
139	F	6	BOGOTA
140	F	6	BOGOTA
141	F	6	BOGOTA

	GENERO	EDAD(años)	CIUDAD
142	M	4	BOYACA
143	M	Menor de 1	BOGOTA
144	F	Menor de 1	CUNDINAMARCA
145	M	15	BOGOTA
146	F	2	BOGOTA
147	F	10	BOGOTA
148	F	17	BOGOTA
149	F	7	BOLIVAR
150	M	1	BOGOTA
151	M	1	BOGOTA
152	M	11	BOGOTA
153	F	17	BOGOTA
154	F	16	BOYACA
155	M	Menor de 1	BOGOTA
156	F	3	BOGOTA
157	M	2	CUNDINAMARCA
158	F	Menor de 1	BOGOTA
159	M	1	BOYACA
160	F	4	CUNDINAMARCA
161	M	4	BOGOTA
162	M	11	BOGOTA
163	M	Menor de 1	CUNDINAMARCA
164	M	2	CUNDINAMARCA
165	M	4	VILLAVICENCIO
166	M	Menor de 1	CUNDINAMARCA
167	F	11	BOGOTA
168	F	7	BOGOTA
169	M	1	BOGOTA
170	M	14	BOGOTA
171	M	10	BOGOTA
172	F	1	BOGOTA
173	M	4	CUNDINAMARCA
174	F	Menor de 1	BOGOTA
175	F	3	BOGOTA
176	F	6	BOGOTA
177	M	Menor de 1	BOGOTA

	GENERO	EDAD(años)	CIUDAD
178	M	6	VILLAVICENCIO
179	M	2	BOGOTA
180	F	4	TOLIMA
181	M	1	BOGOTA
182	F	11	VILLAVICENCIO
183	F	9	BOGOTA
184	F	16	BOGOTA
185	M	8	BOGOTA
186	F	1	CUNDINAMARCA
187	M	2	BOGOTA
188	F	Menor de 1	BOGOTA
189	F	2	BOGOTA
190	M	1	BOGOTA
191	F	1	BOGOTA
192	M	4	VILLAVICENCIO
193	F	10	BOGOTA
194	F	10	BOGOTA
195	M	6	BOGOTA
196	M	7	BOGOTA
197	M	Menor de 1	BOGOTA
198	M	Menor de 1	BOGOTA
199	F	7	BOGOTA
200	M	1	CUNDINAMARCA
201	M	13	BOGOTA
202	F	1	BOGOTA
203	M	7	BOGOTA
204	M	5	BOGOTA
205	M	1	CUNDINAMARCA
206	M	3	VILLAVICENCIO
207	M	1	BOGOTA
208	M	1	BOGOTA
209	F	16	BOGOTA
210	F	5	BOGOTA
211	F	4	CUNDINAMARCA
212	F	1	BOGOTA
213	M	15	BOGOTA

	GENERO	EDAD(años)	CIUDAD
214	M	5	BOGOTA
215	F	8	BOYACA
216	M	7	SIN INFORMACION
217	M	2	CUNDINAMARCA
218	M	1	BOGOTA
219	F	12	BOGOTA
220	F	3	BOGOTA
221	M	4	TOLIMA
222	M	2	BOGOTA
223	M	8	BOGOTA
224	M	4	BOGOTA
225	F	2	BOGOTA
226	M	3	BOGOTA
227	M	11	BOGOTA
228	F	Menor de 1	BOGOTA
229	M	1	BOGOTA
230	F	2	BOGOTA
231	M	3	BOGOTA
232	M	7	BOGOTA
233	M	Menor de 1	BOGOTA
234	F	1	BOGOTA
235	M	2	BOGOTA
236	M	2	BOGOTA
237	M	3	CUNDINAMARCA
238	M	Menor de 1	BOGOTA
239	M	1	BOGOTA
240	M	1	BOGOTA
241	M	17	BOGOTA
242	F	2	CUNDINAMARCA
243	F	11	BOGOTA
244	M	8	BOGOTA
245	M	5	BOGOTA
246	M	2	BOGOTA
247	F	1	BOGOTA
248	F	7	CASANARE
249	M	6	BOGOTA

	GENERO	EDAD(años)	CIUDAD
250	M	17	CUNDINAMARCA
251	M	Menor de 1	BOGOTA
252	M	14	CUNDINAMARCA
253	M	9	BOGOTA
254	F	14	CUNDINAMARCA
255	M	3	VILLAVICENCIO
256	M	6	BOGOTA
257	F	5	BOGOTA
258	F	2	BOGOTA
259	F	1	BOGOTA
260	F	16	BOGOTA
261	M	7	BOGOTA
262	M	6	BOGOTA
263	M	2	CUNDINAMARCA
264	F	11	VILLAVICENCIO
265	M	1	BOGOTA
266	F	Menor de 1	CUNDINAMARCA
267	M	3	TOLIMA
268	F	Menor de 1	BOGOTA
269	M	12	BOGOTA
270	M	1	BOGOTA
271	F	2	SIN INFORMACION
272	M	1	BOGOTA
273	M	6	BOYACA
274	M	5	BOGOTA
275	F	6	BOGOTA
276	M	Menor de 1	BOGOTA
277	M	1	BOGOTA
278	M	Menor de 1	BOGOTA
279	M	3	BOGOTA
280	M	Menor de 1	BOGOTA
281	M	Menor de 1	BOGOTA
282	M	9	CUNDINAMARCA
283	M	10	BOGOTA
284	M	1	BOGOTA
285	M	Menor de 1	BOYACA

	GENERO	EDAD(años)	CIUDAD
286	F	5	BOGOTA
287	F	16	CUNDINAMARCA
288	F	1	BOGOTA
289	M	1	BOGOTA
290	M	1	BOGOTA
291	F	2	BOGOTA
292	M	5	BOGOTA
293	M	1	CUNDINAMARCA
294	M	15	ARMENIA
295	F	2	CUNDINAMARCA
296	M	1	CUNDINAMARCA
297	F	8	BOGOTA
298	M	8	BOGOTA
299	F	15	CUNDINAMARCA
300	F	15	BOGOTA