

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA



TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

**ESTIMACIÓN DE LOS NIVELES DE ALBÚMINA EN LA ORINA Y SU
CORRELACIÓN CON LOS NIVELES DE MERCURIO.**

Trabajo Especial de Grado presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la **Br. Irelui Giorgina Hordziejewicz Celis**, para optar al título de Licenciado en Química.

Caracas, Mayo de 2011

Yo Profesora Nereida Carrión, Investigadora del Centro de Química Analítica de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela y el Profesor Andrés Escalona, Investigador del Centro de Química Analítica de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela.

Certificamos que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

**“ESTIMACIÓN DE LOS NIVELES DE ALBÚMINA EN LA ORINA Y SU
CORRELACIÓN CON LOS NIVELES DE MERCURIO”**

Que presenta la Br. Irelui Giorgina Hordziejewicz Celis, para aspirar al título de Licenciado en Química, ha sido realizado en el Centro de Química Analítica de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela, bajo nuestra dirección, durante los años 2010 y 2011, y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, Mayo de 2011

Dr. Nereida Carrión

(Tutor)

Dr. Andrés Escalona

(Tutor)

ACTA

Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del trabajo Especial de Grado titulado: **“ESTIMACIÓN DE LOS NIVELES DE ALBÚMINA EN LA ORINA Y SU CORRELACIÓN CON LOS NIVELES DE MERCURIO”**. Presentado por la Br. Irelui Giorgina Hordziejewicz Celis, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química.

Dr. Nereida Carrión
(Director)

Dr. Andrés Escalona
(Director)

Dr. Gladys Gali
(Jurado)

Dr. Miguel Murillo
(Jurado)

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá, **Luisa Irene**, mi pilar en la vida, mi mejor amiga, gracias por confiar en mí y apoyarme en todo momento, te amo.

A mis tíos **Zaida, Armando, José** y a mi abuela **Luisa**, por quererme, cuidarme y protegerme. A **Ingrid Villasana** y **Germán Paz** porque han sido padres para mí. A todos los quiero mucho.

A mis amigos: **Claudia, Karla, Ricardo, Joel, Javier** y **Zully**, por ser tan especiales e incondicionales, apoyándome en los buenos y malos momentos. Gracias por brindarme su amistad. Son verdaderos amigos, los tendré siempre presente. A **Manuel y César** por acompañarme y cuidarme en los diferentes avatares de la carrera. Los aprecio chicos.

A mis tutores, profesora **Nereida Carrión** y profesor **Andrés Escalona**, gracias!, por la paciencia y dedicación con que me trataron, me enseñaron que con esfuerzo y tesón se pueden lograr las metas.

Al profesor **Miguel Murillo**, muchas gracias, por haber confiado en mí y darme las palabras de aliento en los momentos oportunos.

A los profesores **José Chirinos, Luis Gómez** y **Gustavo Pérez**, por enseñarme metodología de trabajo y por hacer grata mi estadía en el laboratorio. Los voy a extrañar.

A la **Universidad Central de Venezuela**, por haberme acogido y contribuir a mi desarrollo académico.

A todos infinitamente GRACIAS!!!.

INDICE

	<u>Página</u>
SECCIÓN I.- INTRODUCCION.	
I.1.- Mercurio	1
I.1.1.- Ciclo del Mercurio.....	2
I.1.2.- Fuentes de Mercurio	3
I.1.2.1.- Fuentes Naturales	3
I.1.2.2.- Fuentes Antropogénicas	4
A.- Actividad Minera.....	4
B.- Minería en Venezuela	6
I.1.3.- Efecto del Mercurio en la Salud.....	6
I.1.3.1.- Toxicocinética.....	6
A.- Absorción por Inhalación: Vía Respiratoria	6
B.- Absorción por Ingestión: Vía Digestiva.....	7
C.- Absorción por contacto: Vía Cutánea.....	8
I.1.4.- Efecto del Mercurio en los Riñones.....	8
I.2.- Proteinuria.....	10
I.2.1.- Primaria	11
I.2.2.- Secundaria.....	12
I.3.- Biomarcadores	13
I.3.1.- Biomarcador de Exposición.....	13
I.3.2.-Biomarcador de Susceptibilidad.....	13
I.3.3.- Biomarcador de Respuesta.....	14
I.4.- Albúmina	18
SECCIÓN II.- TÉCNICA DE ANALISIS	17
II.1.- Cromatografía	17
II.1.1.- Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)	18

II.2.- Espectroscopía de Absorción Molecular	26
SECCIÓN III.- REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	31
SECCIÓN IV.- OBJETIVOS	37
IV.1.- Objetivo General	
IV.2.- Objetivos Específicos	
SECCIÓN V.- PARTE EXPERIMENTAL	38
V.1.- Instrumentación	38
V.1.1.- Determinación de la Albúmina	38
V.1.2.- Determinación de proteínas totales	39
V.2.- Reactivos Empleados	41
V.3.- Procedimiento.....	42
V.3.1.- Población Estudiada	43
V.3.2.- Encuesta epidemiológica	45
V.3.3.- Recolección y almacenamiento de las muestras	45
V.4- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	46
V.4.1.- Determinación de la Albúmina	46
V.4.1.a.- Optimización de las condiciones de análisis.....	47
a.1.- Elaboración de la curva de calibración.....	47
V.4.1.b.- Procedimiento para la determinación de la concentración albúmina	48
b.1.- Procedimiento de separación 1	48
b.2.- Procedimiento de separación 2	49
V.4.2.- Determinación de proteínas totales	50
V.4.2.a.- Optimización de las condiciones de análisis.....	51
a.1.- Selección de la longitud de onda	51
V.4.2.b.- Procedimiento de lectura	51
V.4.2.c.- Determinación de las figuras de mérito del método	52
c.1.- Precisión.....	52
c.2.- Limite de detección (LOD) y de Cuantificación (LOQ).....	52
V.4.2.d.- Validación del método.....	53

SECCIÓN VI.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
VI.1.- Determinación de la Albúmina	54
VI.1.1.- Optimización de las condiciones de análisis	54
VI.1.1.a- Elaboración de la curva de calibración	55
VI.1.2.- Optimización de las condiciones para la separación de la albúmina	56
VI.1.2.a.- Procedimiento de separación 1.....	56
VI.1.2.b.- Procedimiento de separación 2.....	61
VI.2.- Determinación de las Proteínas Totales	64
VI.2.1.- Optimización de las condiciones de análisis	65
VI.2.1.a.- Selección de la longitud de onda	65
VI.2.1.b – Elaboración de la curva de calibración.....	65
VI.2.1.c- Determinación de la precisión, limite de detección y limite de cuantificación del método	68
VI.2.1.d- Validación del método.....	69
VI.2.2.- Determinación de las proteínas en las muestras de orina	70
VI.2.3.- Análisis del sedimento	79
VI.2.4.- Correlación de la concentración de mercurio con la concentración de proteínas totales.....	80
SECCIÓN VII.- CONCLUSIONES	84
SECCIÓN VIII.- RECOMENDACIONES.	86
SECCIÓN IX.- BIBLIOGRAFIA	87
SECCIÓN X.- APENDICE	94

INDICE DE TABLAS

	<u>Página</u>
Tabla 1.- Rangos de proteinuria	11
Tabla 2.- Afinidad química del ión mercuríco y en catión metilmercurio a diferentes ligantes orgánicos	14
Tabla 3.- Condiciones de análisis para Cromatografía Liquida de Alta Eficiencia.....	39
Tabla 4.- Características del equipo empleado para el análisis por Espectroscopía de Absorción Molecular UV-Visible	40
Tabla 5.- Buffer empleados para la separación de la albúmina de las muestras de orina empleando el cartucho de azul de sefarosa	42
Tabla 6.- Rango de concentración de patrones empleados para la curva de calibración para Cromatografía Liquida de Alta Eficiencia	47
Tabla 7.- Señal obtenida para los patrones.....	55
Tabla 8.- Concentración de albúmina en los diferentes extractos	58
Tabla 9.- Concentración de albúmina en los diferentes extractos	59
Tabla 10.- Concentración de albúmina en los diferentes extractos	60
Tabla 11.- Área obtenida para las dos inyecciones.....	61
Tabla 12.- Señal de la albúmina para las diferentes condiciones ensayadas	63
Tabla 13.- Señal de la albúmina del patrón de 300mg/L	63
Tabla 14.- Señal obtenida para las diferentes concentraciones de patrón	66
Tabla 15.- Concentración de los patrones empleados para la curva de calibración.....	67
Tabla 16.- Concentración de patrones y señal obtenida	67
Tabla 17.- Resultados para la determinación de la precisión del método	68
Tabla 18.- Ecuación de la curva para la determinación del límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ)	69

Tabla 19.- Limite de Detección (LOD) y límite de Cuantificación (LOQ).....	69
Tabla 20.- Señal obtenida para las dos muestras empleadas para calcular el porcentaje de recuperación.....	69
Tabla 21.- Porcentaje de Recuperación	70
Tabla 22.- Valores de proteínas totales, Hg y Hg/creatinina en las muestras de orina de los niños de la institución Barrio Obrero.....	70
Tabla 23.- Valores de proteínas totales, Hg y Hg/creatinina en las muestras de orina de los niños de la institución Caratal	71
Tabla 24.- Valores de proteínas totales, Hg y Hg/creatinina en las muestras de orina de los niños de la institución Creación Nuevo México.....	71
Tabla 25.- Valores de proteínas totales, Hg y Hg/creatinina en las muestras de orina de los niños de la institución El Chocó	71
Tabla 26.- Valores de proteínas totales, Hg y Hg/creatinina en las muestras de orina de los niños de la institución El Perú.....	72
Tabla 27.- Valores de proteínas totales, Hg y Hg/creatinina en las muestras de orina de los niños de la institución José Agosto Méndez	72
Tabla 28.- Valores de proteínas totales, Hg y Hg/creatinina en las muestras de orina de los niños de la institución José Solano	73
Tabla 29.- Valores de proteínas totales, Hg y Hg/creatinina en las muestras de orina de los niños de la institución La Ramona.	73
Tabla 30.- Valores de proteínas totales, Hg y Hg/creatinina en las muestras de orina de los niños de la institución Nacupay	73
Tabla 31.- Valores de proteínas totales, Hg y Hg/creatinina en las muestras de orina de los niños de la institución Nicolás Farrera.	74
Tabla 32.- Valores de proteínas totales, Hg y Hg/creatinina en las muestras de orina de los niños de la institución Nuevo México	74
Tabla 33.- Valores de proteínas totales, Hg y Hg/creatinina en las muestras de orina de los niños de la institución San Pedro y San Pablo	74
Tabla 34.- Niños que presentaron proteínas	77

Tabla 35.- Resultados obtenidos para el grupo Control	78
Tabla 36.-Resultados obtenidos para el sedimento	80
Tabla 37.- Modelo Cálculo concentración promedio de proteínas totales de una muestra	99
Tabla 38.- Señales obtenidas y concentraciones de las muestras que presentaron proteínas	99
Tabla 39.- Concentración de proteínas en muestras de 5 adultos que residen en Caracas.....	101

INDICE DE FIGURAS

	<u>Página</u>
Figura 1.- Ciclo global del mercurio	3
Figura 2.- Placa amalgamada	5
Figura 3.- Cola de molino	5
Figura 4.- Estructura del riñón	9
Figura 5.- Partes de la unidad funcional Nefrona del Riñón	9
Figura 6.- Estructura de la Albúmina	16
Figura 7.- Curva de calibrado de una columna de exclusión por tamaño	21
Figura 8.- Diagrama de un aparato HPLC	26
Figura 9.- Fotómetro de haz sencillo	30
Figura 10.- Espectrofotómetro UV-Visible, modelo Génesys, serie 10.....	40
Figura 11.- Cartucho de Azul de Sefarosa	41
Figura 12.- Ubicación Geográfica de El Callao, Estado Bolívar. Venezuela.....	43
Figura 13.- Ubicación geográfica de los colegios muestreados en El Callao	43
Figura 14.- Desimetro ATAGO, modelo URC-NG	46
Figura 15.-Diagrama de separación de la albúmina empleando el cartucho de Azul de Sefarosa	49
Figura 16.- Enlace del ácido tricloroacético a la proteína	50
Figura 17.- Cromatograma del patrón de 300 mg/L de albúmina	54
Figura 18.- Curva de calibración para Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia.....	55
Figura 19.- Cromatograma de la orina con un factor de dilución de 5.....	56
Figura 20.- Cromatograma de los extractos a) Buffer A; b) Buffer B y c) Buffer C, al inyectar en el cartucho 1 mL del patrón de 300mg/L.....	57
Figura 21.- Cromatograma de los extractos a) Buffer A; b) Buffer B y c) Buffer C, al inyectar en el cartucho 0,5 mL del patrón de 300mg/L.....	58

Figura 22.- Cromatograma de los extractos a) Buffer A; b) Buffer B y c) Buffer C, al inyectar en el cartucho 0,5 mL del patrón de 150mg/L.....	60
Figura 23.- Cromatograma del patrón de 100mg/L, precipitado disuelto con NaOH. a) Primera inyección y b) Segunda inyección.....	61
Figura 24.- Cromatograma del patrón de 100mg/L, precipitado disuelto con buffer de fostato pH7,99.....	62
Figura 25.- Cromatograma del patrón de 100mg/L sin precipitar la albúmina con el ácido tricloroacético	62
Figura 26.- Variación de la intensidad del pico de la Albúmina del patrón de 300mg/L. a) antes de precipitar la albúmina con el ácido, b) después de precipitar la albúmina	63
Figura 27.- Cromatograma del patrón de 100 mg/L al precipitar la proteína con el acido empleando como fase móvil un Buffer de Fosfato 0,01M de pH 6,8 (t_R :8,6 min y área 15,6).....	64
Figura 28.- Barrido espectral para ubicar la longitud de onda de trabajo	65
Figura 29.- Curva de Calibración.....	67
Figura 30.- Porcentaje de niños que presentaron niveles medibles de proteínas y de los que no presentaron	78
Figura 31.- Relación entre los niveles de mercurio/creatinina y los niveles de proteínas/g Creatinina.....	81
Figura 32.- Dispersión de los valores de la concentración de Proteínas/g Creatinina y la concentración de mercurio/g Creatinina.....	82
Figura 33.- Concentración de proteínas con relación a la distancia de la casa de habitación del niño al molino	83
Figura 34.- Representación de la curva de calibración usada para la cuantificación de las proteínas totales	97
Figura 35.- Cromatograma Patrón de 300mg/L.....	100
Figura 36.- Cromatograma Patrón de 200mg/L.....	100
Figura 37.- Cromatograma Patrón de 150mg/L.....	100
Figura 38.- Cromatograma Patrón de 20mg/L.....	100

RESUMEN

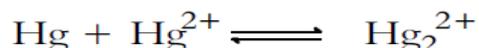
El riñón es uno de los órganos susceptibles a la intoxicación con el mercurio. La principal manifestación de una nefropatía mercurial crónica es la presencia de albuminuria. Para la determinación de los niveles de albúmina se empleó como técnica analítica la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia. Se probaron dos métodos de separación de la albúmina para su posterior cuantificación. El primer método de separación, fue un cartucho de extracción en fase sólida de Azul de Sefarosa. El segundo procedimiento de separación consistía en la precipitación de las proteínas empleando el ácido tricloroacético. Con ambos procedimientos no se obtuvieron resultados satisfactorios, por lo tanto, se procedió a determinar los niveles de proteínas totales empleando el procedimiento descrito por Pesce y col, el cual utiliza la Espectroscopía de Absorción Molecular UV-Visible, como técnica de análisis. Con esta técnica se obtuvo un límite de detección de 19mg/L, una precisión de 1,7% y un porcentaje de recuperación de 92-99%.

Se analizaron un total de 95 muestras de orina de niños que estudian en diferentes centros educativos en El Callao, Estado Bolívar, de los cuales, solo el 5 % presentaron proteínas en la orina, en un rango de concentración de 6 – 66 mg/día, inferior al límite de referencia (>150mg/día), para diagnosticar proteinuria, sin embargo, la presencia de proteína en la orina, es un indicador de la aparición de daño a nivel renal. Los niveles de proteínas se correlacionaron con los niveles de mercurio en la orina y se encontraron diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza de 95%.

I.- INTRODUCCIÓN

I.1.- MERCURIO.

EL mercurio es un metal líquido, inodoro, de color blanco-plateado brillante, ligeramente volátil a temperatura ambiente. Además de su estado elemental (Hg^0), el mercurio existe en los estados de oxidación +1 (Hg_2^{2+}) que es el ion mercurioso y +2 (Hg^{2+}) ión mercúrico, en los que el átomo de mercurio ha perdido uno y dos electrones, respectivamente, donde Hg^{2+} es el estado de oxidación más estable del mercurio. Estas tres especies coexisten en equilibrio como lo indica la relación:



Tiene capacidad de amalgamarse con metales como el oro o la plata, sin embargo, no lo hace con el hierro por lo que se comercializa y conserva en frascos de este metal. Se combina con otros elementos tales como el cloro, azufre y oxígeno para formar compuestos de mercurio inorgánico o "sales," que son generalmente polvos o cristales blancos. El mercurio también se combina con carbono para formar compuestos de mercurio orgánicos u organomercuriales, como el fenilmercurio, etilmercurio, dimetilmercurio, y metilmercurio. El más común, metilmercurio, se forma a partir de la metilación de mercurio inorgánico por parte de microorganismos presentes en el suelo, en los sedimentos, en el aire o bajo el agua y a diferencia del mercurio inorgánico es bioconcentrado, ya que es retenido por los organismos en los distintos niveles de la cadena alimentaria, debido a que es liposoluble y puede atravesar fácilmente membranas biológicas, en particular la piel. ^{(1),(2),(3),(4)}

I.1.1.- CICLO DEL MERCURIO.

El ciclo del mercurio se basa en el flujo continuo y comportamiento del mercurio entre la atmósfera, el suelo y el agua. Uno de los aspectos de mayor importancia en el ciclo biogeoquímico del mercurio es la volatilidad de este metal, ya que tiene una alta presión de vapor que le permite liberarse fácilmente en el ambiente.

El mercurio es emitido a la atmósfera a partir de fuentes naturales y antropogénicas en forma de vapor elemental (Hg^0), y es ampliamente distribuido en forma de gas y partículas debido a que tiene un tiempo de residencia en la atmósfera del orden de un año; tiempo suficiente para que se distribuya a largas distancias antes de regresar a la tierra.

Posteriormente bajo la influencia del ozono, la humedad del aire, los rayos ultravioletas y de microorganismos anaeróbicos se lleva a cabo la oxidación del mercurio elemental a sus estados mercurioso (Hg_2^{2+}) y mercúrico (Hg^{2+}), transportándose mediante la lluvia a cuerpos de agua y suelos. El 60% del mercurio atmosférico es depositado en la tierra y el 40% en agua. En el agua después de sufrir un conjunto complejo de transformaciones químicas y biológicas, la mayoría del Hg^{+2} es reducido a Hg^0 y retornado a la atmósfera, sólo una pequeña fracción está permanentemente exportada a los sedimentos. Procesos similares ocurren en la tierra, resultando aparentemente en un menor retorno de mercurio reducido a la atmósfera y una mayor permanencia en suelos. ⁽⁵⁾

El mercurio en la atmósfera sigue un ciclo uno global donde circulan los vapores de mercurio metálico (Figura 1).

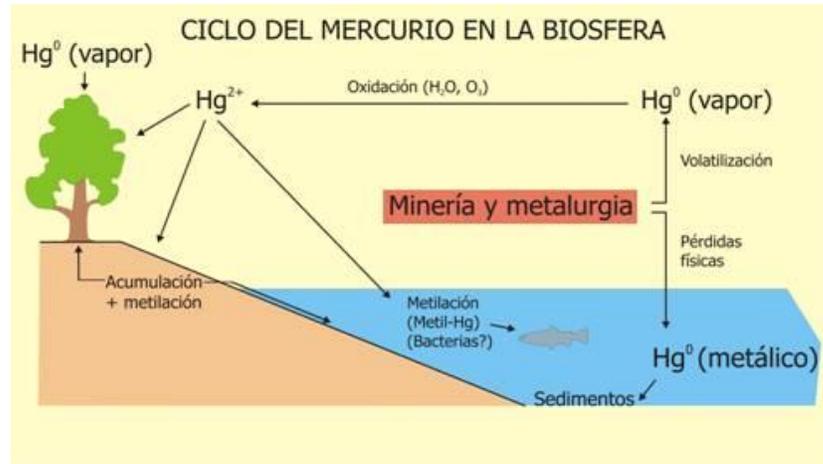


Figura 1.- Ciclo global del mercurio

I.1.2.- FUENTES DE MERCURIO.

Existen dos fuentes de emisión de mercurio en la naturaleza:

I.1.2.1.- FUENTES NATURALES:

Las fuentes primarias del mercurio son las rocas y los suelos. La volatilización del mercurio elemental desde la tierra y el mar, así como la erosión, la disolución de los minerales de las rocas (debido a la penetración del agua a través de éstas por tiempo prolongado) y las emisiones volcánicas, producen una distribución natural de este elemento hacia los diferentes medios aéreo, terrestre y acuático.

Sin embargo, las fuentes antropógenicas son las que contribuyen con más mercurio a estos medios. ⁽⁷⁾

I.1.2.2.- FUENTES ANTROPOGENICAS:

Son aquellas que son producidas o transmitidas por el hombre en su actividad. Algunas fuentes de contaminación antropogénicas del mercurio son: ⁽⁷⁾

- ✓ Extracción de oro y plata.
- ✓ Quema de combustibles fósiles.
- ✓ Fabricación de pinturas, pesticidas y cosméticos.
- ✓ Amalgamación de plata y zinc en odontología.
- ✓ Manufactura de equipos eléctricos y científicos como baterías, termómetros, barómetros, termostatos, tubos fluorescentes, lámparas de mercurio, rectificadores de arco de mercurio, medidores directos de corriente, entre otros.
- ✓ En la industria química para la obtención de Cloro (producción electrolítica de sodio y cloro).
- ✓ En la fabricación de fuegos artificiales y detonadores (Fulminato de mercurio).

A.- ACTIVIDAD MINERA.

La principal fuente antropogénica del mercurio es la minería con un 50% del total.

En la minería aurífera artesanal, se emplea el mercurio para recuperar el oro en forma de amalgama y así separarlo de los minerales acompañantes. La técnica tradicional empleada se basa, primero en la molienda del material rocoso. Una vez triturado, con la ayuda del agua, se hace pasar a través de una placa de cobre amalgamada con mercurio, a medida que fluye por la placa, se va formando la amalgama oro-mercurio (Figura 2 y 3), esta amalgama se retira de la superficie de cobre, raspándola y luego se limpia con agua para remover los residuos del lodo. Finalmente la amalgama es quemada empleando sopletes con los que se alcanzan temperaturas elevadas que provocan la volatilización del metal pesado dejando libre el oro. Este proceso ocasiona el derramamiento continuo de cantidades del metal en los ríos y en cuerpos de agua como ciénagas y lagunas, así como también la liberación de vapores de mercurio elemental a la atmósfera contaminando el ambiente y afectando la salud de las personas que realizan el trabajo como de los que se encuentran en los alrededores. ^{(5) (8) (9) (10)}.



Figura 2.- Placa amalgamada.



Figura 3.- Cola de molino.

B.- MINERÍA EN VENEZUELA.

La actividad minera en Venezuela, se desarrolla principalmente en el Estado Bolívar, con la extracción del hierro, oro, diamante y bauxita.

En las minas de oro de El Callao (Estado Bolívar), se utiliza el mercurio en el proceso de extracción artesanal del mineral. El uso indiscriminado ha contaminado las aguas, los suelos y el aire alrededor de las minas, afectando la salud de los habitantes de este pueblo ⁽¹¹⁾.

I.1.3.- EFECTO DEL MERCURIO EN LA SALUD.

La intoxicación por mercurio debido a la extracción aurífera artesanal es un problema a la salud que reviste seriedad.

I.1.3.1.- TOXICOCINÉTICA.

Vías de absorción y distribución. ⁽¹²⁾

El mercurio, se absorbe por tres vías: respiratoria, digestiva y cutánea.

A.- Absorción por Inhalación: Vía Respiratoria.

Esta es la principal ruta de entrada al organismo de mercurio elemental, ya que se volatiliza a temperatura ambiente. Los vapores del mercurio penetran más profundamente en los pulmones. Por tanto, se tiene que del 75% al 85% del mercurio elemental entra por inhalación obteniéndose aproximadamente un 80% de retención en el pulmón. Un 7% del mercurio retenido se pierde de nuevo con el aire espirado, con

una vida media de 18 horas. El vapor absorbido abandona rápidamente los pulmones distribuyéndose con facilidad por el sistema circulatorio. En la sangre el mercurio elemental por acción de la enzima catalasa se oxida a ión mercúrico que es conducido hasta el riñón donde se fija.⁽¹²⁾

Los principales síntomas de intoxicación con mercurio elemental son: salivación excesiva, dificultad para respirar, fatiga, bronquitis, temblores, irritabilidad, cambios en la personalidad, dolor en los dientes, daño renal y respiratorio.⁽¹⁾⁽²⁾

B.- Absorción por Ingestión: Vía Digestiva.

El mercurio elemental se absorbe muy poco en el tracto gastrointestinal, probablemente en cantidades inferiores al 0,01%. En cambio, las sales inorgánicas, pueden absorberse hasta un 15% y las especies orgánicas se absorben hasta el 90%, por lo que son potencialmente muy tóxicas.

La ingesta de una sal de mercurio provoca estomatitis, con dolor intenso y vómitos por el efecto corrosivo sobre la mucosa del estómago, que puede conducir en algunos casos hasta la muerte.

Los derivados orgánicos producen una reducción del campo visual y dificultad auditiva irreversible, parálisis y muerte. Los efectos dependen de la dosis, produciéndose los dos primeros a bajas concentraciones y los dos últimos a altas concentraciones del tóxico. Además son teratógenos, afectando al feto y ocasionando retardo mental y deficiencias neuromusculares.^{(1)(2) (13)(14)}

C.- Absorción por contacto: Vía Cutánea.

Existe la posibilidad de que el mercurio elemental pueda atravesar la piel, pero, sin embargo, este tipo de absorción no juega un papel muy importante en comparación con los otros tipos ya que la cantidad absorbida es mínima (aproximadamente 0,024 ng/cm² por cada 1mg/m³ en aire). ⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾

El mercurio inorgánico puede absorberse por medio del uso de cremas y jabones para aclarar la piel, estas preparaciones pueden inducir fatiga, insomnio, pérdida de peso, parestesias de pies y manos, eritema, transpiración excesiva e hipersalivación, debilidad progresiva en las extremidades, disfunción renal tubular y desórdenes neuropsiquiátricos.

I.1.4.- EFECTO DEL MERCURIO EN LOS RIÑONES.

Desde los pulmones el mercurio elemental se distribuye por la sangre donde se oxida a ion mercúrico perdiendo su difusibilidad y acumulándose en los riñones. ⁽¹⁴⁾

Los riñones son los órganos responsables de eliminar todas las toxinas, los productos nocivos o desechos del cuerpo, mediante la filtración de la sangre, para luego excretarlos a través de la orina. También reabsorben dentro de la sangre los materiales (líquidos o moléculas) que el cuerpo necesita.

A nivel microscópico, el riñón está formado por 1 millón de unidades funcionales, que reciben el nombre de nefronas (Figura 4). Es en el nefrón donde se produce realmente la filtración del plasma sanguíneo y la formación de la orina. El nefrón está constituido por dos estructuras principales: el glomérulo y el túbulo. El glomérulo es una red de pequeños vasos sanguíneos. La sangre entra en el glomérulo a través de la arteriola aferente y sale a través de la arteriola eferente. Mientras está en el glomérulo,

la fracción líquida de la sangre se filtra a través de pequeños poros situados en las paredes de los vasos sanguíneos, pasando a la cápsula de Bowman y luego al túbulo proximal. En el túbulo proximal, el líquido pasa al asa de Henle, que penetra profundamente en el riñón, de ahí pasa al túbulo distal en donde se unen varios túbulos distales para formar el túbulo colector. (Figura 5).

A medida que el líquido filtrado glomerular fluye por los túbulos, se reabsorbe hasta un 99% de agua y cantidades variables de otras sustancias como sodio y glucosa. El agua restante y las sustancias disueltas en ella que no han sido reabsorbidas constituyen la orina.

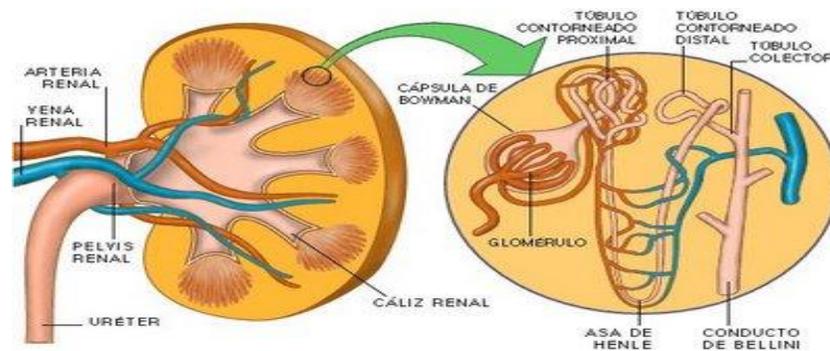


Figura 4.- Estructura del riñón.

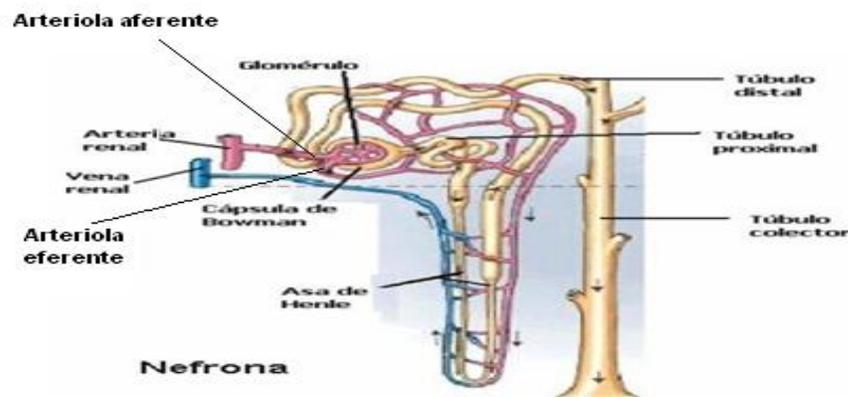


Figura 5.- Partes de la unidad funcional Nefrona del Riñón.

Así que en el glomérulo la filtración de la sangre produce la orina primaria, mientras que la concentración y la reabsorción de agua y otras sustancias necesarias para el organismo se efectúan en el sistema tubular. ⁽¹⁵⁾

En condiciones normales, la pared capilar glomerular limita el filtrado de las proteínas plasmáticas en relación a su tamaño molecular. Las proteínas de gran tamaño prácticamente no aparecen en el filtrado glomerular debido a que son demasiado grandes para atravesar los pequeños orificios del filtro. Las proteínas de bajo peso molecular se filtran con mayor facilidad, pero sólo una mínima fracción aparece en orina, ya que la mayor parte se reabsorbe en el túbulo proximal. Sin embargo, cualquier tipo de alteración tanto del glomérulo como del túbulo ya sea funcional o estructural, puede provocar la aparición de cantidades significativas de proteínas en la orina.

I.2.- PROTEINURÍA.

Proteinuria es el término empleado para indicar la existencia de *proteínas en la orina* en una cantidad elevada, por encima de 150 mg/día ó 4 mg/hora/m² de superficie corporal. Es considerada un buen marcador para determinar una lesión renal.

La proteinuria en niños está constituida principalmente por: dos terceras partes albúmina y una tercera parte es la combinación de globulinas y proteína de Tamm-Horsfall. ⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾

Tabla 1.- Rangos de proteinuria.

	mg/m ² /hora
Fisiológica	<4
Ligera o leve	4-20
Moderada	20-40
Rango nefrótico	>40

Clasificación:

De acuerdo a las causas que originan la proteinuria, se ha clasificado en dos grupos:

I.2.1.- Primaria.

Existen proteinurias “aisladas”, las cuales no se asocian con disfunción renal patológica como:

- ✓ Transitoria: En ciertas situaciones como ejercicio intenso, gestación no complicada, fiebre, convulsiones, infecciones e insuficiencia cardíaca puede aparecer proteinuria que no expresa patología glomérulo-tubular, sino unas condiciones especiales de filtración glomerular. Nunca es indicativa de enfermedad renal.
- ✓ Intermitente: ORTOSTÁTICA. Se define por la presencia de proteinuria solamente cuando el individuo está en posición erecta por mucho

tiempo (de pie), en caminadas normales de larga duración o en personas que tienen lordosis acentuada, desapareciendo de las muestras obtenidas cuando el individuo está decúbito supino (posición corporal acostado boca arriba).

✓ Persistente: No importa la posición en la que se encuentre el individuo es siempre anormal. No presenta patología asociada o alteraciones en las pruebas de función renal.

I.2.2.- Secundaria.

La localización de la lesión renal se caracteriza por las diferentes distribuciones de peso molecular de las proteínas en la orina y se pueden agrupar en:

✓ GLOMERULAR: Es el resultado de un aumento de la permeabilidad de la pared capilar del glomérulo al paso de macromoléculas, como la albúmina y se define como Glomerulonefritis. Cuando la proteinuria está constituida fundamentalmente por albúmina (más del 85%), se denomina selectiva e implica una lesión glomerular menor, pues sólo estaría afectada la electronegatividad de la barrera glomerular. La proteinuria no selectiva contiene mayor proporción de proteínas de mayor peso molecular, sobretodo inmunoglobulinas, e indicaría afectación estructural de la barrera glomerular.

✓ TUBULAR: En enfermedades que afectan al túbulo proximal se deteriora precozmente la capacidad de reabsorción, generándose una reabsorción inadecuada del filtrado proteico normal del glomérulo. Este tipo de proteinuria se

caracteriza por presentar proteínas de bajo peso molecular, principalmente las beta2-microglobulinas y otras como las lisozimas e insulina. Estas pequeñas proteínas se filtran normalmente por el glomérulo y son reabsorbidas y degradadas en el túbulo proximal; en presencia de lesión tubular estas proteínas son excretadas en su forma original.⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾

I.3.- BIOMARCADORES.

Un biomarcador o marcador bioquímico es una sustancia presente en la sangre, fluidos del cuerpo y algunos tejidos, cuya presencia o cantidad es indicadora de toxicidad en el organismo y permite señalar la aparición de alguna enfermedad.

En general los biomarcadores se clasifican en tres grupo: exposición, de susceptibilidad y de respuesta (o efecto).

I.3.1.- BIOMARCADOR DE EXPOSICIÓN:

Compuesto exógeno (o un metabolito) dentro del organismo que refleja la exposición de éste a un xenobiótico. Indica la cantidad de agente químico o sustancia a la cual se está expuesto.

I.3.2.- BIOMARCADOR DE SUSCEPTIBILIDAD:

Indicadores de sensibilidad individual al efecto de un xenobiótico o grupo de compuestos tóxicos. Cuan susceptible es un individuo a un determinado agente.

I.3.3.- BIOMARCADOR DE RESPUESTA:

El biomarcador de respuesta o efecto es indicativo de cambios bioquímicos en un organismo como resultado de la exposición a xenobióticos. Indica la alteración dentro del organismo que dependiendo de su magnitud puede asociarse con alguna enfermedad.

Actualmente los biomarcadores se han constituido como la mejor opción para pronosticar la existencia de enfermedades renales ocasionadas por sustancias nefrotóxicas como metales pesados.

La nefrotoxicidad del mercurio se debe a la capacidad que tienen los cationes mercuriales tanto orgánicos como inorgánicos a reaccionar con una gran variedad de ligantes orgánicos que se encuentran en moléculas biológicas importantes.⁽²⁰⁾⁽²¹⁾⁽²²⁾⁽²³⁾

Tabla 2.- Afinidad química del ión mercúrico y el catión del metilmercurio a diferentes ligantes orgánicos.

Ligante	CH₃Hg⁺ pK	Hg⁺⁺ pK
Cl	5,4	6,7
OH	9,5	10,3
Histidina	8,8	10,0
Cisteína	15,7	14,0
Albúmina	22,0	13,0

La afinidad se expresa como el logaritmo negativo de la constante de disociación (pH). Mientras mayor es el número, mayor es la afinidad por el ligante. Como se

observa en la tabla 2, la Albúmina presenta uno de los valores mayores ($P_k = 13,0$). La Albúmina ha sido considerada como la molécula primaria encargada de la captura y transporte del mercurio en la sangre.

I.4.- ALBUMINA.

La albúmina es la proteína más abundante del plasma sanguíneo. Tiene un peso de 66kDalton. Se produce en el hígado y cumple diversas funciones, como controlar la entrada y salida de líquidos a los capilares, nutrir tejidos y transportar distintas sustancias por todo el organismo (hormonas, vitaminas, fármacos, enzimas e iones como el calcio). Es una cadena polipeptídica de 585 aminoácidos, 17 enlaces disulfuros y un grupo tiol libre que le provee la carga eléctrica negativa.

En condiciones normales sólo una pequeña cantidad de la proteína Albúmina, puede pasar a través de los poros del glomérulo, ya que ésta es más pequeña que dichos poros, pero se evita su fácil filtración debido a la carga negativa de la membrana. Como el mercurio siente gran afinidad por la albúmina debido al grupo tiol presente en la misma, se une al azufre formando enlaces covalentes, perdiendo así la proteína su carga negativa y facilitando el paso por la membrana glomerular. Un fracaso en el filtrado de las moléculas grandes debido a un fallo renal, puede ocasionar la presencia de Albúmina en la orina. La presencia de Albumina en la orina en un rango de 30 a 300 mg/día se denomina Microalbuminuria.

Históricamente, la microalbuminuria ha sido un marcador establecido para monitorear la progresión de enfermedades crónicas en el riñón asociado a alteraciones en la estructura glomerular. ⁽²⁴⁾

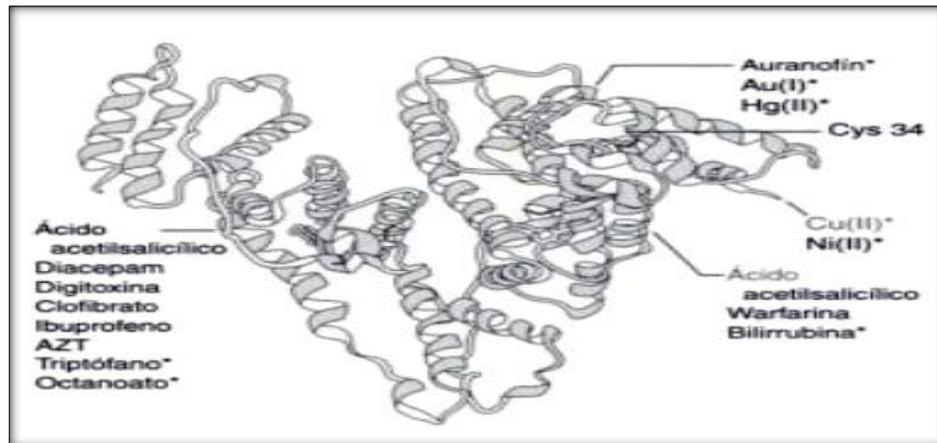


Figura 6.- Estructura de la Albúmina.

II.- TÉCNICA DE ANÁLISIS

Existen diferentes técnicas que se emplean para la determinación de albúmina en la orina.

En los laboratorios clínicos son ampliamente utilizadas las tiras reactivas debido a su sencillez y sensibilidad para la determinación semicuantitativa de la cantidad de albúmina presente en la orina.

La concentración se determina por el cambio de color amarillo (orina normal) a azul verdoso en distintos grados⁽¹⁷⁾:

1+: 30-100 mg/dl

2+: 100-300 mg/dl

3+: 300-1.000 mg/dl

4+: 1.000 o más mg/dl

En el desarrollo del presente trabajo de investigación se emplearon dos técnicas analíticas para la determinación cuantitativa de albúmina y proteínas totales en la orina: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) y Espectroscopía de Absorción molecular UV-Visible, las cuales son descritas a continuación:

II.1.- CROMATOGRAFÍA.

La cromatografía agrupa un conjunto importante y diverso de métodos, que permite separar, identificar y cuantificar, componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas, lo que en muchas ocasiones resulta imposible por otros medios.

En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza con una fase móvil (fase en continuo movimiento y reposición), que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria (fase inmóvil y en continua regeneración de sus centros activos) con la que es inmisible, y que se fija en general a una columna. Las dos fases se eligen de tal forma, que los componentes de la muestra se distribuyan de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria.

Como resultado de la distinta movilidad de los componentes de la muestra debido a las interacciones con cada una de las fases, los compuestos se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y cuantitativamente⁽²⁵⁾.

II.1.1.- CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC).

Es la técnica que separa una mezcla de solutos, basada en la velocidad de desplazamiento diferencial de los mismos, que se establece al ser arrastrados por una fase móvil líquida a través de un lecho cromatográfico que contiene una fase estacionaria, la cual puede ser líquida o sólida. Es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada debido a:

- Alta sensibilidad.
- Fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas.
- Idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles.

II.1.1.a.- Clasificación.

En la cromatografía líquida se pueden diferenciar cuatro mecanismos:

- 1.- Cromatografía de reparto.

- 2.- Cromatografía de adsorción.
- 3.- Cromatografía de intercambio iónico.
- 4.- Cromatografía de exclusión por tamaño.

1.- Cromatografía de reparto.

Se basa en la solubilidad de los solutos para separarlos. Se aplica principalmente a especies poco polares pero no iónicas y para la separación de integrantes de una serie homóloga.

La cromatografía de reparto se subdivide en:

a.- Cromatografía líquido-líquido: la fase estacionaria líquida se retiene sobre la superficie del soporte por adsorción física.

b.- Cromatografía de fase químicamente modificada: la fase estacionaria se une químicamente a la superficie del soporte.

La cromatografía de fase químicamente modificada es la más utilizada hoy día, debido a que la cromatografía líquido-líquido necesita de un recubrimiento periódico de las partículas del soporte debido a la pérdida de la fase estacionaria por disolución en la fase móvil.

Los rellenos de columna en la cromatografía de fase químicamente modificada se clasifican en:

Fase Inversa: Fase estacionaria apolar.

Fase Normal: Fase estacionaria polar.

2.- Cromatografía de Adsorción.

Es una cromatografía líquido-sólido. Las únicas fases estacionarias que se utilizan en esta cromatografía son la sílice y la alúmina, siendo la sílice la que se prefiere, debido a su mayor capacidad de carga o de muestra. Se elige con frecuencia para separar especies no polares con masas moleculares inferiores a 5000 Da y para separar isómeros estructurales.

3.- Cromatografía de Intercambio Iónico.

La cromatografía de intercambio iónico (**IC**), está basada en la utilización de equilibrios de intercambio iónico entre los iones del soluto cargados y la carga opuesta de la superficie de la fase estacionaria. Tanto los iones del soluto como los de carga equivalente en la fase móvil compiten por su contraparte en la fase estacionaria. De esta manera, la retención relativa de los iones está determinada por la extensión de esta competencia la cual depende de tres variables, como son el pH, la fuerza iónica de la fase móvil y la naturaleza del intercambiador iónico. ⁽²⁵⁾

4.- Cromatografía de exclusión por tamaño.

La cromatografía de exclusión por tamaño, también denominada cromatografía de permeación sobre gel o de filtración sobre geles, las moléculas se separan por su tamaño. Así que el tiempo de residencia medio en los poros de la fase estacionaria depende del tamaño efectivo de las moléculas de los analitos.

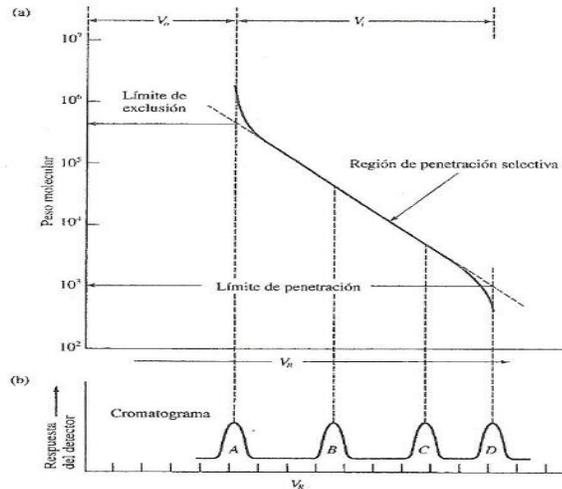


Figura 7.- Curva de calibrado de una columna de exclusión por tamaño.

Las moléculas que son más grandes que el tamaño medio de los poros del relleno son excluidas y de esta forma, esencialmente no se retienen, y por lo tanto, son las primeras en eluir y lo hacen de manera conjunta dando origen al pico A del cromatograma (Figura 8).

Las moléculas de tamaños menores que los poros, pueden penetrar a través del laberinto de poros y así resultan retenidas durante más tiempo; éstas son las últimas en eluir indicadas con la letra D.

El límite de penetración se refiere al peso molecular por debajo del cual las moléculas de soluto pueden penetrar completamente en los poros. El límite de exclusión se refiere al peso molecular por encima del cual las moléculas no se retienen. Los picos B Y C corresponden a moléculas cuya penetración dependen de su tamaño. Son moléculas de tamaño intermedio.

La cromatografía de exclusión por tamaño difiere de las otras técnicas cromatográficas, debido a que no existen teóricamente, interacciones físicas o químicas

entre el analito y la fase estacionaria, por lo que es considerada la mejor opción para el análisis de proteínas.

Sin embargo, es posible que se produzcan interacciones iónicas e hidrofóbicas entre las proteínas y la fase estacionaria formada por partículas de sílice o poliméricas. Por esta razón, las partículas deben cumplir los siguientes requisitos:

- Ser estables mecánica y químicamente.
- Tener bajo contenido en grupos iónicos.
- Uniformidad de poro y tamaño.

Los compuestos que se emplean con este fin son: derivados de dextranos (Sephadex), derivados de agarosa (Sephacosa), y esferas de vidrio. Hay diferentes tamaños de partículas para un gel, pero a menor tamaño, mejor resolución. Los primeros intentos con cromatografía de gel en Sephadex consumieron mucho tiempo para usarse en el laboratorio. Recientemente las columnas de cromatografía de permeación por gel empacadas con microesferas de gel de sílica modificado químicamente (TSK GEL, type SW; Varian, Darmstadt, G.F.R.), han estado disponibles en el mercado. Estas columnas pueden usarse bajo altas presiones en sistemas acuosos y poseen mayor número de platos teóricos⁽²⁵⁾.

Los factores que determinan la separación de las moléculas son: el flujo de la fase móvil, la composición de la fase móvil, el tamaño de partícula, el tamaño del poro.

II.1.1.b.- Instrumentación.

1- Sistemas para el tratamiento de la Fase Móvil.

Un aparato de HPLC está equipado con uno o más recipientes de vidrio o acero inoxidable, cada uno de los cuales contiene de 200 a 1000 mL de un disolvente. Si en la separación se emplea siempre una fase móvil de composición constante se denomina elución isocrática. Si se emplea para la separación dos o más solventes se opera en modo de elución por gradiente. Los recipientes, a menudo se equipan con un sistema para eliminar los gases disueltos – en general oxígeno y nitrógeno- que interfieren formando burbujas en la columna y en los sistemas de detección, impidiendo el proceso cromatográfico. Un desgasificador puede consistir en un sistema de bomba de vacío, ultrasonido ó un sistema de purga. Con frecuencia estos sistemas también contienen un dispositivo para la filtración de polvo y de las partículas sólidas en suspensión en los disolventes para evitar que estas partículas dañen la bomba y los sistemas de inyección. (Figura 9)

2.- Sistema de bombeo.

Los sistemas de bombeo en HPLC son rigurosos y se caracterizan por: (1) la generación de presiones por encima de los 6000psi, (2) un flujo libre de pulsaciones, (3) un intervalo de caudales de 0,1 a 10mL/min, (4) el control y la reproducibilidad del caudal, (5) componentes resistentes a la corrosión. En general existen bombas: recíprocas, de desplazamiento y neumáticas.

3.- Sistema de inyección de muestra.

La inyección de muestra es el factor limitante en la precisión de las medidas en cromatografía de líquidos, debido a la reproducibilidad con que se puede introducir la muestra. El problema se acentúa por el ensanchamiento de banda que acompaña a la sobrecarga de las columnas. Por ello, los volúmenes que se emplean de muestra han de ser muy pequeños de unas pocas décimas de microlitros. Además, se ha de poder

introducir la muestra sin despresurizar el sistema. Para ello se utiliza lazos de muestra. Estos dispositivos son normalmente parte integrada del equipo cromatográfico. Es necesario que la muestra se filtre antes de introducirla a la columna, para evitar que partículas suspendidas en la solución puedan dañar la columna y los sistemas de detección.

4.- Columnas.

Las columnas se construyen de acero inoxidable ó en material polimérico de diámetro interno uniforme. Recientemente se han empezado a fabricar columnas con diámetros internos que oscilan entre 1 y 4,6 mm y se rellenan con partículas de tamaño de 3 o 5 μm . A menudo, su longitud es de 2 a 7,5cm, tienen hasta 100.000 platos/metro y presentan la ventaja de menor tiempo de operación y mínimo consumo de disolvente.

En muchas ocasiones, para aumentar la vida de la columna analítica, se coloca una precolumna que elimina los contaminantes de los disolventes, y también los componentes de la muestra que se unen irreversiblemente a la fase estacionaria. Cuando la precolumna se contamina se vacía y se rellena de nuevo o se reemplaza por otra nueva del mismo tipo. Así se protege la columna analítica sacrificando la precolumna.

5.- Detectores.

Los detectores en cromatografía de líquidos son de dos tipos básicos. Los detectores que se basan en la medida de una propiedad de la disolución responden a una propiedad del efluente, tal como el índice de refracción, la constante dieléctrica, o la densidad que se modifica por la presencia de los analitos. Por el contrario, los detectores basados, en una propiedad del soluto responden a alguna de las

propiedades del soluto, como la absorbancia en el UV, fluorescencia o amperométrico, que no son inherentes a la fase móvil.

Uno de los detectores más ampliamente usado es el detector Ultravioleta-Visible (UV-Vis): Miden la absorbancia de algunos de los efluentes de una columna cromatográfica. Muchos detectores de absorbancia son dispositivos de doble haz, uno de los haces pasa por la cubeta de flujo y el otro a través de un filtro que reduce su intensidad. Estos detectores pueden ser de Onda Variable que solo permiten el análisis a una sola longitud de onda ó detectores de arreglo de diodos (DADs) que permiten la recolección simultánea de cromatogramas en diferentes longitudes de onda en una sola corrida. Luego de finalizada la corrida, se puede observar el cromatograma en cualquiera de las longitudes de onda deseadas (por lo general entre 190nm y 400nm) a fin de confirmar la ventaja de la longitud de onda elegida.

6. -Estación de trabajo.

La señal del detector es enviada al integrador o estación de trabajo, el cual realiza un gráfico denominado cromatograma, representación gráfica de la intensidad en función del tiempo. Idealmente se trata de picos gaussianos y cada pico corresponde a un componente de la muestra original. Además calcula el área correspondiente a cada pico, la cual es proporcional a la cantidad de sustancia. ⁽²⁵⁾

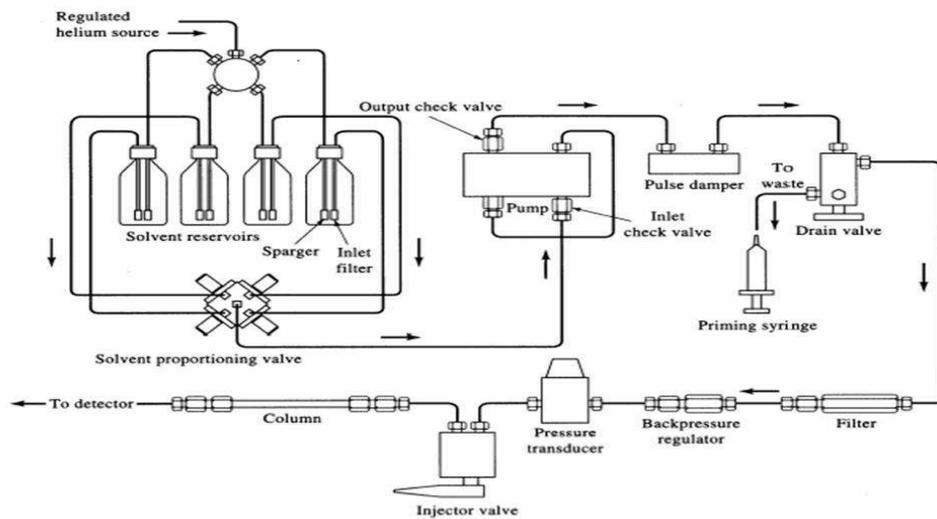


Figura 8.- Diagrama de un aparato HPLC.

II.2.- ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN MOLECULAR.

Cuando pasa radiación por una capa transparente de un sólido, líquido o gas, pueden eliminarse selectivamente ciertas frecuencias por el proceso llamado absorción. En este caso, la energía electromagnética es transferida a las moléculas que constituyen la muestra. Como resultado de ello, estas partículas son ascendidas desde su estado de más baja energía (estado fundamental) a estados de más alta energía (estados excitados).

La espectroscopía de absorción molecular se basa en la medida de la transmitancia T o de la absorbancia A de disoluciones que se encuentran en cubetas transparentes que tienen un camino óptico de b (cm). Normalmente, la concentración c de un analito absorbente está relacionada linealmente con la absorbancia como se representa en la ecuación:

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc$$

La absorción por moléculas de las regiones ultravioleta y visible es el resultado de transiciones electrónicas en las que intervienen electrones de enlace.

II.2.1.- Instrumentación.

Los instrumentos para medir la absorción de radiación ultravioleta y visible están compuestos por los siguientes componentes:

1- Fuente.

Para que sea apropiada para mediciones de absorción, la fuente de radiación debe cumplir ciertos requisitos. Primero debe generar un haz de radiación con suficiente potencia para que se detecte y se mida con facilidad. Segundo, la fuente debe proporcionar radiación continua; es decir, su espectro debe contener todas las longitudes de onda de la región en que va a ser usada. Finalmente, la fuente debe ser estable; la potencia del haz radiante debe permanecer constante en un intervalo considerable de longitudes de onda.

Las fuentes más utilizadas con:

- Lámpara de deuterio e hidrogeno:

La excitación eléctrica del deuterio o hidrógeno a baja presión produce un espectro continuo en la región ultravioleta. El mecanismo por el cual se produce el espectro continuo requiere la formación inicial de una especie molecular excitada

seguida de la disociación de la molécula excitada para dar dos especies atómicas más un fotón ultravioleta.

- Lámpara de arco de xenón:

Estas lámparas producen una radiación intensa como consecuencia del paso de una corriente a través de una atmósfera de xenón. El espectro es continuo en un intervalo comprendido entre aproximadamente 200 y 1.000nm, con el máximo de intensidad a aproximadamente 500nm.

2.- Selector de longitud de onda.

Para la mayoría de los análisis espectroscópicos se necesita una radiación constituida por un grupo limitado, estrecho y continuo de longitudes de onda denominado "banda". Una anchura de banda estrecha aumenta la sensibilidad de las medidas de absorbancia, puede proporcionar selectividad y, con frecuencia, es un requisito para obtener una relación lineal entre la señal óptica y la concentración. En general existen dos tipos de selectores de longitud de onda: Filtros (de absorción y de interferencia) y Monocromadores.

2.a.- Monocromador.

Un monocromador es un aparato que descompone la radiación en sus longitudes de onda componentes y permite el aislamiento de cualquier porción deseada del espectro del resto. Están diseñados para poder hacer barridos espectrales, es decir, variar de forma continua y en un amplio intervalo, la longitud de onda de la radiación.

3.- Recipientes para la muestra.

Se emplean celdas o cubetas para contener la muestra y al disolvente. Estos recipientes deben construirse de un material que deje pasar la radiación de la región espectral de interés. Para trabajar en la región ultravioleta (por debajo de 350nm) se requiere cuarzo o sílice fundida; cualquiera de estas sustancias son transparentes en la región visible. La longitud de la cubeta más común para los estudios en la regiones ultravioleta y visible es de 1cm.

4.- Detectores.

Un detector ideal debe tener una elevada sensibilidad, una elevada relación señal-ruido y una respuesta constante en un intervalo considerable de longitudes de onda. Además debe tener un tiempo de respuesta rápido y una señal de salida igual a cero en ausencia de iluminación.

4.a.-Detectores de fotones:

- Celulas fotovoltaicas: La energía radiante genera una corriente en la interfase entre una capa semiconductor y un metal.
- Fototubo: La radiación causa la emisión de electrones de una superficie sólida fotosensible.
- Tubos fotomultiplicadores: Contiene una superficie fotoemisora, así como varias superficies adicionales que emiten una cascada de electrones cuando son alcanzadas por los electrones procedentes del área fotosensible.

- Detectores de fotoconductividad: La absorción de radiación por un semiconductor produce electrones, dando lugar a un aumento de la conductividad.

5.-Tipos de instrumentos espectroscópicos.

Existen cuatro tipos generales de instrumentos espectroscópicos: haz sencillo, doble haz espacial, doble haz temporal, multicanal.

5.a.- Intrumentos de haz sencillo:

Consta de una fuente de radiación, un filtro o un monocromador para la selección de la longitud de onda, cubetas contrastadas que pueden interponerse alternativamente en el haz de radiación, un detector, un amplificador y un dispositivo de lectura. Normalmente, un instrumento de haz sencillo necesita una fuente de alimentación estabilizada para evitar errores como resultado de los cambios en la intensidad del haz durante el tiempo requerido para ajustar el 100 por 100 T y determinar el porcentaje de T del analito ⁽²⁵⁾.

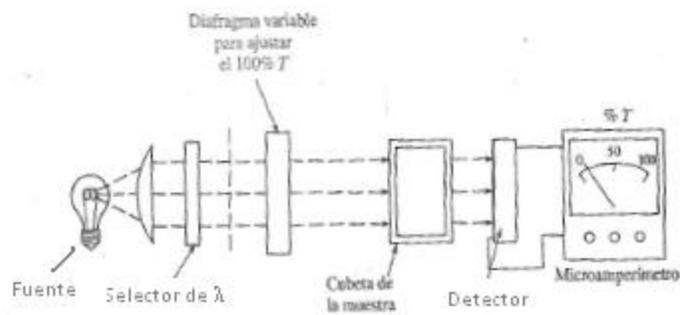


Figura 9.- Fotómetro de haz sencillo.

III.- REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

✓ M. Veiga y Col (2004). Evaluaron los niveles de mercurio en la orina de personas expuestas al vapor de mercurio debido a la minería artesanal en El Callao, Edo Bolívar. Analizaron un total de 209 muestras de orina (66 mujeres, 62 niños, 48 molineros y 33 mineros), empleando como técnica analítica, Espectroscopía de Absorción Atómica (AAS). Alrededor del 27% de las mujeres y el 53% de los niños, presentaron niveles de Hg en la orina por encima del nivel tolerable de 5 µg Hg/g creatinina. El 30% y 79% de los mineros y molineros, respectivamente, tenían niveles de Hg en la orina por encima del nivel tolerable. Aproximadamente el 52% de los molineros mostraron niveles por encima de 100 µg Hg/g creatinina y el 14,6% presentaron valores extremadamente altos de mercurio en orina que van de 1221 a 3260 µg Hg/g creatinina. Este resultado permitió generalizar que más del 90% de los molineros analizados presentan niveles de mercurio en la orina por encima del nivel permisible. La manifestación común de la exposición crónica a niveles excesivos de vapor de mercurio fue sabor metálico, enfermedades de las encías como la gingivitis, úlceras. También delirio, alucinaciones, así como eretismo (respuestas emocionales exageradas), insomnio, dolor en el pecho, disnea, tos, neumonitis e insuficiencia renal⁽²⁶⁾.

✓ S. Counter y Col (2004). Evaluaron la exposición a Mercurio en niños, incluyendo exposición fetal (como resultado del consumo de pescado, inhalación de vapores de mercurio elemental, el uso de cremas tópicas que contienen mercurio y amalgamas dentales). Los niños son particularmente más vulnerables a intoxicación de mercurio. Los efectos son mucho más devastadores debido a que el sistema nervioso central y sistemas fisiológicos generales se encuentran en desarrollo⁽²⁷⁾.

✓ S. Bose-O'Reilly y Col (2008). Evaluaron la influencia del mercurio en 166 niños expuestos al mercurio elemental debido a la quema de la amalgama oro-mercurio en la minería artesanal en Indonesia y Zimbabue. Encontraron que las concentraciones de mercurio fueron significativamente más altas en niños expuestos directamente al mercurio debido a que participan en el proceso o por vivir cerca de los molinos. Los principales síntomas que manifestaron fueron ataxia y problemas de coordinación. En algunos de estos niños se observó proteinuria, como indicador de daño a nivel renal. El estudio sugirió profundizar aún más en los efectos que el mercurio tiene para la salud principalmente en niños que están expuestos a este en la actividad minera ⁽²⁸⁾.

✓ C. Tineo (2010). Determinó los niveles de mercurio en la orina de 136 niños de diferentes centros educativos de El Callao, Edo Bolívar. Las técnicas empleadas para el análisis fueron Espectroscopía de Absorción Atómica con Vapor Frío (CV-AAS) y Espectroscopía de Fluorescencia Atómica con Vapor Frío (CV-AFS). También determinó los niveles de creatinina en las orinas empleando el método de Espectroscopía de Absorción Molecular. Encontró que un 38% de los niveles de mercurio son mayores que el valor referencial para personas normales (no expuestas) dado por la OMS (5 µg Hg/g creat) y que los niveles de mercurio de los niños, disminuye a medida que la ubicación de su casa de habitación se aleja de los molinos ⁽²⁹⁾.

✓ M. Matos (2010). Determinó los niveles de mercurio y creatinina en la orina de 79 niños de diferentes centros educativos de El Callao, Edo Bolívar, empleando como técnicas analíticas: Espectroscopía de Absorción Atómica con Vapor Frío (CV-AAS) y Espectroscopía de Fluorescencia Atómica con Vapor Frío (CV-AFS) para determinar el mercurio; y, Espectroscopía de Absorción Molecular para determinar creatinina. Encontró que un 31% de los

niños presentaron valores de mercurio por encima del valor referencial para personas no expuestas dado por la OMS ($5 \mu\text{g Hg/g creat}$). No se encontraron diferencias significativas cuando se relacionaron las medianas de las concentraciones de Hg con variables como la edad, el sexo y el tiempo de residencia en El Callao⁽³⁰⁾.

✓ D. Ratge y colaboradores (1982), Investigaron el valor de las columnas de cromatografía de permeación de gel para diferenciar las proteinurias y monitorear los efectos de una enfermedad diagnosticada en el riñón (tubular o glomerular). Utilizaron la técnica de HPLC y estudiaron los efectos del pH y fuerza iónica del eluyente en la separación de proteínas urinarias. Se empleó una precolumna TSK GWSP y dos columnas TSK G 3000 SW en serie para separar las proteínas urinarias. Se obtuvieron resultados diferentes: La excreción de proteínas de menor peso molecular que la albúmina se correlaciona con daño tubular. La albúmina y otras proteínas de mayor peso molecular fueron asociados con la enfermedad glomerular.⁽³¹⁾

✓ S. Iwata (2001), recomendó el uso del método de Cromatografía de permeación de gel para la determinación de proteínas en la orina. Las proteínas de alto peso molecular, como la albúmina, no se permearon dentro del gel, por lo tanto eluyeron primero. El ensayo se aplicó de forma satisfactoria a una variedad de proteínas, independientemente de su naturaleza o su peso molecular. Las encuestas realizadas en cinco laboratorios clínicos, empleando diferentes instrumentos de HPLC con el mismo tipo de columna, mostró una linealidad de la curva de respuesta entre 10-5000ppm y una precisión de la medida satisfactoria (Coeficiente de Variación = 2,1%) para tres muestras de orina con diferentes concentraciones de proteína.⁽³²⁾

✓ W. D. Comper y colaboradores (2004), compararon diferentes métodos para la determinación de albúmina en la orina de pacientes diabéticos como marcador de nefropatía: radioinmunoensayo (RIA), inmunonefelometría (IN), y dos métodos diferentes de inmunoturbidimetría (IT), así como por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Se encontró una concentración de albúmina en la orina mayor utilizando HPLC en comparación con inmunoturbidimetría, a su vez, la concentración de albúmina medida por inmunoturbidimetría fue mayor en comparación con radioinmunoensayo e inmunonefelometría. Esto se debió al parecer, porque existe en la orina, dos tipos de albúmina, la no inmunoreactiva y la inmunoreactiva que sumadas nos darían el total real de albúmina. Esta albúmina no inmunoreactiva puede detectarse y cuantificarse por HPLC. El estudio sugirió la necesidad de evaluar las muestras mejor por HPLC por su mayor sensibilidad.⁽³³⁾

✓ J. H. Contois y colaboradores (2006), evaluaron la eficiencia entre el método de inmunoturbidimetría y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), para la determinación de albumina en orina. Se analizaron muestras al azar de 32 personas sanas y 60 diabéticos de tipos 1 y 2. Tanto en diabéticos como no diabéticos las concentraciones de albúmina urinaria fueron más altas por HPLC (LOD: 6,1 mg/L) que por inmunoturbidimetría. Por lo tanto, los resultados por HPLC mostraron una mayor eficiencia.⁽³⁴⁾

✓ M. A. Pesce y colaboradores (1972), Desarrollaron un procedimiento a micro-escala para la determinación de proteínas fluido cerebroespinal y en orina, empleando una solución de Acido tricloroacético – Rojo de ponceau. Las proteínas en presencia del Acido Tricloroacético son precipitadas y junto al colorante Rojo de Ponceau da un precipitado de color rojo que al disolverse en una solución de hidróxido de sodio se obtiene una solución

de color violeta que puede medirse en un espectrofotómetro a 560 nm. El color es proporcionalmente lineal a la cantidad de proteínas presentes ⁽³⁵⁾.

✓ C. Abdenmour y col (2001), investigaron el efecto a nivel renal de la exposición al mercurio en trabajadores de una planta de cloro-álcali al noreste de Argelia. Observaron que el número de casos de proteinuria más alto en los trabajadores con exposición directa al mercurio. Las proteínas se determinaron precipitándolas con una solución de ácido tricloroacético y el método de Biuret, y se midieron en un espectrofotómetro. La cantidad de proteínas excretadas fue relativamente independiente a la concentración de mercurio en sangre y orina. ⁽³⁶⁾

Como se describió previamente, el mercurio es ampliamente utilizado en la minería artesanal para la extracción del oro, pero constituye un gran riesgo a la salud. El vapor de mercurio emitido en esta actividad, es inhalado por las personas que laboran directamente con él, como de las que viven en las inmediaciones. La exposición prolongada a este metal afecta el sistema nervioso central y órganos depuradores como el riñón, entre otros. Los niños son particularmente más vulnerables a la intoxicación con el mercurio, debido a que sus órganos están en pleno desarrollo. La manifestación más común de una nefropatía mercurial es la excreción de proteínas en la orina debido a la gran afinidad que el mercurio tiene por los grupos tioles $-SH$ presentes en las mismas. Principalmente la Albúmina, ha sido considerada la proteína de captura y transporte del mercurio dentro de la sangre y constituye un marcador eficaz para evaluar la aparición o progresión de una lesión a nivel renal. La técnica empleada para su determinación es la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia, específicamente la Cromatografía de Exclusión por Tamaño, debido a su alta sensibilidad, selectividad y reproducibilidad en el análisis. Otro marcador ampliamente utilizado para evaluar un daño a nivel renal son las proteínas totales. Para la determinación de estas, se emplea como técnica la Espectroscopía de Absorción Molecular UV-Visible.

IV.- OBJETIVOS

IV.1.- OBJETIVO GENERAL.

Determinar los niveles de albúmina en la orina y correlacionarlos con los niveles de mercurio en niños de instituciones educativas en El Callao, estado Bolívar.

IV.2.- OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- ✓ Optimizar las condiciones experimentales para la determinación de albúmina por cromatografía de exclusión por tamaño.
- ✓ Optimizar las condiciones de tratamiento de las muestras de orina para la determinación de Albúmina.
- ✓ Determinar las figuras de mérito del método.
- ✓ Determinar la concentración de albúmina en las muestras de orina de los niños seleccionados.
- ✓ Correlacionar la concentración de albúmina con la concentración de mercurio en las muestras.

V.- PARTE EXPERIMENTAL

V.1.- INSTRUMENTACIÓN.

V.1.1.- Determinación de la Albúmina.

Para la determinación de la Albúmina en la orina se empleó un Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia marca Hewlett Packard, Serie 1100 (Agilent technologies) constituido por:

- Bomba cuaternaria: que permite cambiar la composición de la fase móvil conforme transcurra el análisis. Tiene la capacidad de suministrar cuatro tipos de solventes diferentes, además de proporcionar un flujo entre 0,1-5 mL/min y generar una presión máxima de 400 bar.
- Automuestreador: el proceso de inyección es automatizado y está constituido por un lazo que posee una capacidad de 1-100 μ L y un contenedor de 100 portaviales.
- Detector espectrofotométrico UV-visible de longitud de onda variable.

Las condiciones de lectura de la señal cromatográfica se tomaron del trabajo realizado por Ratge y colaboradores ⁽³¹⁾, las cuales se presentan en la tabla 3.

Tabla 3.- Condiciones de análisis.

Fase Móvil	Buffer de fosfato ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0,01M (pH 7,40 \pm 0,01)
Flujo de la Fase Móvil	1,00 mL/min
Volumen de inyección	20 μL
Longitud de onda de trabajo	280 nm
Columna	<p>Dos columnas conectadas en serie:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sepax Nanofilm SEC-250 (300mm x 4,6 mm d.i.), con un rango de separación entre 1500 y 1.000.000 Da • TSK-Gel G2000SW (300mm x 7,5mm d.i.), con un rango de separación entre 5000 y 100.000 Da

- Para centrifugar las muestras de orinas, se utilizó una centrifuga marca Thermo Scientific CL2 (1000-3900 rpm).

- Para medir el pH de las soluciones se empleo un equipo marca Orion modelo 420 A con un electrodo selectivo de membrana de vidrio marca Thermo Scientific.

- Bomba peristáltica Marca Gilson, Minupuls 3.

V.1.2.- Determinación de proteínas totales.

Para la determinación de las proteínas totales en la orina se empleó un Espectrofotómetro de UV-Vis Thermo Electron Corporation, modelo Génesys, Serie 10, con las siguientes características:

Tabla 4.- Características del equipo empleado para el análisis.

Lámpara para el UV	Xenón. Rango de longitud de onda de 190-1100 nm.
Lámpara para el visible	Tungsteno – Halogeno. Rango de longitud de onda de 325-1100 nm.
Software	Absorbancia / Transmitancia / Concentración.
Rangos de lectura	0,3-125 %T; -0,1-3,0 A; 0-9999 C. *
Tipo de Celda	Cuarzo. 1cm de paso óptico.

*T= Transmitancia; A=Absorbancia; C=Concentración.



Figura 10.- Espectrofotómetro UV-Vis modelo Génesys, serie 10.

- Para centrifugar las muestras de orina, se utilizó una centrifuga marca Thermo Scientific CL2 (1000-3900 rpm).

- Para centrifugar el precipitado de proteínas, se empleó una ultracentrifuga refrigerada Eppendorf 5810R (Hamburgo, Alemania) con rotor basculante.

V.2.- REACTIVOS EMPLEADOS.

- Agua desionizada a 18 mΩ. (Sistema Nanopure Barnstead) y grado Mili-Q (Milipore).
- Fase móvil: se empleó un Buffer de fosfato ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0,01M (pH $7,40 \pm 0,01$) conteniendo NaCl 0,138 M y KCl 0,0027M (Merck).
- Estándar de Albúmina Bovina Fracción V, 95-97 % p/p (Sigma Aldrich).
- Cartucho de Azul de Sefarosa, Econo-Pac, 5mL, Bio-rad.



Figura 11.- Cartucho de Azul de Sefarosa.

Para la elución en el cartucho de Azul de Sefarosa se emplearon tres buffer como se observa en la tabla 5:

Tabla 5.- Buffer empleados para la separación de la Albúmina de las muestras de orina empleando un Cartucho de Azul de Sefarosa

Buffer A	Buffer de Fosfato 20mM, pH (7,10±0,01)
Buffer B	NaCl 1,4M en Buffer de Fosfato 20mM, pH (7,10±0,01)
Buffer C	NaSCN 1,5M en Buffer de Fosfato 20mM, pH (7,10±0,01)

- Buffer de Fosfato ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0,01M (pH 7,99 ± 0,01) conteniendo NaCl 0,138 M y KCl 0,0027M.
- Solución de Acido tricloroacético de 300g/L (Merck al 99,5%).
- Solución de Ponceau S: 5 %^{v/v} Acido Acético - 0,1 %^{p/v} Rojo de Ponceau.
- TCA – Ponceau S: Solución Ponceau S (6%^{v/v}) en una solución de Acido Tricloroacético 300 g/L (Merck al 99,5%).
- Solución de Hidróxido de Sodio 8 g/L (Merck al 99%).

V.3.- PROCEDIMIENTO.

V.3.1.- Población estudiada.

Entre los meses de Febrero y Marzo del año 2010 se recolectaron un total de 97 muestras de orina pertenecientes a niños en edad escolar, entre 5 y 13 años, habitantes de El Callao, estado Bolívar, Venezuela. La ubicación geográfica de El Callao se muestra en las figura 12.



Figura 12.- Ubicación geográfica de El Callao, Estado Bolívar, Venezuela.

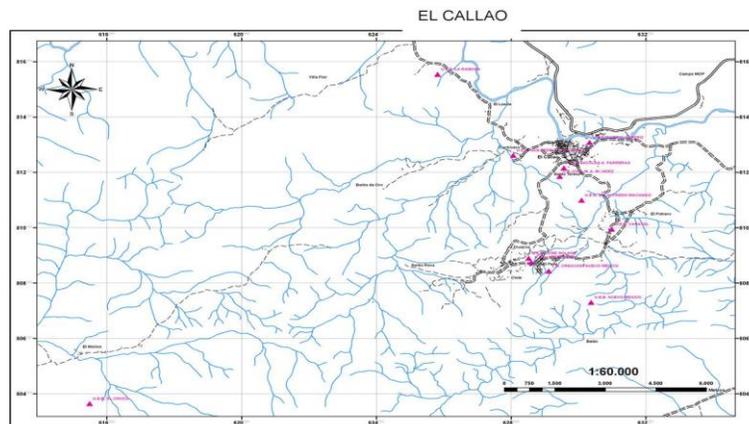


Figura 13.- Ubicación geográficas de los colegios muestreados en El Callao.

El grupo de niños se seleccionó realizando un muestreo aleatorio por conglomerado bietápico con sub muestras. Las unidades de observación que componen una población se reúnen en unidades de muestreo de mayor tamaño, llamadas conglomerados. El marco muestral fueron las escuelas aledañas al casco histórico de la población de El Callao. La primera etapa fueron las escuelas y la segunda los salones.

Para calcular el tamaño muestral se utilizó la siguiente expresión:

$$n = \frac{N * Z_{\alpha}^2 * p * q}{d^2 * (N - 1) + Z_{\alpha}^2 * p * q}$$

Donde:

N: número total de la población.

Z_{α}^2 : Coeficiente que depende del nivel de confianza (al 95%, el valor de Z_{α}^2 es 1,95).

p: El valor de “p” nos da una idea del parámetro que queremos medir, esta idea se puede obtener revisando la literatura, por estudios previos con poblaciones, en caso de no tener dicha información se utiliza el valor de 0,5 (50%).

Q: (1-p)

D: Precisión, para este caso es del 3%.

La proporción obtenida para la población total de los niños entre 6 a 13 años de todas las escuelas seleccionadas fue aproximadamente el 10%. A cada una de las escuelas se le calculó el 10% de los niños manteniendo la representatividad de sexo y edad. Teniendo el número de muestras representativas tanto de edad y sexo por colegio, se procedió a realizar la selección aleatoria de la siguiente forma:

Se empleó la tabla de números aleatorios (apéndice XI.1), la cual está hecha de modo que todos los números 0,1...,9, aparecen aproximadamente con la misma frecuencia⁽³⁷⁾. Combinando pares de números se obtiene los números desde 00 hasta 99. Usando los números de tres en tres, se tiene los números desde 000 hasta 999, etc. En dicha tabla debe entrarse de una manera aleatoria. Una forma es colocar en cualquier punto de la tabla un lápiz y con un desplazamiento de éste hacia abajo se seleccionan los números que se requieren con la misma cantidad de dígitos cuyo valor esté dentro de N. Al finalizar la fila se salta a la columna siguiente y se comienza desde arriba. Si un número se repite debe eliminarse y continuar. Estos niños seleccionados fueron posteriormente localizados.

Debido a que no se encontró en la bibliografía, valores reportados de proteinuria en niños para poder comparar, se decidió comprobar si con el método optimizado podían determinarse valores medibles de proteínas en orina. Se analizó un pequeño grupo Control integrado por 5 niños en edad escolar (entre 6 y 13 años), que residen en Caracas.

V.3.2.- Encuesta epidemiológica.

Se realizó una encuesta epidemiológica con la intención de obtener información de los niños seleccionados que residen en El Callao (Apéndice XI.2).

La encuesta contempló los siguientes aspectos:

Datos relacionados con el niño: Edad, sexo, alimentación, enfermedades, si han presentado posibles síntomas relacionados con la contaminación mercurial, tiempo de residencia en el Callao, sector de habitación, distancia de la casa de habitación y escuela con posibles puntos de emisión como: molinos, minas, joyerías y fundiciones.

Datos relacionados con los padres: Edad, número de hijos, oficio.

V.3.3.- Recolección y almacenamiento de las muestras.

Se recolectaron muestras de orina de 24 horas en recipientes de vidrio color ámbar. Estos recipientes de vidrio fueron previamente identificados con un código único y pesados antes y después de la entrega. La orina de 24 horas se recolecta de la siguiente forma: primera micción de orina se desecha y se recogen las subsiguientes orinas hasta la primera micción del día siguiente.

Una vez entregadas las muestras, se les midió la densidad con el densímetro (Fig. 14) y junto con el peso de la orina recogida se calculó el volumen total excretado durante las 24 horas. Luego se tomaron alícuotas de cada muestra, se trasvasaron a colectores de plástico de orina y se mantuvieron refrigeradas hasta su análisis a una temperatura de -35°C .



Figura 14.- Densímetro ATAGO, modelo URC-NE.

V.4- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

V.4.1.- Determinación de la Albúmina.

La determinación de la albúmina es un proceso que consta de dos partes: 1) La

separación de la albúmina de la matriz de la orina; y, 2) la identificación y cuantificación de la misma. El procedimiento aplicado se basó en el descrito por Ratge y colaboradores ⁽³¹⁾ donde se emplea como técnica analítica la Cromatografía Líquida de Alta eficiencia (HPLC).

V.4.1.a.- Optimización de las condiciones de análisis.

Se aplicaron las condiciones mencionadas en la literatura para evaluar la reproducibilidad de la misma. Primero se inyectó un patrón de Albúmina de 300mg/L en el cromatógrafo, bajo las condiciones de análisis descritas en la Tabla 3.

a.1.- Elaboración de la curva de calibración.

Una vez obtenidas las condiciones para la determinación de la concentración de albúmina, se procedió a elaborar la curva de calibración. Los patrones se realizaron a partir de diluciones sucesivas de un patrón de 300mg/L.

Tabla 6.- Rango de concentración de los patrones empleados para la curva de calibración.

PATRÓN	Concentración (mg/L)
1	21,1 ± 0,1
2	151 ± 1
3	210 ± 2
4	302 ± 2

V.4.1.b.- Procedimiento para la determinación de la concentración albúmina.

b.1.- Procedimiento de separación 1.

Este procedimiento se basa en el empleo de un método de extracción en fase sólida. El objetivo básico de este método es concentrar y purificar la Albúmina de la matriz de la orina por adsorción en un sólido adsorbente. El cartucho empleado fue de Azul de Sefarosa (gel de agarosa unido covalentemente al colorante Cibacron azul F3GA). El azul de Sefarosa es un grupo específico adsorbente, la albúmina se enlaza por interacciones electrostáticas y/o hidrofóbicas con el ligando aniónico aromático, facilitando su separación del resto de la matriz de la orina.

Las muestras de orina se descongelaron a temperatura ambiente. Se tomaron 2mL de la muestra de orina, se colocó en un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2.500rpm por 10 min para separar el sedimento del líquido. Para eliminar cualquier residuo suspendido en el líquido, se filtraron 0,5 ml del líquido sobrenadante con un filtro de celulosa de 0,45 μ m. El cartucho se conectó a una bomba peristáltica. Inicialmente se le pasó 10mL de Buffer A para lavarlo (Buffer de Fosfato 20 mM, pH 7,10 \pm 0,01) a un flujo de 0.01 mL/min. Luego se inyectaron 0,5mL de orina manteniendo el mismo flujo de inyección. Transcurrido 5 min para que se estableciera el equilibrio entre el analito y la fase estacionaria se lavó el cartucho con 10mL de Buffer A para eluir la matriz de la orina mientras la albúmina quedaba retenida. Seguidamente se pasó 10mL de Buffer B (NaCl 1,4M en Buffer de fosfato 20mM, pH 7,10 \pm 0,01) para eluir la albúmina. Por último se lavó el cartucho con el Buffer C (NaSCN 1,5M en Buffer de fosfato 20mM, pH 7,10 \pm 0,01) para eliminar cualquier residuo que haya quedado en el cartucho y prepararlo para otra muestra. Los extractos se midieron bajo las condiciones descritas en la página 39, tabla 3.

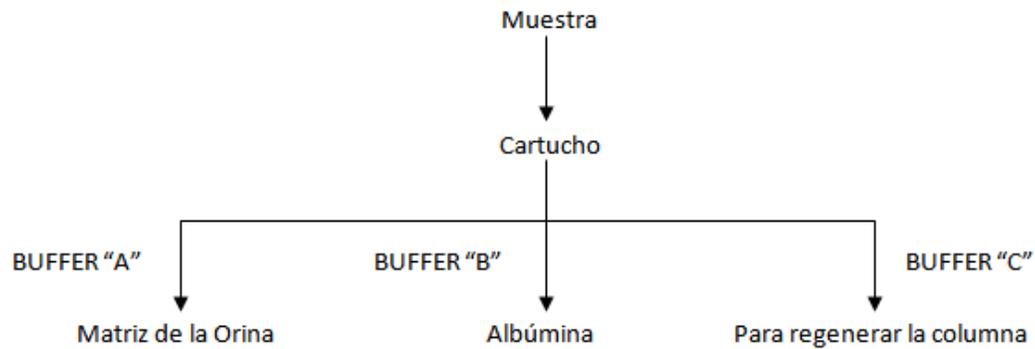


Figura 15.- Diagrama de separación de la Albúmina empleando el cartucho de Azul de Sefarosa.

b.2.- Procedimiento de separación 2.

Se siguió el procedimiento empleado por Pesce y col⁽³⁵⁾, con algunas modificaciones.

Las muestras se descongelaron y se tomaron 2mL de cada una, se colocaron en tubos de centrifuga y se centrifugaron a 2.500rpm por 10 min para separar el sedimento del líquido. Se colocó en tubos de centrífugas, 500 μ L del liquido sobrenadante de la orina y 50 μ L de la solución de Ácido Tricloroacético (300g/L). Luego se centrifugaron a 5000 rpm por 10 min empleando una ultracentrifuga refrigerada. Se descartó el líquido sobrenadante del precipitado de proteínas de color blanco y se le agregó 1mL de buffer de fosfato ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0,01M (pH 7,99 \pm 0,01) para disolverlo. La solución resultante se filtró con un filtro de celulosa de 0,45 μ m para eliminar cualquier residuo suspendido, se colocó en un vial y se midió en el cromatógrafo a una longitud de onda de 280 nm, a un flujo de 1mL/min de Fase Móvil (Buffer de fosfato 0,01M, pH 7,40 \pm

0,01) y volumen de inyección de 30 μL . En este procedimiento no fue necesario el empleo de un colorante como el Ponceau S, debido a que la señal de la albúmina se observaba a la longitud de onda de trabajo sin necesidad de acomplejarla.

V.4.2.- Determinación de proteínas totales.

La determinación de las proteínas totales es un proceso que consta de dos partes: 1) La separación de las proteínas de la matriz de la orina; y, 2) la identificación y cuantificación de las mismas. El procedimiento aplicado se basó en el descrito por Pesce y colaboradores⁽³⁵⁾, donde se emplea como técnica analítica la Espectroscopía de Absorción Molecular UV-Visible.

En este método se empleó el ácido tricloroacético, debido a que la adición de éste a una solución de proteínas, produce su precipitación en forma de una suspensión fina que posteriormente puede cuantificarse fotométricamente. El enlace del ácido tricloroacético a la proteína se produce a nivel de los grupos catiónicos de las cadenas laterales y en los enlaces peptídicos, como se muestra en la figura 16.

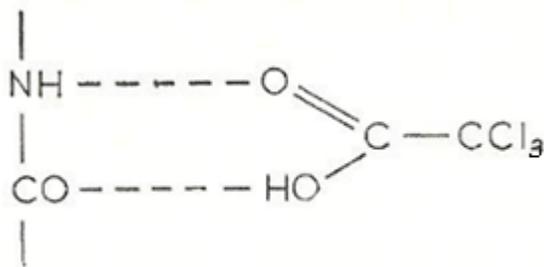


Figura 16.- Enlace del Acido Tricloroacético a la proteína.

La eliminación del agua y su sustitución por el radical, muy poco polar, CCl_3^- , destruye la hidrosolubilidad de la proteína y tiende a hacerla soluble en solventes no polares⁽³⁸⁾.

V.4.2.a.- Optimización de las condiciones de análisis.

a.1.- Selección de la longitud de onda.

Para seleccionar la longitud de onda de trabajo se realizó un barrido espectral de 500 nm hasta 600 nm, empleando un patrón de 251 ± 1 mg/L.

V.4.2.b.- Procedimiento de lectura.

Se siguió el procedimiento empleado por Pesce y col⁽³⁵⁾ tanto para las muestras como para los patrones, el cual se describe a continuación:

Las muestras de orina fueron descongeladas. Se tomaron 2mL de cada muestra, se colocaron en tubos de centrifuga y se centrifugaron a 2.500rpm por 10 min para separar el sedimento del líquido. Una vez clarificada la orina, se colocó en tubos de centrifuga, 500 μ L del liquido sobrenadante de la orina y 50 μ L de la solución Acido tricloroacético-Ponceau S (300g/L). Luego se centrifugaron a 5000 rpm por 10 min. Se descartó el líquido sobrenadante del precipitado de color rojo y se le agregó 700 μ L de la solución de Hidróxido de Sodio (8 g/L) para disolver el precipitado. La solución resultante de color violeta se midió en un espectrofotómetro UV-Visible a una longitud de onda de 560 nm, empleando una celda de cuarzo de 1 cm de camino óptico.

El sedimento de la orina se trató con 1 mL de Buffer de fosfato ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0,01M (pH $7,40 \pm 0,01$), se homogeneizó la solución por agitación y luego se centrifugó a 2.500rpm por 10 min en una centrifuga Thermo Scientific CL2 con el fin de separar lo que no se disolvió en el buffer de la solución. Se tomaron 500 μ L del sobrenadante y se trasvasó a un tubo de centrifuga, se le añadió 50 μ L de la solución Acido tricloroacético-

Ponceau S (300g/L) y se trato de la misma manera como se describió previamente para el tratamiento del liquido sobrenadante de la orina.

V.4.2.c.- Determinación de las figuras de mérito del método.

c.1.- Precisión:

La precisión del método se determinó analizando cinco veces la concentración de proteínas en una muestra de orina⁽³⁹⁾.

c.2.- Limite de detección (LOD) y de Cuantificación (LOQ):

Los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ), se determinaron mediante el método indicado por Miller⁽⁴⁰⁾, donde se utiliza la curva de calibración y el error típico de la regresión. Están definidos como se muestra a continuación:

Error típico de la regresión:

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$$

El valor de \underline{Y} en el límite de detección y en el de cuantificación viene dado por las siguientes ecuaciones:

$$Y_{LOD} = Xb_{(Pto\ Corte)} + 3S_{y/x}$$

$$Y_{LOQ} = Xb_{(Pto\ Corte)} + 10S_{y/x}$$

Una vez conocido el valor de Y, se introduce en la ecuación de la curva de calibración y despejándose x se obtiene la concentración de LOD y de LOQ.

V.4.2.d.- Validación del método.

Para validar el método se procedió a determinar el porcentaje de recuperación. Para ello, se empleó el patrón de $251 \pm 1\text{mg/L}$ y dos muestras de concentración conocida de proteínas. En tubos de centrifuga se colocaron $250\mu\text{L}$ de orina y se mezclaron con $250\mu\text{L}$ del patrón, luego se adicionaron $50\mu\text{L}$ de TCA-Ponceau S, y se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente (apartado V.4.2.b, pág. 51)

VI.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.1.- Determinación de la Albúmina.

La determinación de la albúmina como ya se mencionó, es un proceso que consta de dos partes: 1) La separación de la albúmina de la matriz de la orina; y, 2) la identificación y cuantificación de la misma. La técnica analítica empleada para la determinación de la concentración fue la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC).

VI.1.1.- Optimización de las condiciones de análisis.

Se inyectó un patrón de Albumina de 300mg/L bajo las condiciones descritas en la página 39 (Tabla 3). Como se observa en la figura 17, el tiempo de retención en el que eluyó el pico de la albúmina fue de 8,8 min.

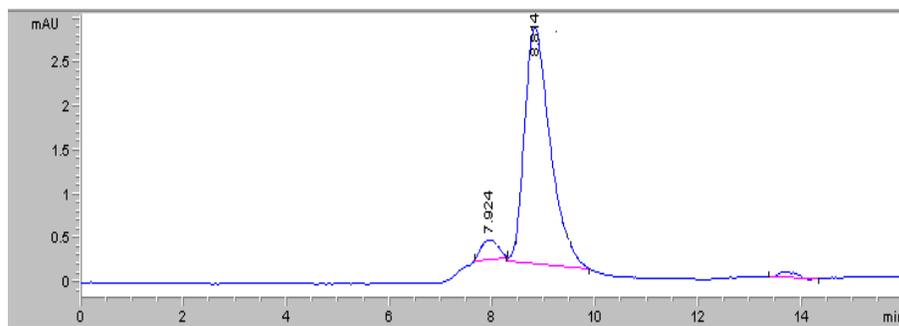


Figura 17.- Cromatograma del Patrón de 300mg/L de Albúmina.

VI.1.1.a- Elaboración de la curva de calibración.

Una vez obtenidas las condiciones de determinación de la concentración de albumina por HPLC, se procedió a elaborar la curva de calibración. Los patrones se realizaron a partir de diluciones sucesivas de un patrón de 300mg/L, disolviendo 0,0310g del Estándar de Albúmina en agua desionizada y enrasando a un volumen de 100mL.

Tabla 7.- Señal obtenida para los patrones.

Patrón (mg/L)	Area (mAU/min)	Area (mAU/min)
21,1 ± 0,1	7,9	8,3
151 ± 1	45,5	46,2
210 ± 2	64,0	62,8
302 ± 2	92,4	94,4

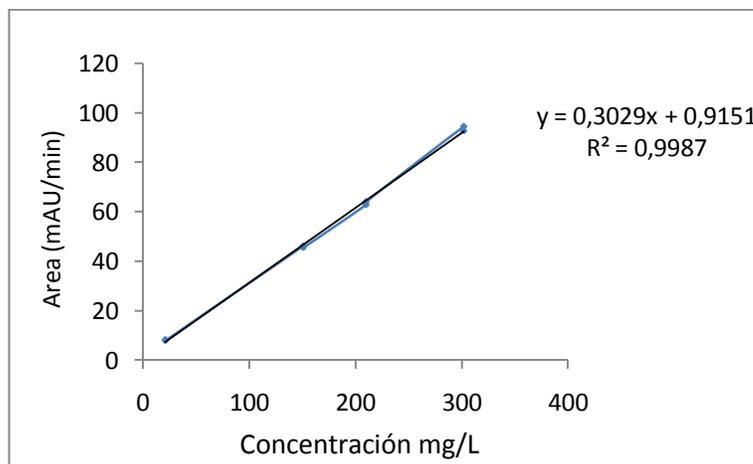


Figura 18.- Curva de Calibración.

El rango de patrones seleccionado fue de 20 mg/L hasta 300mg/L, porque en este rango fue donde se observó mayor linealidad entre la concentración y la señal.

VI.1.2.- Optimización de las condiciones para la separación de la albúmina.

VI.1.2.a.- Procedimiento de separación 1.

Se procedió a inyectar una muestra de orina en el cromatógrafo de líquidos. Esta muestra se inyectó con un factor de dilución de 5. Como se observa en la figura 19, no se apreció ningún pico en el tiempo de retención en el que eluye la albúmina.

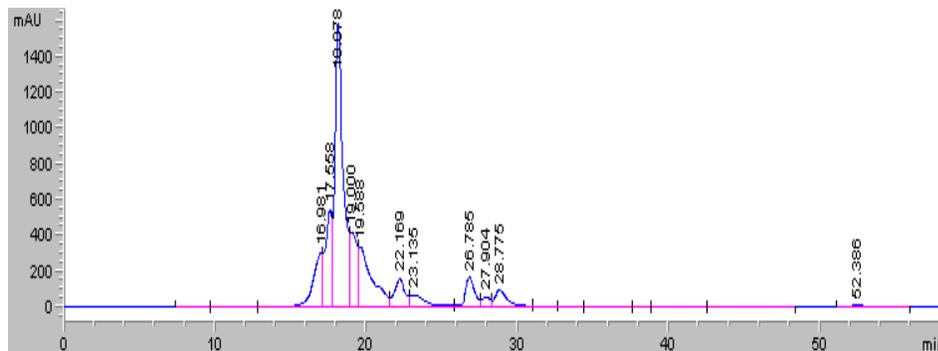


Figura 19.- Cromatograma de la orina con un factor de dilución de 5.

La orina es una matriz compleja. El volumen, la concentración y composición varían ampliamente de un individuo a otro. Al inyectar la orina con un factor de dilución de 5, aún cuando no se visualizó ningún pico en el tiempo de retención en el que eluye la albúmina, si se observaron picos de intensidad muy elevada. La magnitud de estas señales impidió la apreciación de las señales de los compuestos presentes en menor concentración. Por esta razón, se decidió separar la albúmina previamente de la muestra antes de inyectarla al cromatógrafo, seleccionándose el procedimiento

reportado por Ratge y colaboradores ⁽³¹⁾, que es un método de extracción en fase sólida con un cartucho de Azul de Sefarosa.

Se siguieron las instrucciones indicadas en el manual de uso del cartucho ⁽⁴⁰⁾. Primero se probó con un volumen de inyección de 1.0 mL de un patrón de Albúmina de 300mg/L al mínimo flujo de inyección que permitía la bomba peristáltica de 0,01mL/min. Se pasó a un flujo tan bajo para dar mayor tiempo a que se estableciera el equilibrio entre la albúmina y el adsorbente. Como se observa en la figura 20, en cada uno de los extractos de los eluentes empleados (Buffer A, Buffer B y Buffer C; la composición de cada buffer se encuentra en la tabla 5, página 41), se observó la señal correspondiente a la albúmina. Cada separación con los eluentes se realizó por duplicado. Los resultados se presentan en la Tabla 8.

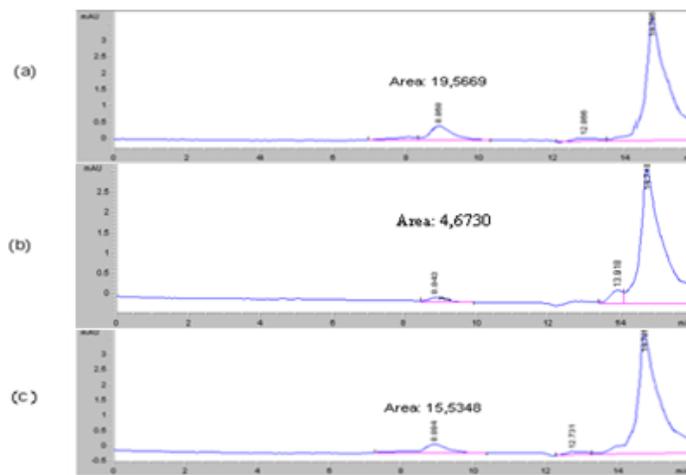


Figura 20.- Cromatograma de los extractos (a) Buffer A; (b) Buffer B; (c) Buffer C, al tratar con el cartucho 1,0 mL del patrón de 300 mg/L.

Tabla 8.- Concentración de Albúmina en los diferentes extractos.

Extracto	Inyección	t _R (min)	Área (mAU/min)	Concentración Promedio (mg/L)
Buffer A	1	8,9	19,6	59 ± 3
	2	9,0	18,3	
Buffer B	1	8,9	5,4	14 ± 3
	2	8,9	4,7	
Buffer C	1	8,9	15,5	43 ± 3
	2	9,0	12,5	

Se utilizó un volumen menor de tratamiento, 0,5 mL del patrón de 300mg/L, para descartar que la presencia de la albúmina en los tres extractos fuera por sobrecarga del cartucho. Como se aprecia en la figura 21, siguió observándose en todos los extractos la presencia de la albúmina.

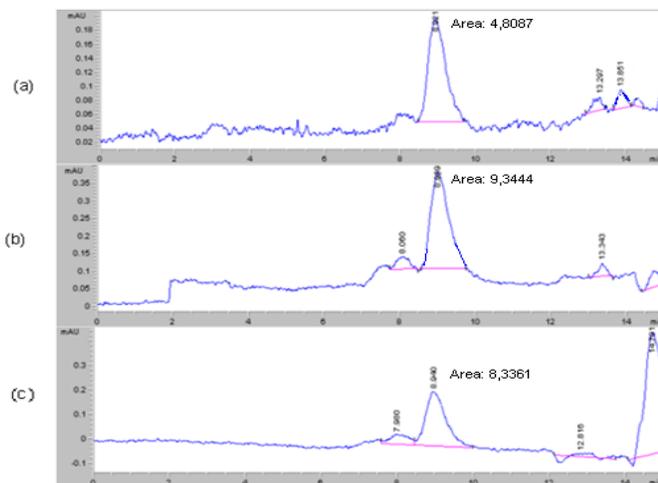


Figura 21.- Cromatograma de los extractos (a) Buffer A; (b) Buffer B; (c) Buffer C, al tratar con el cartucho 0,5 mL del patrón de 300 mg/L.

Tabla 9.- Concentración de Albúmina en los diferentes extractos.

Extracto	Inyección	t _R (min)	Área (mAU/min)	Concentración Promedio (mg/L)
Buffer A	1	8,8	4,7	13 ± 3
	2	8,9	4,8	
Buffer B	1	9,0	9,3	26 ± 3
	2	8,9	8,4	
Buffer C	1	8,9	8,3	23 ± 3
	2	8,8	7,6	

Como se aprecia en las tablas 8 y 9 con los tres eluentes empleados se eluía la albúmina, no lográndose la separación selectiva de la misma.

Para evaluar si se mantenía la tendencia y comprobar si el tratamiento con el cartucho de Azul de Sefarosa era reproducible, se probó con un patrón de menor concentración de 150 mg/L. El procedimiento de separación en el cartucho se realizó por duplicado. Los resultados se presentan en la figura 22 y la tabla 10. Como podemos observar en el primer tratamiento con los tres eluentes empleados se eluía parte de la albúmina, mientras que en el segundo, sólo se visualizó el pico de la albúmina en el buffer B y buffer C. No se encontraron resultados reproducibles.

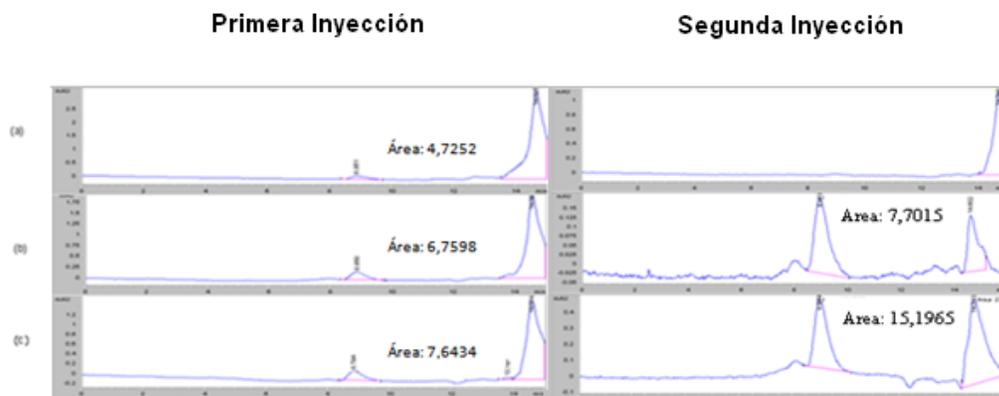


Figura 22.- Cromatogramas de los extractos (a) Buffer A; (b) Buffer B; (c) Buffer C, al inyectar en el cartucho 0,5 mL del patrón de 150mg/L.

Tabla 10.- Concentración de Albúmina en los diferentes extractos.

Extracto	t_R (min)	Área (mAU/min) Primera Inyección	Concentración (mg/L)	t_R (min)	Área (mAU/min) Segunda Inyección	Concentración (mg/L)
Buffer A	8,8	4,7	1 ± 5	No se observó Señal		
Buffer B	8,8	6,8	8 ± 5	8,9	7,7	12 ± 5
Buffer C	8,8	7,6	12 ± 5	9,0	15,2	38 ± 6

Visto el resultado, al no lograrse resultados satisfactorios de la separación y preconcentración de la albúmina con el cartucho de Azul de Sefarosa se decidió ensayar otro procedimiento, para separar la Albúmina del resto de la matriz de la orina. El procedimiento seleccionado fue el de Pesce y col⁽³⁵⁾.

VI.1.2.b.- Procedimiento de separación 2.

En el procedimiento descrito por Pesce y col, las proteínas se precipitan en medio ácido, empleando el ácido tricloroacético. Para la disolución del precipitado, primero se probó con una solución de hidróxido de sodio (8g/L) como se reporta en la bibliografía⁽³⁵⁾. Los resultados se presentan en la figura 23 y en la tabla 11. Se apreció en el caso de un patrón, que la intensidad del pico de la albúmina disminuía al transcurrir el tiempo. Disminuyó más de la mitad de una inyección a otra. Esta situación no se menciona en la bibliografía, es posible que se deba a que en el caso de la determinación de proteínas totales se forma un complejo con el colorante Ponceau S que estabiliza las proteínas y evita su degradación en el tiempo. En este caso no fue necesario el empleo de un colorante, debido a que la señal de la albúmina se apreciaba sin necesidad de acomplejarla.

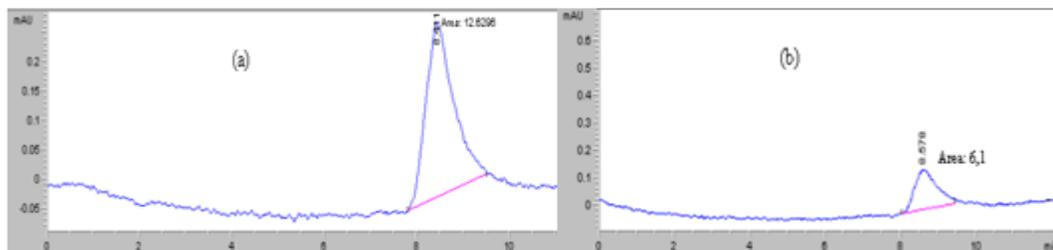


Figura 23.- Patrón 100 mg/L, precipitado disuelto con NaOH. (a) Primera inyección; (b) segunda inyección.

Tabla 11.- Área obtenida para las dos inyecciones.

Inyección	Área (mAU/min)
a	12,6
b	6,1

Por la variación en la señal, se procedió a disminuir el pH de la solución empleada para disolver el precipitado, utilizándose el mismo buffer destinado como fase móvil (Buffer de Fosfato 0,01M) pero con un pH de 7,99. No se observó disminución en la señal obtenida en función del tiempo tal como se muestra en la figura 24.

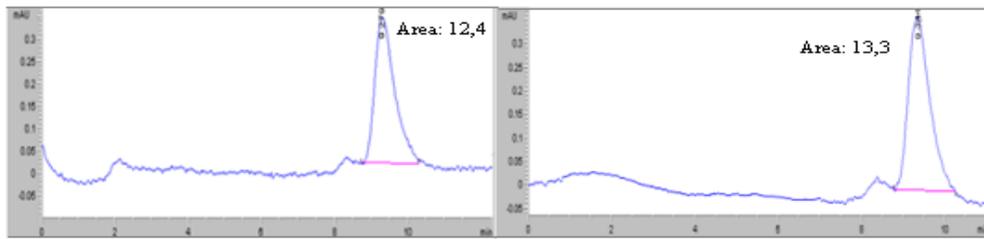


Figura 24.- Cromatograma del Patrón de 100 mg/L, precipitado disuelto con buffer de fosfato pH 7,99.

Se comparó la señal obtenida para el mismo patrón sin precipitar la albúmina. Se observó que la precipitación con el ácido ocasionaba la disminución de la intensidad de la señal, como se aprecia en la figura 25 y en la tabla 12.

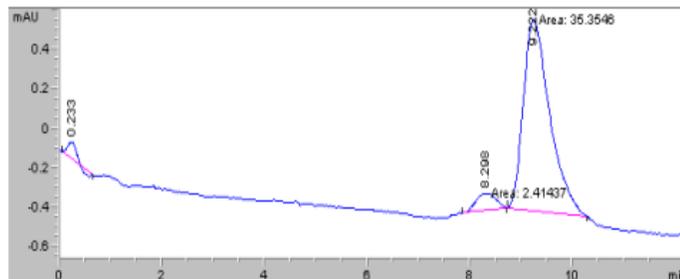


Figura 25.- Cromatograma del Patrón de 100 mg/L sin precipitar la albúmina con el ácido tricloroacético.

Tabla 12.- Señal de la albúmina para las diferentes condiciones ensayadas.

Patrón	Área (mAU/min)
Sin precipitar las proteínas	35,4
Las proteínas precipitadas con el ácido	12,4

A concentraciones por debajo de 20mg/L las proteínas no precipitan con el ácido tricloroacético, ésta concentración de proteína que no precipita, queda en solución, conduciendo a pérdidas, por lo que la concentración medida no es la cantidad real.

La disminución de la señal del pico de la Albúmina también se observó con el patrón de 300mg/L, como se muestra en la figura 26.

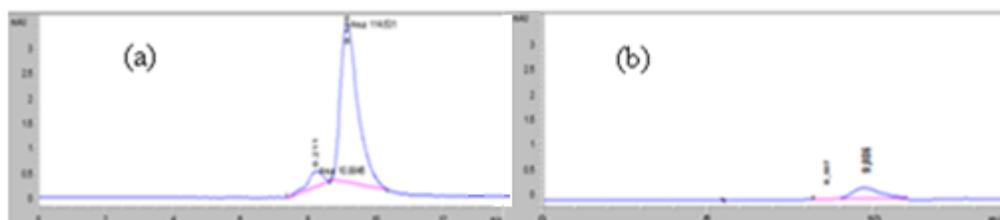


Figura 26.- Variación de la intensidad del pico de la albúmina del patrón de 300 mg/L: (a) antes de precipitar la albúmina con el ácido; (b) después de precipitar la albúmina con el ácido.

Tabla 13.- Señal de la Albúmina del patrón de 300mg/L.

Patrón	Area (mAU/min)
Sin precipitar la proteína con el ácido	114,5
La proteína precipitada con el ácido	43,1

Se modificó el pH de la fase móvil para evaluar la influencia de un pH ácido en la intensidad de la señal. El pH de la Fase Móvil empleada para el análisis fue $7,41 \pm 0,01$, esta solución se acidificó con Acido fosfórico y se llevó a un pH de $6,80 \pm 0,01$. El tiempo de retención y el área de la señal de la albúmina no se vieron afectados por el cambio de pH de la fase móvil, como se aprecia en la figura 27. Este resultado muestra que la disminución de la intensidad de la señal no se debe al pH de las soluciones, probablemente se debe a la precipitación con el ácido tricloroacético, por lo tanto el método no es cuantitativo.

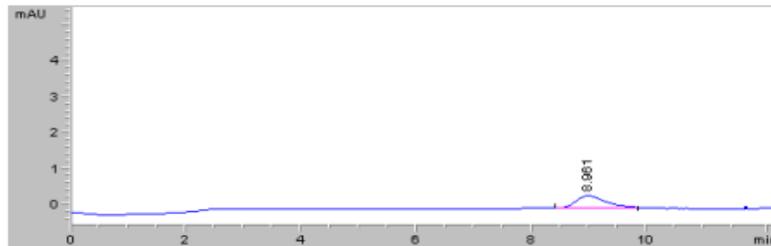


Figura 27.- Patrón de 100mg/L al precipitar la proteína con el ácido, empleando como fase móvil un Buffer de Fosfato 0,01M de pH 6,8. (t_R : 8,6 min; Área: 15,6 mAU)

Las condiciones óptimas para el análisis de la albúmina no se lograron, debido a esto, se procedió a emplear otra técnica, que permitía cumplir con los objetivos planteados. La técnica que se utilizó fue Espectroscopía de Absorción Molecular. Se determinó proteínas totales debido a que estas también se emplean como un marcador eficaz para evaluar el comienzo de una lesión a nivel renal.

VI.2.- Determinación de las Proteínas Totales.

La determinación de las proteínas totales es un proceso que consta de dos partes: 1) La separación de las proteínas de la matriz de la orina; y, 2) la identificación y cuantificación de las mismas. Para la separación de las proteínas se empleó el método

descrito por Pesce y colaboradores ⁽³⁵⁾, utilizando el ácido tricloroacético como agente precipitante y acomplejando la proteína con el colorante Ponceau S, que luego al disolverse el precipitado de color rojo en una solución básica, la solución se torna color violeta y puede medirse fotométricamente.

VI.2.1.- Optimización de las condiciones de análisis.

VI.2.1.a.- Selección de la longitud de onda.

Para escoger la longitud de onda de trabajo se realizó un barrido espectral de 500 a 600nm empleando un patrón de 251 ± 1 mg/L de albúmina.

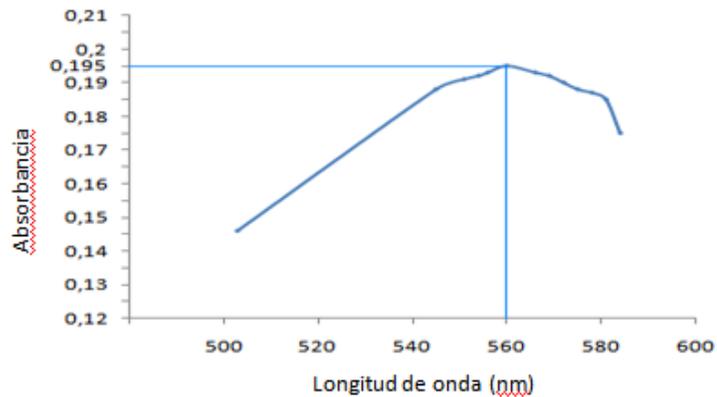


Figura 28.- Barrido espectral para ubicar la longitud de onda de trabajo.

Como se observa en la figura 28, la longitud de onda donde se observó el pico de absorción fue a 560 nm. Esta fue la longitud de onda empleada para el análisis.

VI.2.1.b – Elaboración de la curva de calibración.

El procedimiento descrito en el apartado V.4.2.b se le aplicó a los patrones.

La precipitación por parte del ácido tricloroacético está limitada a la concentración de proteínas. Soluciones con concentración de proteínas por debajo de 20 mg/L, no precipitan. Esta es la razón de porque el menor patrón empleado para la construcción de la curva de calibración fue el de 20mg/L.

También se apreció que a concentraciones por encima de 1500mg/L se perdía la linealidad de la curva, debido a que no se observaba variabilidad de la señal, como se indica en la siguiente tabla.

Tabla 14.- Señal obtenida para diferentes concentraciones de patrón.

Concentración Patrón (mg/L)	Absorbancia
20	0,095
150	0,161
250	0,21
500	0,363
1000	0,544
1500	0,740
2000	0,729
3000	0,806
4000	0,810

La mejor linealidad de la curva se obtenía empleando un rango de concentración de patrones de 20 mg/L hasta 1000mg/L.

Los patrones para realizar la curva de calibración se prepararon a partir de diluciones sucesivas de una solución de concentración 10.039 ± 8 mg/L, disolviendo $1,0296 \pm 0,0002$ g del estándar de Albúmina en una solución salina de NaCl (9 g/L).

Tabla 15. - Concentraciones de los patrones empleados para la curva de calibración.

	Concentración (mg/L)
Patrón 1	$20,1 \pm 0,1$
Patrón 2	151 ± 1
Patrón 3	251 ± 1
Patrón 4	502 ± 2
Patrón 5	1004 ± 2

Tabla 16.- Concentración de los patrones y señal obtenida.

Patrón (mg/L)	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia
$20,1 \pm 0,1$	0,098	0,103	0,099
151 ± 1	0,153	0,155	0,156
251 ± 1	0,206	0,205	0,207
502 ± 2	0,321	0,323	0,326
1004 ± 2	0,556	0,554	0,559

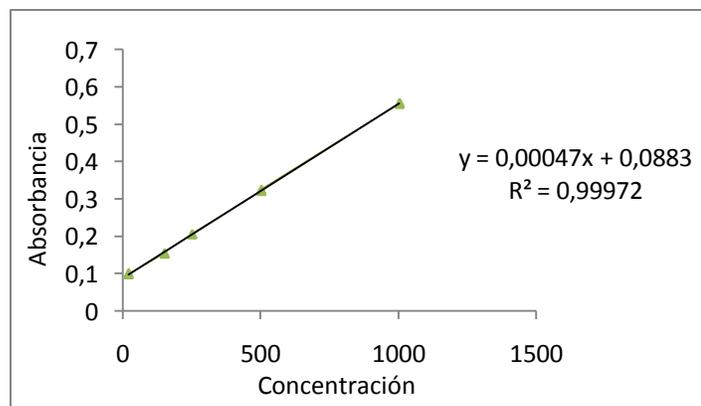


Figura 29.- Curva de calibración.

VI.2.1.c- Determinación de las figuras de mérito del método.

La precisión del método se evaluó realizando cinco medidas de una orina y el valor de la desviación estándar relativa (%RSD).

Tabla 17.- Resultados para la determinación de la precisión del método.

Réplica	Absorbancia	Concentración Proteínas (mg/L)	Concentración Proteínas (mg/día)
1	0,221	285 ± 4	57 ± 1
2	0,224	291 ± 4	58 ± 1
3	0,227	297 ± 5	60 ± 1
4	0,228	300 ± 5	60 ± 1
5	0,225	293 ± 4	59 ± 1
Promedio	0,225 ± 0,003	293 ± 6	59 ± 1
	% RSD	2,05	1,7

El %RSD tanto para la concentración de proteínas/litro, como para la concentración de proteínas/día obtenido, es menor al reportado en la bibliografía que es 8%, para el análisis de proteínas en la orina. Este resultado muestra que el método es reproducible. ⁽⁴²⁾

El límite de detección y el límite de cuantificación se calculó a partir de la curva de calibración empleada para la cuantificación de las proteínas, mostrada previamente.

Tabla 18.- Ecuación de la curva para la determinación del límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ).

Patrones (mg/L)	Ecuación de la recta	Error típico Sy/x
20 – 1004	$0,00047x + 0,0883$	0,002923

Tabla 19.- Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ).

Límite de detección (LOD) (mg/L)	Límite de cuantificación (LOQ) (mg/L)
19	63

Comparando el límite de detección obtenido con el reportado en el trabajo de Pesce y col⁽³⁵⁾, LOD: 2mg/dL (20mg/L), se observa que están en el mismo orden.

VI.2.1.d- Validación del método.

Para validar el método, se enriquecieron dos muestras de orina de concentración conocida con una cantidad igual del patrón de 251 ± 1 mg/L.

Tabla 20.- Señal obtenida para las dos muestras empleadas para calcular el porcentaje de recuperación.

Muestra	Absorbancia	Absorbancia
U-85	0,235	0,225
U-202	0,331	0,336

Tabla 21.- Porcentaje de recuperación.

Muestra	Concentración Promedio (mg/L)	Concentración Muestra (mg/L)	Concentración Patrón (mg/L)	% Recuperación
U-85	304 ± 15	54 ± 4	251 ± 1	99 ± 6
U-202	526 ± 8	296 ± 8	251 ± 1	92 ± 3

Los valores obtenidos para el porcentaje de recuperación se consideran aceptables porque entran en el rango establecido en la literatura de porcentaje de recuperación para muestras biológicas: 70 – 120 %.⁽⁴³⁾

VI.2.2.- Determinación de las proteínas en las muestras de orina.

Se analizaron un total de 97 muestras de niños en edad escolar que residen en El Callao. A estos niños se les determinó previamente los niveles de mercurio y de creatinina ^{(29),(30)}, con el fin de correlacionarlos con los niveles de proteínas determinados en el presente trabajo. Los niños fueron agrupados de acuerdo a las instituciones donde estudian.

Tabla 22.- Valores de proteínas totales, Hg y Hg/creatinina en las muestras de orina de los niños de la institución Barrio Obrero.

Muestra	$\mu\text{g/L Hg}$	mg/L Creat	$\mu\text{g Hg /g C}$	mg/día Proteínas
35	$1,0 \pm 0,2$	2621 ± 5	$0,4 \pm 0,2$	< 19
36	69 ± 1	756 ± 3	91 ± 1	< 19
37	< 0,2	563 ± 2	$0,4 \pm 0,1$	< 19
38	10 ± 1	960 ± 3	$10,4 \pm 0,3$	35 ± 3
39	7 ± 1	976 ± 1	$7,4 \pm 0,1$	< 19

Tabla 23. - Valores de proteínas totales, Hg y Hg/creatinina en las muestras de orina de los niños de la institución Caratal.

Muestra	$\mu\text{g/L Hg}$	mg/L Creat	$\mu\text{g Hg /g C}$	mg /día Proteínas
43	161 ± 1	1540 ± 7	$104,7 \pm 0,1$	< 19
51	111 ± 7	823 ± 18	$134,8 \pm 0,4$	< 19

Tabla 24.- Valores de proteínas totales, Hg y creatinina en las muestras de orina de los niños de la institución Creación Nuevo México.

Muestra	$\mu\text{g/L Hg}$	mg/L Creat	$\mu\text{g Hg /g C}$	mg /día Proteínas
59	$3,7 \pm 0,3$	$1359 \pm 0,1$	$2,69 \pm 0,02$	< 19
60	$0,9 \pm 0,1$	595 ± 1	$1,5 \pm 0,1$	< 19
61	39 ± 1	1056 ± 1	37 ± 1	< 19
72	$1,049 \pm 0,005$	1067 ± 2	$0,983 \pm 0,003$	< 19

Tabla 25.- Valores de proteínas totales, Hg y creatinina en las muestras de orina de los niños de la institución El Chocó.

Muestra	$\mu\text{g/L Hg}$	mg/L Creat	$\mu\text{g Hg /g C}$	mg /día Proteínas
62	36 ± 3	963 ± 1	37 ± 6	< 19
63	$1,56 \pm 0,03$	1002 ± 1	$1,6 \pm 0,1$	< 19
64	$2,0 \pm 0,2$	402 ± 1	$4,9 \pm 0,1$	< 19
65	$1,21 \pm 0,04$	1271 ± 1	$1,0 \pm 0,1$	< 19

Tabla 26.- Valores de proteínas totales, Hg y creatinina en las muestras de orina de los niños de la institución El Perú.

Muestra	$\mu\text{g/L Hg}$	mg/L Creat	$\mu\text{g Hg /g C}$	mg /día Proteínas
73	$1,7 \pm 0,1$	6378 ± 1	$2,7 \pm 0,1$	< 19
74	$18,5 \pm 0,3$	$779,0 \pm 0,2$	24 ± 1	< 19
75	$0,2 \pm 0,1$	2047 ± 1	$0,10 \pm 0,01$	< 19
76	$0,7 \pm 0,1$	2404 ± 5	$0,31 \pm 0,03$	< 19
77	55 ± 4	403 ± 1	137 ± 8	< 19
78	$35,1 \pm 0,1$	1104 ± 1	$31,8 \pm 0,1$	< 19
79	$1,3 \pm 0,1$	$404,4 \pm 0,4$	$3,2 \pm 0,2$	< 19

Tabla 27.- Valores de proteínas totales, Hg y creatinina en las muestras de orina de los niños de la institución José Agosto Méndez.

Muestra	$\mu\text{g/L Hg}$	mg/L Creat	$\mu\text{g Hg /g C}$	mg /día Proteínas
80	6 ± 1	1507 ± 1	4 ± 1	< 19
81	73 ± 3	158 ± 2	46 ± 3	< 19
82	49 ± 3	542 ± 3	91 ± 3	< 19
83	25 ± 3	1635 ± 1	$15,2 \pm 0,1$	6 ± 1
84	1 ± 1	825 ± 1	$1,4 \pm 0,6$	< 19
85	22 ± 1	765 ± 1	$28,31 \pm 0,03$	65 ± 5
86	$1,74 \pm 0,05$	893 ± 1	$1,95 \pm 0,03$	< 19

Tabla 28.- Valores de proteínas totales, Hg y creatinina en las muestras de orina de los niños de la institución José Solano.

Muestra	$\mu\text{g/L Hg}$	mg/L Creat	$\mu\text{g Hg /g C}$	mg /día Proteínas
90	$5,1 \pm 0,5$	1330 ± 27	$5,03 \pm 0,02$	< 19
100	$3,4 \pm 0,4$	881 ± 13	$3,92 \pm 0,03$	< 19
101	$2,2 \pm 0,1$	689 ± 1	$3,2 \pm 0,1$	< 19
102	17 ± 2	$1568,2 \pm 0,4$	15 ± 4	< 19

Tabla 29.- Valores de proteínas totales, Hg y creatinina en las muestras de orina de los niños de la institución La Ramona.

Muestra	$\mu\text{g/L Hg}$	mg/L Creat	$\mu\text{g Hg /g C}$	mg /día Proteínas
115	93 ± 1	$581,9 \pm 0,5$	159 ± 3	< 19

Tabla 30.- Valores de proteínas totales, Hg y creatinina en las muestras de orina de los niños de la institución Nacupay.

Muestra	$\mu\text{g/L Hg}$	mg/L Creat	$\mu\text{g Hg /g C}$	mg /día Proteínas
120	13 ± 2	858 ± 1	15 ± 2	25 ± 4
121	12 ± 1	$1059,1 \pm 0,5$	11 ± 1	< 19
123	$0,12 \pm 0,02$	$1221,4 \pm 0,5$	$0,10 \pm 0,04$	< 19

Tabla 31.- Valores de proteínas totales, Hg y creatinina en las muestras de orina de los niños de la institución Nicolás Farrera.

Muestra	$\mu\text{g/L Hg}$	mg/L Creat	$\mu\text{g Hg /g C}$	mg /día Proteínas
159	$5,7 \pm 0,1$	472 ± 2	$11,98 \pm 0,02$	< 19
160	21 ± 1	1376 ± 1	$15,0 \pm 0,1$	< 19

Tabla 32.- Valores de proteínas totales, Hg y creatinina en las muestras de orina de los niños de la institución Nuevo México.

Muestra	$\mu\text{g/L Hg}$	mg/L Creat	$\mu\text{g Hg /g C}$	mg /día Proteínas
176	$2,6 \pm 0,5$	$145,8 \pm 0,5$	$1,7 \pm 0,3$	< 19
177	$14,40 \pm 0,03$	1342 ± 3	$10,73 \pm 0,01$	< 19
178	$0,75 \pm 0,05$	$779,01 \pm 0,05$	$0,96 \pm 0,02$	< 19
179	12 ± 2	846 ± 1	14 ± 3	< 19
180	116 ± 3	486 ± 1	239 ± 5	< 19
181	5 ± 1	1392 ± 1	13 ± 1	< 19
182	11 ± 2	995 ± 2	11 ± 1	< 19

Tabla 33.- Valores de proteínas totales, Hg y creatinina en las muestras de orina de los niños de la institución San Pedro y San Pablo.

Muestra	$\mu\text{g/L Hg}$	mg/L Creat	$\mu\text{g Hg /g C}$	mg /día Proteínas
183	<0,2	$703,3 \pm 0,5$	$0,3 \pm 0,1$	< 19
184	12 ± 2	2863 ± 7	$4,1 \pm 0,3$	< 19
185	<0,2	$581,2 \pm 0,5$	$0,34 \pm 0,1$	< 19
186	32 ± 6	998 ± 1	32 ± 9	< 19
187	$5,9 \pm 0,3$	$1275,6 \pm 0,5$	5 ± 1	< 19
188	166 ± 8	2621 ± 1	63 ± 10	< 19
189	$0,7 \pm 0,2$	622 ± 1	$1,21 \pm 0,02$	< 19
190	<0,2	$717,5 \pm 0,5$	$0,28 \pm 0,05$	< 19
191	<0,2	$648,6 \pm 0,1$	$0,31 \pm 0,02$	< 19
192	$2,0 \pm 0,3$	966 ± 1	$2,1 \pm 0,3$	< 19

193	23 ± 2	$810,8 \pm 0,5$	28 ± 4	< 19
194	<0,2	738 ± 1	$0,27 \pm 0,03$	< 19
195	$2,4 \pm 0,3$	$501,8 \pm 0,5$	$1,5 \pm 0,2$	< 19
196	$5,4 \pm 0,2$	1095 ± 4	$4,91 \pm 0,05$	< 19
197	$6,6 \pm 0,1$	$931,8 \pm 0,1$	7 ± 1	< 19
198	$0,6 \pm 0,2$	$1202,0 \pm 0,2$	$0,53 \pm 0,01$	< 19
199	6 ± 1	$710,6 \pm 0,5$	9 ± 3	< 19
200	$4,9 \pm 0,2$	$339,5 \pm 1,4$	$14,4 \pm 0,2$	< 19
201	$0,5 \pm 0,1$	773 ± 1	$0,6 \pm 0,1$	< 19
202	<0,2	692 ± 1	$0,29 \pm 0,05$	59 ± 2
203	<0,2	$1087,9 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$	< 19
204	$0,6 \pm 0,1$	$1279,0 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	< 19
205	$11,71 \pm 0,02$	$699,9 \pm 0,1$	$0,29 \pm 0,01$	< 19
206	$0,840 \pm 0,05$	564 ± 2	$1,48 \pm 0,05$	< 19
207	$60,275 \pm 0,003$	1221 ± 1	$49,35 \pm 0,03$	< 19
208	$4,3 \pm 0,2$	1923 ± 1	$2,3 \pm 0,3$	< 19
209	<0,2	$482,3 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,2$	< 19
210	$5,2 \pm 0,3$	520 ± 2	$9,6 \pm 0,2$	< 19
211	<0,2	1609 ± 3	$0,12 \pm 0,02$	< 19
212	<0,2	1317 ± 3	$0,1 \pm 0,01$	< 19
213	5 ± 1	1411 ± 1	3 ± 1	< 19
214	$9,8 \pm 0,3$	1704 ± 5	$5,8 \pm 0,1$	< 19
215	<0,2	488 ± 1	$0,41 \pm 0,05$	< 19
216	192 ± 33	1556 ± 44	124 ± 1	< 19
217	$0,8 \pm 0,1$	848 ± 1	$1,0 \pm 0,1$	< 19
218	<0,2	1343 ± 2	$0,15 \pm 0,03$	< 19
219	$9,7 \pm 0,1$	1446 ± 1	$6,7 \pm 0,1$	< 19

220	3,8 ± 0,5	1191 ± 2	3,2 ± 0,3	< 19
221	3,4 ± 0,3	393,0 ± 0,4	9 ± 1	< 19
222	5,4 ± 0,5	613,2 ± 0,5	9 ± 1	< 19
224	<0,2	1623 ± 2	0,3 ± 0,1	< 19
225	8 ± 1	937 ± 3	8,1 ± 0,1	< 19
226	5,4 ± 0,1	2180 ± 1	2,5 ± 0,1	< 19
227	<0,2	498 ± 1	0,4 ± 0,2	< 19
228	<0,2	1623 ± 2	0,3 ± 0,1	< 19
229	12,88 ± 0,04	1337 ± 1	9,63 ± 0,04	< 19
231	<0,2	882,6 ± 0,9	0,2 ± 0,1	< 19
233	2,4 ± 0,2	2761 ± 3	0,9 ± 0,2	< 19
234	1,97 ± 0,01	359,786 ± 0,001	5,5 ± 0,5	< 19
235	<0,2	501,9 ± 0,5	0,4 ± 0,1	< 19
236	<0,2	896 ± 1	0,22 ± 0,05	< 19

Como se indica en las tablas, solo 5 niños mostraron niveles medibles de proteínas. El resto de los niños presentaron niveles por debajo del límite de detección.

Tabla 34.- Niños que presentaron proteínas.

Muestra	µg/L Hg	µg Hg /g Creatinina	mg /día Proteínas	mg Proteínas/g Creatinina	CV %
38	10 ± 1	10,4 ± 0,3	35 ± 3	61 ± 5	7,60
83	25 ± 3	15,2 ± 0,1	6 ± 1	18 ± 2	10,88
85	22 ± 1	28,31 ± 0,03	65 ± 5	71 ± 6	8,20
120	13 ± 2	15 ± 2	25 ± 4	33 ± 5	15,97
202	<0,2	0,29 ± 0,05	59 ± 2	428 ± 12	2,74

Dado que la recolección de la orina de 24 horas en el niño no siempre es posible y está sujeta a numerosos errores, se puede utilizar un método alternativo, medir el cociente albúmina/creatinina o proteínas/creatinina en una muestra puntual de orina. Estos cocientes tienen la ventaja de que corrigen las alteraciones en la concentración urinaria derivadas de los cambios de hidratación. Los resultados se reportaron en base a la excreción de proteínas por 24 horas y también en relación a los niveles de creatinina para compararlos. Se considera normal la excreción de proteínas cuando no excede de 150mg/día y de 300mg/g de creatinina^{(44),(45)}.

Del análisis, solo uno de los niños superó el valor límite de mg proteínas/g creatinina. Este niño fue el que presentó la mayor concentración de proteínas en una orina puntual, debido a que el volumen recolectado de orina de 24 horas fue muy bajo (200mL), la concentración de proteína por día disminuyó notablemente. Posiblemente este valor alto se deba a una afección del riñón.

Los 5 niños que presentaron proteínas constituyen el 5% de la población muestreada como se puede observar en la siguiente figura.

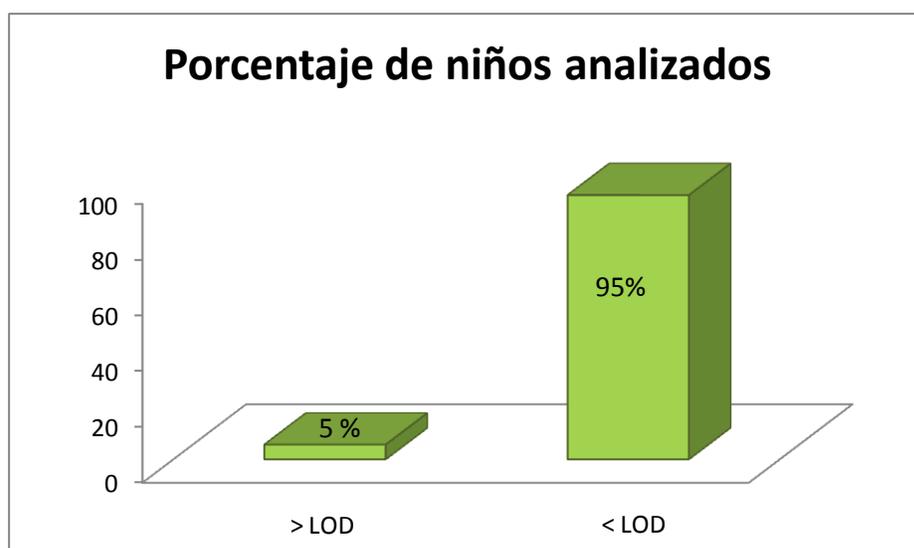


Figura 30.- Porcentaje de niños que presentaron niveles medibles de proteínas y de los que no presentaron.

A modo de comparación, se analizó un pequeño Grupo Control, conformado por 5 niños en edades comprendidas de 6 a 13 años, que residen en Caracas. Los resultados obtenidos para este grupo se muestran en la Tabla 35.

Tabla 35.- Resultados obtenidos Grupo Control.

Muestra	Edad	mg/día Proteínas
C ₁	11	< 19
C ₂	9	< 19
C ₃	6	< 19
C ₄	13	< 19
C ₅	12	< 19

No se observaron proteínas en las muestras de orina de ninguno de los niños del Grupo Control.

El riñón es uno de los órganos más susceptibles a la intoxicación por mercurio. En condiciones normales un infante no debería presentar proteínas en la orina, pero la exposición crónica a este metal puede inducir una lesión a nivel renal, daño que se evidencia con la excreción de proteínas en la orina.

El 5% de los niños de El Callao que presentaron proteínas en la orina, están por debajo del límite de referencia normal (< 150mg/día). Sin embargo, la presencia de niveles relativamente bajos de proteínas en orina es un marcador de riesgo precoz de progresión o aparición de insuficiencia renal.

A parte del ácido tricloroacético como agente precipitante, existen otros que pueden emplearse para tal fin. Sin embargo, estos presentan el inconveniente de producir distintos enturbiamientos con cantidades idénticas de albúmina y de globulinas, lo que hace que los resultados que se obtengan dependan del cociente A/G (Albúmina/globulinas). En cambio, el ácido tricloroacético tiene la ventaja que los enturbiamientos producidos por la albúmina y las globulinas son similares, es decir, no se ve afectado por la relación A/G ⁽³⁸⁾.

VI.2.3.- Análisis del sedimento.

Debido a que algunas muestras de orina presentaron sedimento, se analizaron 5 de estas muestras para descartar la presencia de proteínas en el mismo.

Tabla 36.- Resultados obtenidos para el sedimento.

Muestra	mg/día Proteínas
U-206	<19
U-208	<19
U-228	<19
U-83	<19
U-159	<19

Ninguno de los sedimentos analizados presentó niveles medibles de proteínas. Esto concuerda con la información registrada en la bibliografía de que el sedimento está constituido principalmente por sales (uratos, fosfatos y carbonatos) y algunas células epiteliales de la vesícula y de la uretra ⁽⁴⁶⁾. El sedimento se disolvió en un buffer de fosfato de pH 7,4 con el fin de asemejar el pH de la orina para trabajar bajo las mismas condiciones.

VI.2.4.- Correlación de la concentración de mercurio con la concentración de proteínas totales.

En la figura 31 se graficaron los niveles de mercurio/g creatinina con los niveles de proteínas/g creatinina. No se apreció una distribución normal para los valores. A mayor concentración de mercurio no se observó mayor concentración de proteínas.

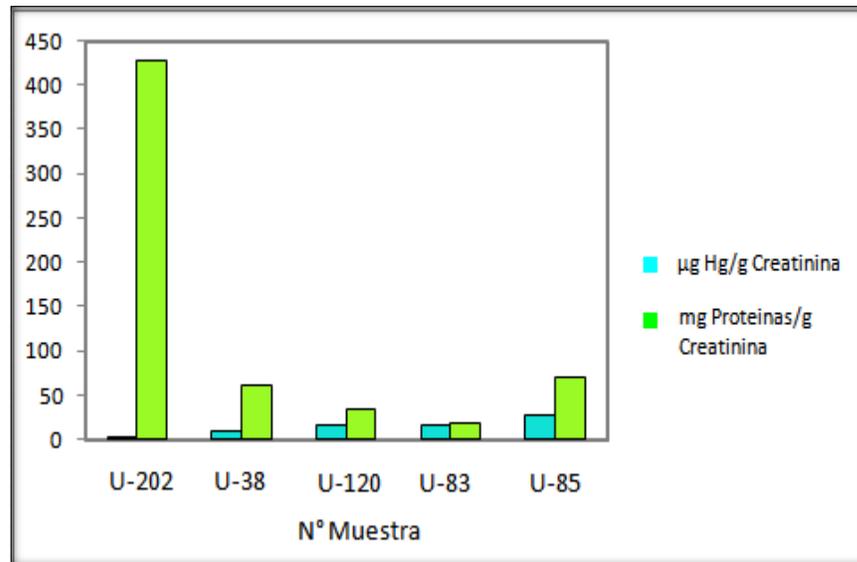


Figura 31.- Relación entre los niveles de mercurio/creatinina y los niveles de proteínas/g Creatinina.

También se graficó la dispersión de la concentración de mercurio/g Creatinina y la concentración de proteínas/g Creatinina. Se observó que no existe relación lineal entre los valores como se muestra en la figura 32. Esto concuerda con el trabajo realizado por Abdennour y col ⁽³⁶⁾, encontraron que la concentración de proteínas en la orina fue relativamente independiente a la concentración de mercurio en la misma.

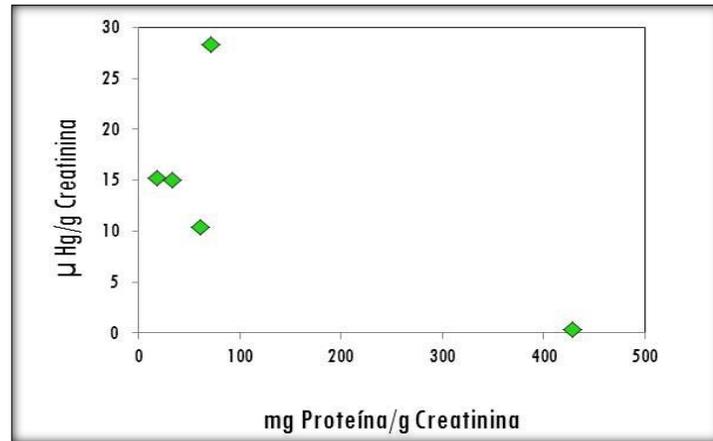


Figura 32.- Dispersión de los valores de la concentración de Proteínas/g Creatinina y la concentración de mercurio/g creatinina.

C. Tineo⁽²⁹⁾ y M. Matos⁽³⁰⁾, determinaron que los niños que presentaron mayor concentración de mercurio fueron aquellos que viven cerca de un molino. Basados en esto, se compararon los niveles de proteínas obtenidos con el lugar de habitación de los niños. Se encontró que los niños que presentaron mayor nivel de proteínas fueron los que viven a una cuadra de un molino, observándose una distribución normal para los valores. En las encuestas realizadas a estos niños, se encontró que el niño que presentó mayor concentración de proteína no solo vive cerca de un molino, sino que también su padre es molinero, lleva el trabajo a la casa y el niño acostumbra a acompañarlo al molino.

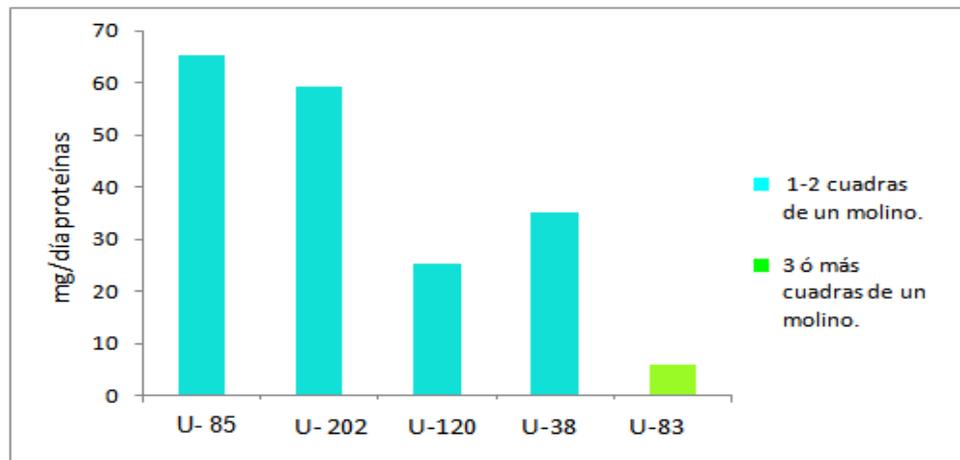


Figura 33.- Concentración de proteínas con relación a la distancia de la casa de habitación del niño al molino.

VII.- CONCLUSIONES

- Utilizando el cartucho de Azul de Sefarosa, no se obtuvieron las condiciones de selectividad para la separación y cuantificación de la albúmina por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia.
- Con la separación de la albúmina con el ácido tricloroacético como agente precipitante, no se obtuvo la precipitación total de las proteínas.
- La concentración de las proteínas totales se logró determinar, por precipitación con una solución de Ácido Tricloroacético - Ponceau S y Espectroscopía de Absorción Molecular. Obteniéndose un porcentaje de recuperación de 96%, dentro del rango establecido para muestras biológicas (70-120%). Del mismo modo se obtuvo una precisión de 1,7 %. Con límites de detección y de cuantificación de 19 y 63 mg proteínas/día respectivamente.
- Sólo el 5% de los niños muestreados presentaron niveles de proteínas medibles en la orina, de los cuales la excreción de proteínas por 24 horas, ninguno de ellos excedió el valor límite de referencia normal para asociarlos con proteinuria (>150mg/día).
- Normalizando la concentración de proteínas con los niveles de creatinina, uno de los niños superó el valor referencial (300mg/g Creatinina).
- Al correlacionar los valores de concentración de Hg/g Creatinina de las muestras de orina analizadas con los niveles de proteínas/g Creatinina se observó que no existe una distribución normal para ambos.

➤ Se observó mayor concentración de proteínas en la orina de los niños, a medida que la distancia de lugar de habitación del mismo, se aproximaba al lugar de ubicación de molinos.

VIII.- RECOMENDACIONES

➤ Realizar un seguimiento de los niños muestreados con el fin de evaluar si presentan alguna patología renal.

➤ Con la intención de evaluar si la proteinuria está constituida principalmente por Albúmina, se debe determinar los niveles de proteínas totales en la sangre, junto con los niveles de proteínas en la orina y calcular el cociente proteinuria/proteinemia. Este cociente permite diferenciar si la proteinuria es selectiva o no (cociente $< 0,1$ indica proteinuria selectiva, excreción mayoritaria de albúmina; cociente $> 0,2$, proteinuria no selectiva, excreción mayoritaria de proteínas de mayor peso molecular).

IX.- BIBLIOGRAFIA

- ✓(1) Dr. E. Santiago. Toxicología del mercurio. Actuaciones preventivas en sanidad laboral y ambiental. Lima, Perú. (2001).
- ✓(2) Evaluación mundial sobre el mercurio. Publicado por PNUMA. Productos Químicos. Ginebra, Suiza. Diciembre. (2002).
- ✓(3)[http://es.wikipedia.org/wiki/Mercurio_\(elemento\)](http://es.wikipedia.org/wiki/Mercurio_(elemento)) (Revisado Marzo 2010).
- ✓(4)<http://www.lenntech.es/periodica/elementos/hg.htm> (Revisado Marzo 2010).
- ✓(5) J. O. Verbel, B. J. Restrepo. El lado gris de la minería del oro: la contaminación con mercurio en el norte de Colombia. Universidad de Cartagena. Colombia. (1993).
- ✓(6)<http://www.estrucplan.com.ar/Producciones/Entrega.asp?identrega=38> (Revisado Marzo 2010).
- ✓(7) J. E. Picazo, J. M. Fernández. Fuentes naturales y antropogénicas de los mercuriales. Actualidad Dermatológica. 39-42.
- ✓(8) Documento informativo para la evaluación mundial del mercurio. Mayasa. (2001).

✓(9) *F. Pantoja*. Tecnologías apropiadas para disminuir la contaminación ocasionada por mercurio en la minería del oro. Lima. Perú. (2001).

✓(10) R. Gil, R. Bermúdez, A. De Abreu, O. Alvarado, J. Domínguez. Metales pesados en plantas provenientes de áreas afectadas por la minería aurífera en la reserva forestal Imataca, Venezuela. *Scielo Venezuela*. 10(2006)259-262.

✓(11)<http://www.rena.edu.ve/SegundaEtapa/ciencias/impacto.html>
(Revisado Abril 2010).

✓(12)<http://www.quimica.unam.mx/IMG/pdf/21HG.pdf> (Revisado Marzo 2010).

✓(13) A. Counter, L. H. Buchanan. Exposición a mercurio en niños. *Toxicología y farmacología aplicada*. 198 (2004) 209-230.

✓(14) M. Gutiérrez. Diagnóstico clínico y tratamiento de la intoxicación por mercurio". Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia.

✓(15)<http://www.cepvi.com/medicina/fisiologia/renal.shtml>(Revisado Abril 2010).

✓(16) J. Dubea, J. Girouardb, P. Leclercc, P. Douville, Problems with the estimation of urine protein by automated assays. *Clinical Biochemistry* 38 (2005) 479– 485.

✓ (17) I. Nadal Lizabe, N. Clerigué Arrieta, J.M. Del Moral Aldaz y E. Aznal Sainz. Proteinuria. Nefrología/Urología.

✓ (18) <http://www.zonadiet.com/nutricion/proteina.htm> (Revisado Abril 2010).

✓ (19) R. Pérez. Proteinuria. Servicio de Nefrología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid. España. (1998).

✓ (20) <http://www.tinitus.com.ar/Download/Biblioteca/Pediatria/Nefrouroprot19-proteinuria.pdf> (Revisado Abril 2010).

✓ (21) <http://www.ugr.es/~fgil/biomarcadoresrevtoxicol.pdf> (Revisado Abril 2010).

✓ (22) E. K. Silbergeld y D.L. Davis. Role of biomarkers in identifying and understanding environmentally induced disease. Clin. Chem. 40(1994) 1363-1367.

✓ (23) M. A. Ferguson, V. S. Vaidya, J. V. Bonventre. Biomarkers of nephrotoxic acute kidney injury. Toxicology. 245 (2008) 182–193.

✓ (24) C. Escalante, F. Zeledón, G. Ulate. Proteinuria, fisiología y fisiopatología aplicada. Acta Médica Costarricense (2006) 83-89.

✓(25) D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman. Principios de Análisis Instrumental. Quinta edición. Mc Graw Hill. España, 2001.

✓(26) M. Veiga, D. Bermudez, H. Pacheco, L. Martins, A. Gunson, G. Berrios. Mercury pollution from artisanal gold mining in block B, El Callao, Bolivar State, Venezuela. Health and Technological Assessment. Environmental Practice 6 (2004) 97-98.

✓(27) S. Counter, L. Buchanan. Mercury Exposure in Children: a Review. Toxicology and applied pharmacology. 198 (2004) 209-230.

✓(28) S. Bose-O'Reilly, B. Lettmeier, R. Matteucci, C. Beinhoff, U. Siebert, G. Drasch. Mercury as a serious health hazard for children in gold mining areas. Environmental Research. 107 (2008) 89-97.

✓(29) C. Tineo. "Determinación de los Niveles de Mercurio en la Orina de niños en edad escolar de la Población de El Callao, en la Zona Minera del Estado Bolívar, Venezuela. Universidad Central de Venezuela. 2010.

✓(30) M. Matos. "Determinación de los Niveles de Mercurio Orina en los Niños de la Población de El Callao, Estado Bolívar, Venezuela."Universidad Central de Venezuela. 2010.

✓(31) D. Ratge, H. Wisser. Urinary protein profiling by high-performance gel permeation chromatography. Journal of chromatography B: Biomedical sciences and application. 230 (1982)47-56.

- ✓(32) S. Iwata. Recommended method of the Japanese Association of Medical Technologists for the determination of protein in urine by HPLC. *Clinica Chimica Acta*. 303(2001)95-104.
- ✓(33) W. D. Comper, G. Jerums, T. M. Osicka. Differences in urinary albumin detected by four immunoassays and high-performance liquid chromatography. *Clinical Biochemistry*. 37(2004)105-111.
- ✓(34) J. H. Contois, C. Hartigan, L. V. Rao, L. M. Snyder, M. J. Thompson. Analytical validation of an HPLC assay for urinary albumin. *Clinica Chimica Acta*. 367(2006)150-155.
- ✓(35) M. Pesce, C. Strande. A New Micromethod for determination of protein in Cerebrospinal and Urine. *Clinica Chimica Acta*. 19 (1973) 1265-1267.
- ✓(36) C. Abdennour, K. Khelili, M.S. Boulakoud, A. Nezzal, S.Boubsil, S. Slimani. Urinary Markers of Workers Chronically Exposed to Mercury Vapor. *Environmental Research*. 89(2002)245-249.
- ✓(37)P. Fernandez. "Determinación del tamaño muestral". *Cad Aten Primaria* 3, (e1/6-22/6). 1996.
- ✓(38) R. Henry, D. Cannon, J. Winkelman. *Química Clínica, Bases y Técnicas*. Editorial JIMS. 2º Edición. España. 1980.
- ✓(39)D. Skoog, D. West. *Fundamentos de Química Analítica*. Cáp.3. Pág. 42. Editorial Reverté, S.A. España.

✓ (40) J. Miller, J. Miller. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. Métodos de Calibración en Análisis Instrumental. Pages 125-127, Prentice Hall. 4º Edición, Madrid, 2002.

✓ (41) http://www3.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_9121.pdf

✓ (42) [http://documents.orthoclinical.com/clindiag/ocdFILES.nsf/bb50101afe98695385256e2c0051539e/0e28fa4b0aedd758852575ad006d2969/\\$FILE/fU118849r2011-05-09.pdf](http://documents.orthoclinical.com/clindiag/ocdFILES.nsf/bb50101afe98695385256e2c0051539e/0e28fa4b0aedd758852575ad006d2969/$FILE/fU118849r2011-05-09.pdf)

✓ (43) M. Parkany. The Use Factors in Trace Analysis. The Royal Society of Chemistry. 1996.

✓ (44) G. Gordillo, R. Exeni, J. De La Cruz. Nefrología Pediátrica. 3º Edición. Editorial Elsevier. España. 2009.

✓ (45) <http://www.revistanefrologia.com/revistas/P7-E237/P7-E237-S141-A3101.pdf> (Revisado Abril 2011).

✓ (46) <http://www.iqb.es/monografia/fichas/ficha051.htm> (Revisado Abril 2011).

✓ (47) http://www.msd.es/publicaciones/mmerck_hogar/seccion_11/seccion_11_123.html (Revisado Abril 2011).

X.- APENDICE

X.1.- Tabla de números aleatorios.

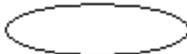
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
0	3	4	5	9	8	5	6	7	1	5	4	8	2	4	8	3	2	6	5	0	6	1	9	4	1
1	3	2	7	7	7	2	9	6	3	5	8	8	2	7	0	4	2	8	3	4	0	3	8	7	8
2	6	7	8	8	5	4	7	2	0	2	7	7	1	7	7	6	5	9	1	1	4	1	3	7	9
3	2	9	2	4	8	1	3	4	6	2	3	0	5	3	2	4	4	7	1	5	2	6	3	0	9
4	1	3	8	7	3	9	1	9	7	8	0	8	9	4	5	2	7	0	3	8	1	8	9	3	9
5	4	2	2	2	0	7	1	7	5	7	0	1	1	3	6	9	4	6	8	9	1	1	8	6	4
6	6	9	3	3	7	3	3	8	9	5	6	9	8	7	6	6	8	0	0	2	1	1	5	6	0
7	1	8	2	9	1	3	6	7	6	1	2	8	6	3	3	1	1	4	5	8	6	1	3	6	5
8	9	1	0	1	6	8	6	5	2	8	4	1	8	1	4	1	0	5	6	3	6	8	8	3	4
9	0	9	6	8	5	5	4	4	9	6	2	0	8	1	2	1	1	2	8	8	3	4	6	0	5
10	0	0	6	5	8	6	5	6	6	6	9	7	0	0	7	2	4	3	1	6	5	6	2	9	0
11	5	8	5	6	4	9	2	1	8	7	6	0	4	0	0	9	5	6	3	1	8	3	3	5	8
12	0	1	9	2	2	9	6	9	8	1	0	2	5	0	8	1	9	0	6	4	8	0	7	2	7
13	8	0	1	9	8	1	1	2	1	2	1	9	5	1	1	4	5	0	7	0	6	8	2	2	4
14	2	3	1	6	4	1	5	2	5	6	6	7	2	5	4	7	4	3	6	4	9	7	1	3	9
15	3	7	8	7	9	8	6	9	0	7	7	6	1	3	9	7	0	5	1	1	2	7	3	1	8
16	8	3	9	8	4	5	8	3	4	0	3	5	9	8	9	9	5	7	0	8	0	6	6	0	1
17	3	0	0	9	3	4	5	8	8	0	7	3	9	0	2	2	8	9	4	6	1	9	2	4	8
18	0	8	9	5	0	0	7	3	3	0	4	4	3	2	3	9	1	9	4	0	3	4	6	8	8
19	7	2	8	8	7	6	9	6	3	7	7	5	8	0	2	7	3	7	8	5	0	1	6	4	5
20	3	0	9	5	7	7	7	1	3	3	3	1	1	0	3	2	7	9	8	0	4	7	9	9	0
21	4	3	5	9	3	2	0	4	2	2	7	1	7	5	0	3	6	2	0	5	8	1	9	2	5
22	9	3	7	6	2	1	9	6	2	4	9	4	7	2	4	3	7	9	1	9	9	0	9	6	0
23	9	3	3	5	6	7	0	1	0	5	0	4	3	6	1	6	9	6	5	5	9	8	2	7	0
24	6	8	3	5	4	1	6	4	1	4	4	4	2	1	7	3	4	5	4	3	0	9	0	9	9
25	6	2	3	4	1	9	9	1	6	7	0	8	7	8	6	7	0	6	5	8	6	7	5	7	1
26	6	1	8	8	2	6	5	2	4	7	6	3	5	6	8	5	7	2	5	7	1	7	6	1	5
27	4	0	6	6	1	6	6	1	4	4	8	7	5	4	3	0	6	6	5	1	7	4	3	8	4
28	1	4	0	6	6	7	2	3	7	2	6	1	2	7	4	5	9	3	5	3	3	7	5	5	4
29	0	7	8	1	1	0	0	7	9	0	1	9	5	6	1	2	3	4	2	4	4	4	1	7	8
30	3	4	6	2	3	0	1	3	1	3	6	1	3	4	7	9	8	1	3	5	1	6	6	4	4
31	8	4	2	9	9	0	2	6	8	6	5	2	6	8	6	8	6	2	2	8	8	4	0	1	9
32	5	2	5	6	1	0	4	8	3	8	9	4	0	9	4	4	2	1	1	4	0	9	7	2	3
33	2	1	4	5	8	7	5	8	6	4	1	7	3	6	9	0	5	9	7	2	9	8	6	5	7
34	2	4	6	3	7	5	4	4	4	9	7	7	5	9	2	9	0	8	5	3	5	5	9	9	9
35	0	0	1	1	3	2	1	8	5	3	6	7	9	1	2	5	8	8	4	0	8	3	4	0	8
36	5	0	8	7	3	2	3	6	6	0	9	7	7	9	2	2	0	9	8	5	8	9	6	7	6
37	9	5	3	8	8	9	5	5	3	4	4	8	4	4	7	3	4	2	4	1	9	7	4	3	2

X.2.- Encuesta.

Fecha: / /

Escuela _____

Grado _____

Nº 

Datos de los padres

1. Nombres

Padre _____ Madre _____

2. Edad padre _____ madre _____

3. Dirección _____

Distancia de la vivienda con respecto

4. A la escuela	1-2 cuadras	3-4 cuadras	más de 5 cuadras
5. A un molino			
6. A una mina			
7. A un taller			
8. Una fundición			

9. Ha tenido abortos No 1-2 > 3

10. Nº de hijos 1-3 4-6 7-10 más de 10

Datos profesión o oficio

11. Trabajo la madre No Si minería joyero venta de joyas
otro, cual? _____

12. Tiempo trabajando 1-10 años 10-20 años más de 20 años

13. Trabaja el Padre No Si Molinero/ Minero/ joyero

Venta de oro otro, cual? _____

Tiempo trabajando 1-10 años 10-20 años más de 20 años

14. Trabaja en la casa No Si

15. El niño lo acompaña al lugar de trabajo No Si

Datos personales del niño

16. Nombre y Apellido _____

17. Sexo M F Edad

18. Peso _____ Talla _____

19. Duración del embarazo normal prematuro

20. Parto normal Cesaria

21. Periodo de lactancia/meses 1-6 6-12 más de 12
22. Nació en el callao No Si
23. Tiempo de residencia en el callao 1-5 años 6-10 más de 10 años
24. Tiene amalgamas No Si Cuantas? 1-2 3-4 más de 5

Vacunas y medicamentos

25. Tiene la vacuna de fiebre amarilla	NO	SI	
26. Tiene todas las vacunas	NO	SI	
27. Consume algún medicamento	NO	SI	Cual?
28. Consume vitaminas	NO	SI	Cual?
29. Consume algún té o hiervas	NO	SI	Cual?

Hábitos alimenticios del niño

	esporádicamente	1-2 veces /semana	3-4 veces /semana	>5 veces/semana	observación
30. Pescado					
31. Carne rojas					
32. Pollo					
33. Cereales					
34. Granos					
35. Vegetales					
36. Frutas					
37. Leche					
37 Otros Lácteos					
39. Gaseosas					
40. tuberculos					
41. Vegetales verdes					
42. enlatados					
43. Atún/sardina					
44. Diablito y otros					

Algunos síntomas

Dolor de cabeza				
Dolor abdominal				
Dificultad visual				
Dificultad auditiva				
Pérdida del equilibrio				
Problemas de atención				

Autorización

Yo, _____ portador de la CI _____ autorizo a la Universidad Central de Venezuela, en nombre de la Prof. Nereida Carrión, declaro de forma voluntaria y por escrito que he recibido la información completa de mi participación en la actividad realizada, en la población de "El Callao", y los autorizo para la recolección y análisis de las muestras para la determinación de mercurio.

Representante

Dr. Nereida Carrión

Testigo

X.3.- Modelo del cálculo para la determinación de proteínas totales.

Primero se realizó una curva de calibración a partir de diluciones sucesivas de un patrón de 10.000 mg/L.

g Albúmina (pesados) = 1,0296g.

$$[\text{Patrón}]_{\text{real}} = 1,0296 \text{ g} \times \frac{97,5 \text{ g puros}}{100 \text{ g impuros}} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} \times \frac{1}{0,1 \text{ L}} = 10.038,6 \text{ mg/L.}$$

$$S = 10.038,6 \times \sqrt{\frac{(0,0002)^2}{1,0296} + \frac{(0,08)^2}{100}}$$

$$S = 8,264 = \underline{8} \longrightarrow (10.039 \pm 8) \text{ mg/L}$$

- Patrón 1000 mg/L.

Alicuota que debo tomar del patrón de 10.039 mg/L, para preparar un patrón de 1000mg/L. Volumen final: 100mL.

$$10.038,6 \text{ mg/L} \times V = 100\text{mL} \times 1000 \text{ mg/L} \rightarrow V = 9,96\text{mL} = 10\text{mL}.$$

$$S = 1.003,9 \times \sqrt{\frac{(0,02)^2}{10} + \frac{(8)^2}{10.039}} = 2,16 = \underline{2}$$

↓

$$(1004 \pm 2) \text{ mg/L}$$

El resto de los patrones se prepararon en balones de 10 mL.

Una vez preparados los patrones, se graficó la curva de calibración y a partir de esta se determinaron las concentraciones de las muestras.

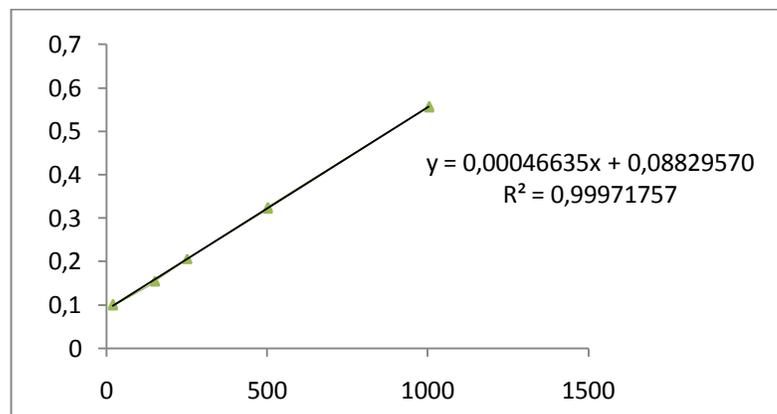


Figura 34.- Representación de la curva de calibración usada para la cuantificación de las proteínas totales.

Concentración proteínas totales (mg/L) = (Señal muestra-Señal del Blanco) - Pto de Corte

Pendiente de la recta

La señal que proporcionaba el equipo ya tenía restado el valor del blanco, ya que el blanco se ajustaba antes de cada medida. Para obtener el valor de proteínas totales por 24 horas, se multiplica la concentración determinada a partir de la curva en mg/L por el volumen total de 24 h de orina.

$$\text{Concentración Proteínas totales mg/día} = \text{Concentración mg/L} * V_{\text{total}}$$

Tabla 37.- Modelo Cálculo concentración promedio de proteínas totales de una muestra.

Muestra	Réplica	Señal	Concentración (mg/L)	Vol Total (L)	Concentración (mg/día)
193	1	0,113	52,9737	1,2	63,568
	2	0,112	50,8294	1,2	60,995
	3	0,116	59,4067	1,2	71,288
Promedio (mg/día)					65 ± 5

Tabla 38.- Señales obtenidas y concentraciones de las muestras que presentaron proteínas.

Muestra	Señal	Señal	Señal	Concentración Promedio (mg/L)	Vol (L)	Concentración (mg/día)
85	0,116	0,113	0,112	54 ± 4	1,2	65 ± 5
202	0,229	0,228	0,222	296 ± 8	0,2	59 ± 2
120	0,099	0,102	0,103	28 ± 4	0,9	25 ± 4
38	0,115	0,114	0,118	59 ± 4	0,6	35 ± 3
83	0,104	0,101	0,102	30 ± 3	0,2	6 ± 1

X.4.- Cromatogramas de los patrones empleados para la construcción de la curva de calibración en Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia.

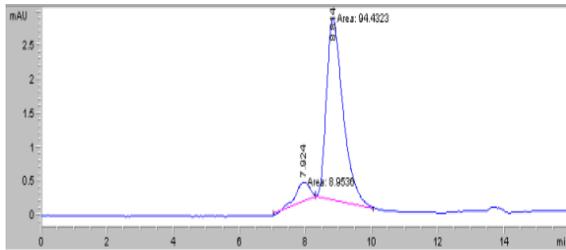


Figura 35.- Cromatograma Patrón de 300mg/L

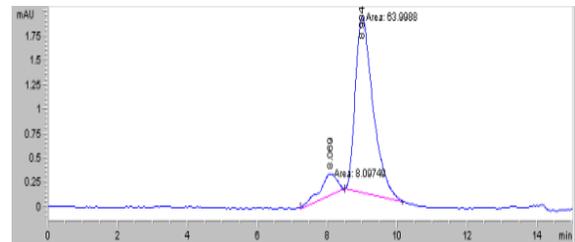


Figura 36.- Cromatograma Patrón 200mg/L

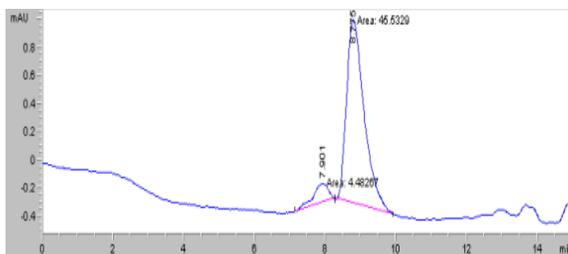


Figura 37.- Cromatograma Patrón de 150 mg/L.

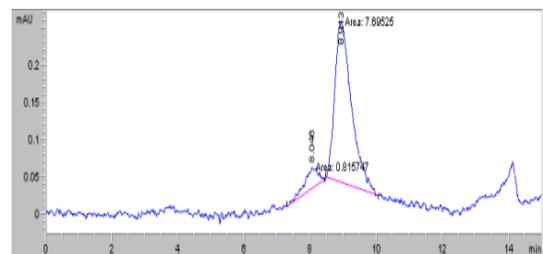


Figura 38.- Cromatograma Patrón de 20 mg/L.

mg/L.

X.5.- Determinación de Proteínas Totales en muestras de adultos.

Se analizaron 5 muestras de adultos que residen en Caracas, a modo comparativo. Arrojó como resultado que dos de las muestras analizadas, con antecedentes clínicos que provocan la aparición de proteínas en la orina como se reporta en la bibliografía ⁽⁴⁷⁾, presentaron las mismas. Confirmando que el método empleado en el análisis detecta proteínas en la orina. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 39.

Tabla 39.- Concentración de proteínas en muestras de 5 adultos que residen en Caracas.

Edad	Absorbancia (Promedio)	Concentración Promedio (mg/L)	Volumen (L)	Concentración (mg/día)
53	0,1007	26 ± 5	1,5	39 ± 8
48	0,1437	119 ± 3	1,1	131 ± 4
77	<LOD			
22	<LOD			
52	<LOD			