



AVENTURAS DEL PENSAMIENTO

DETERMINACIÓN DE NIVELES DE COBRE

en una población estudiantil de la Facultad de Ciencias Químicas por espectrofotometría de absorción atómica en flama

D. SOLTERO BAEZA, D. S. PALAFOX GONZÁLEZ, I. R. HERRERA BAEZA,
A. DÁVILA SÁNCHEZ, J. M. CUÉLLAR MIRAMONTES y M. O. GONZÁLEZ RANGEL
Facultad de Ciencias Químicas/Universidad Autónoma de Chihuahua

El cobre es un elemento que se encuentra en la naturaleza de forma natural y resulta indispensable para la formación y el buen funcionamiento de todos los seres vivos. Se han descrito una serie de patologías en las cuales se ve involucrado este metal, por lo cual es de gran importancia clínica contar con métodos eficaces para la determinación sérica. En la actualidad, el método colorimétrico es el más utilizado; sin embargo, presenta una baja especificidad, además de dar lugar a un sinnúmero de posibles errores, por lo cual en este trabajo se utilizó el método de espectrofotometría de absorción atómica en flama que demostró mayor sensibilidad para este tipo de determinaciones, así como la optimización del tiempo de lectura de las muestras.

El estudio se realizó para determinar las concentraciones de cobre sérico en una población de estudiantes de la Facultad de Ciencias Químicas y los valores obtenidos fueron evaluados mediante el programa estadístico Minitab 13.2.

Se concluyó que los valores normales de cobre sérico para esta población fluctúan entre 1.038 y 1.086mg/L y se encontró de igual forma que no existe una diferencia del valor en cuanto al género. Se realizó una comparación entre los valores por el método colorímetro mencionados en la bibliografía y los obtenidos por el método de espectrofotometría de absorción atómica en flama, cuyos resultados arrojaron una similitud; sin embargo, se observó una mayor sensibilidad por este método ya que su determinación está detectando ppm, mientras que el calorimétrico resulta sensible a cantidades de mg/dl, por lo que el método EAA en flama es más confiable, más sensible y con menor rango de error.

Introducción

A medida que la bioquímica explica la etiología de las patologías, aparece la necesidad diagnóstica de disponer de procedimientos precisos, reproducibles y rápidos para conocer la mejor información acerca de los parámetros químicos que condicionan el estado de salud o de enfermedad de un individuo o de una población. Precisamente, de esta necesidad nace la química clínica como la aplicación de la bioquímica y otras disciplinas al diagnóstico de la salud y enfermedad humana.

El cobre es un oligoelemento esencial para el hombre. Sus concentraciones en plasma no solo dependen del metabolismo endógeno sino que se ven afectadas también por factores del ambiente, por lo que los valores normales dependerán de la población específica a la que se refiera. En el estado de Chihuahua no existen antecedentes de los valores normales en esta población, ni la referencia de este elemento en plasma por el método de espectroscopia de absorción atómica en flama (EAA en flama), técnica mucho más sensible. La determinación de este elemento se hace necesaria en algunas patologías como prueba de diagnóstico clínico diferencial; por lo que se requiere contar con una técnica estandarizada para ello.

Este elemento se almacena preferentemente en el hígado, riñón, músculo, corazón y cerebro. Se consideran valores anormales los inferiores a 0,7 microgramos/ml en el hombre y 0,8 microgramos/ml en la mujer. Su deficiencia produce anemia, neutropenia y desmineralización ósea, mientras que la ingestión en exceso resulta tóxica.

Aunque no son frecuentes las intoxicaciones agudas por este metal, dadas sus propiedades eméticas y laxantes, se caracterizan por náuseas, vómitos, dolor de cabeza y debilidad. Los casos más graves cursan con taquicardia e hipertensión que pueden ir seguidas por ictericia, anemia hemolítica, uremia y muerte. Tras la absorción por vía gastrointestinal de cantidades pequeñas pero repetidas pueden presentarse náuseas, salivación, dolor epigástrico, diarreas, vértigo, debilidad e ictericia. Así, se han observado vómitos y diarreas por consumo de té con 25ppm de cobre y se han descrito también erupciones cutáneas por ingestión de agua con 7.6ppm de este metal.^{6,7,8}

Los pacientes que presentan déficit de cobre por razones de disminución en la ingesta o aumento de la pérdida tienen niveles bajos en sangre y muestran una serie de trastornos debidos a la alteración de las funciones de las cuproenzimas.

Métodos para la determinación del cobre

En el siguiente cuadro se mencionarán las principales ventajas y desventajas de los diferentes métodos que existen para la determinación del cobre:

Se han encontrado reportes de datos de niveles séricos de cobre por el método de espectrofotometría de absorción atómica en llama reportados en 1987 en un estudio epidemiológico en niños y adolescentes con el objetivo de observar la relación de estos niveles con los factores de riesgo cardiovascular.¹

La determinación de cobre en suero es importante en el diagnóstico de la enfermedad de Wilson, cuya incidencia se estima en aproximadamente uno de cada 30,000 niños nacidos y el síndrome de Menkes, ambos errores innatos del metabolismo del cobre. La cupremia se eleva en los estados de infección, embarazo, leucemia y cánceres, las enfermedades del colágeno (reumatismo articular agudo, artritis reumatoide), en las infecciones y especialmente en la tuberculosis, la hemacromatosis y el infarto miocárdico, el hipertiroidismo y la anemia pernicioso.³

Para el diagnóstico clínico de estos trastornos metabólicos, así como para la caracterización bioquímica de las metaloproteínas y enzimas, es esencial un método sensible y específico para la determinación de cobre. Sin embargo, el análisis de cobre en suero y otros fluidos biológicos presenta ciertos obstáculos debido a que el metal se encuentra en cantidades traza. El método de referencia para su análisis es la espectrofotometría de absorción atómica, el cual requiere de equipo sofisticado, lo que aumenta los costos del análisis. Además, pocos laboratorios cuentan con ese instrumental. De allí la necesidad de implementar técnicas menos costosas para esta determinación, las cuales deben reunir los estándares de exactitud, simplicidad y conveniencia. Los métodos espectrofotométricos son los de elección para la determinación de cobre y se han descrito una serie de ellos. Sin embargo, un problema con las determinaciones colorimétricas es que muy pocos métodos tienen alta sensibilidad o pueden ser aplicados directamente a una muestra sin sufrir interferencias por detergentes, otros iones metálicos o variaciones en la estabilidad o dependencias del pH. Otras metodologías presentan el inconveniente de utilizar reactivos tóxicos y difíciles de adquirir.²

Espectrofotometría de absorción atómica en flama

Los métodos de AA están claramente establecidos y las condiciones estandarizadas y protocolos de trabajo perfectamente establecidas para todos los elementos susceptibles de ser determinados por AA.

La precisión es buena $\pm 0.5\%$ con 1% de error relativo.

La sensibilidad resulta igualmente buena (permite el análisis a nivel de trazas).^{4,5}

Los límites de detección son relativamente altos, dado que solo una porción pequeña de la muestra está presente en la llama en un instante determinado. A la hora de plantearse la determinación de un elemento hay que considerar la longitud de onda (?) y ancho de rendija precisos; la sensibi-

Cuadro 1.

| Método | Ventajas | Desventajas |
|--|---|---|
| Colorimetría | Costos de determinación más bajos. | No tienen alta sensibilidad. |
| Espectrofotometría de absorción atómica en flama | Mejor sensibilidad y exactitud a nivel de ppb para la mayor parte de los elementos (2% de precisión). No sufre interferencias por detergentes, otros iones metálicos, variaciones en la estabilidad o dependencias del pH. | Es un equipo sofisticado, lo que aumenta los costos del análisis. |

lidad e intervalo de linealidad precisos; tipo de llama a seleccionar y método de mezclado de muestra. El combustible más utilizado es acetileno; el aire o el óxido nitroso se suelen usar como oxidantes, ya que el N_2O tiene mayor poder calorífico, pero también más ruido.

En AA se utiliza también un sistema de corrección de señal de fondo con chopper. Los sistemas de corrección utilizan una lámpara de deuterio adicional o bien hacen uso del efecto Zeeman.

La espectrofotometría de absorción atómica por flama es el método por el cual el elemento se determina mediante un espectrómetro de absorción atómica, usado en conjunto con un sistema de nebulización y una fuente de atomización. La fuente de atomización es un quemador que utiliza diferentes mezclas de gases; las más frecuentes, aire-acetileno y óxido nitroso-acetileno.

Materiales y métodos

- Tubos de ensayo con tapones.
- Matraces aforados de 100ml.
- Centrifugas clínicas (FisherScientific y ClayAdams).
- Pipetas serológicas.
- Vasos de precipitado.
- Tubos eppendorf.
- Matraz aforado de 250ml y 500ml.
- Matraz volumétrico de 1000ml.
- Tubos para muestras sanguíneas (EDTA).
- Pipetas de transferencia.
- Espectrofotómetro de absorción atómica modalidad Flama Perkin Elmer Precisely AAnalyst 2000 Atomic Absorption Spectrometer, con corrección de fondo con lámpara de deuterio y lámpara de tuxten-iodide. La flama utilizada fue de aire-acetileno con un flujo de aire de 10Lts por minuto y 2.5Lts por minuto de acetileno.
- Lámpara de cátodo hueco para cobre Hamamatsu trabajando a una intensidad de corriente de 15mA en la línea de 324.75nm y con un slipt de 2.7/0.8.
- Ácido clorhídrico 1N (solución reductora) 37.2%, PM 36.46, J.T. Baker.
- Ácido nítrico 66.1% , PM 63.1 J.T. Baker.
- Ácido tricloroacético al 20%.
- Solución patrón estándar de cobre 100PPM en 2% de ácido nítrico (certificado por el Cenam).
- Neutrox Solución Detergente (Densidad en Kg/L: 1.07; pH: 7.00).
- Agua tridestilada.
- Agua des-ionizada (1.3 μ s/cm).
- Glicerol al 10%. 99.95%, PM 92.10, J.T. Baker.

A) Toma de muestra y obtención del plasma

1. Se toma una muestra representativa de 100 alumnos (el 10% de la población estudiantil, la cual es de 850 alumnos del periodo escolar semestre 2005-01 aproximadamente, redondeando a 100 muestras).
2. Se aplicó una encuesta para evaluar el estado de salud de las personas participantes en este proyecto.

3. Las muestras sanguíneas fueron extraídas en tubos con EDTA.
4. Las muestras se centrifugaron a 3600rpm durante 5 minutos y el plasma obtenido se almacenó en tubos eppendorf a $-2^{\circ}C$ hasta el momento del análisis.

B) Desproteínezación

Pipetear en tubos de centrifuga:

- Plasma (MP): 1.0mL.
- Soluciones reductora (ácido clorhídrico 1N): 1.0mL.

Mezclar y dejar en reposo durante 10 minutos a temperatura entre $+15^{\circ}$ y $+25^{\circ}C$.

- Solución de ácido tricloroacético al 20%: 1.0mL.

Mezclar y centrifugar el problema. Pipetear del sobrenadante claro en tubos de ensayo secos.

- Sobrenadante exento de proteínas: 2.0mL.

Etiquetar y guardar las muestras en el refrigerador a $-5^{\circ}C$.

C) Preparación de estándares

Solución de glicerol al 10% (preparada a partir de 70mL de glicerol concentrado y agua tridestilada para la obtención de la solución deseada). Esta solución necesaria para la elaboración de los estándares fue utilizada además como blanco de reactivo.

Estándares de 1, 2, 4, 6, 8, y 10 ppm preparados a partir de la solución patrón estándar de cobre de 100ppm en 2% de ácido nítrico certificado por el Cenam, aforando con solución de glicerol al 10%.

D) Lectura de las muestras

1. Se realizó la lectura del blanco y los estándares para la obtención de la curva de calibración.
2. Se llevo a cabo la lectura de las muestras problemas por duplicado, con un tiempo de lectura de 3 segundos. Para asegurar la veracidad del las lecturas obtenidas, se fueron alternando los estándares como si fueran muestras problemas.
3. Los resultados obtenidos fueron analizados por medio del programa Minitab, herramienta necesaria para la elaboración del estudio estadístico.

Resultados

Curva de calibración de los estándares

En la siguiente figura se observa la curva de calibración de los estándares (estándar certificado por el Cenam para la determinación de cobre en plasma que cumple con la linealidad requerida para una lectura adecuada de las muestras con un coeficiente de correlación de 0.9963, valor indicativo de la confiabilidad del método realizado.

Distribución de la concentración de cobre sérico en hombres y mujeres

A continuación se muestra una gráfica de puntos donde se observan todas las mediciones tomadas y se hace una comparación entre hombres y mujeres. Se puede distinguir

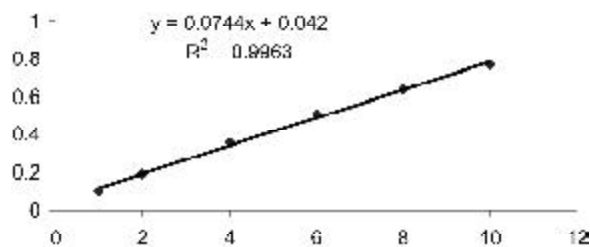


Gráfico 1. Curva de calibración para cobre en ppm.

una media similar donde se identifica una mayor dispersión en las concentraciones de cobre en las muestras de las mujeres que en las de los hombres..

Distribución de la concentración de Cu sérico en hombres y mujeres
Las medidas están indicadas por líneas

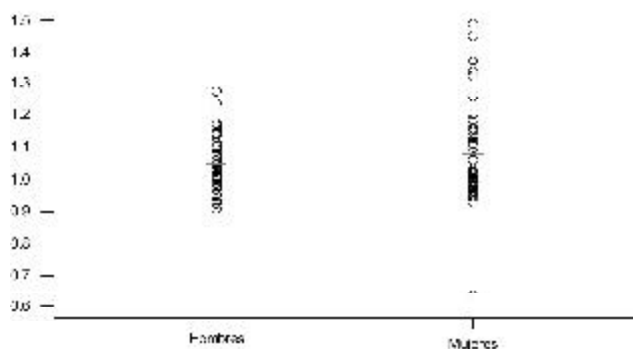
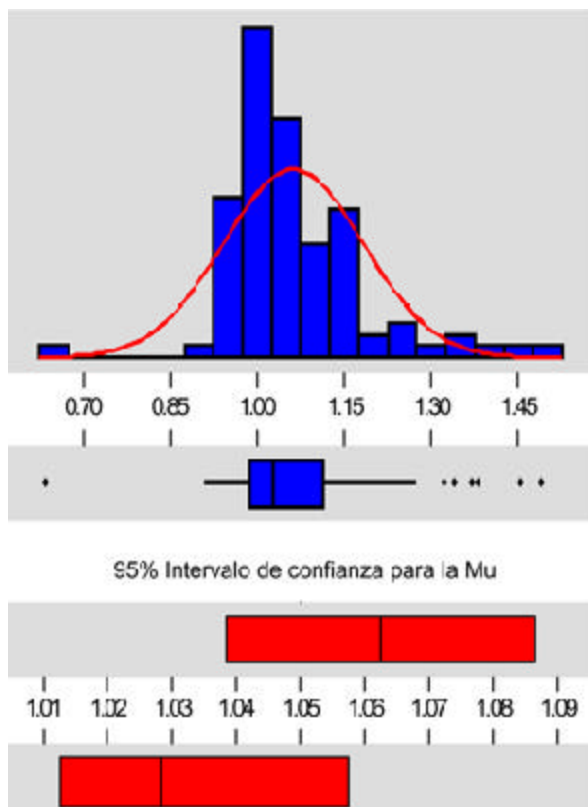


Gráfico 2. Gráfica comparativa.



Variable: ppm

| | |
|----------------|----------|
| Promedio | 1.06251 |
| Desviación Std | 0.12103 |
| Variación | 1.46E-02 |
| Sesgo | 0.961472 |
| Kurtosis | 3.31247 |
| N | 100 |

| | |
|--------------|---------|
| Mínimo | 0.63600 |
| 1er Quartile | 0.98850 |
| Media | 1.02850 |
| 3er Quartile | 1.11425 |
| Máximo | 1.48800 |

95% Intervalo de Confianza para Mu
1.03853 1.08656

95% Intervalo de Confianza para Sigma
0.10627 0.14060

Gráfico 3.

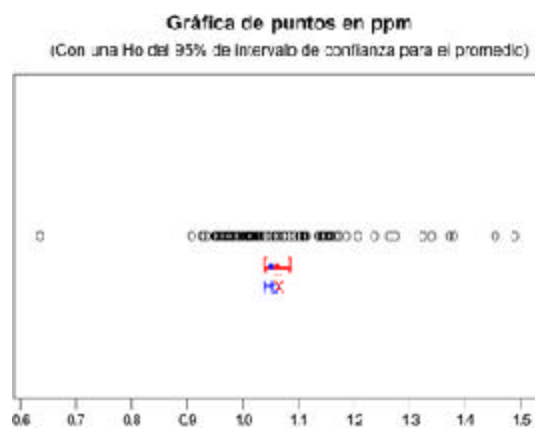


Gráfico 4. Comparación entre el método colorimétrico y el EAA en flama.

Interpretación de resultados y conclusiones

Para la elaboración de esta investigación se tomó la población de la Facultad de Ciencias Químicas de la UACH. La muestra consideró 100 personas, aproximadamente el 10% de la población total, cantidad estadísticamente aceptable.

Los estudiantes fueron seleccionados al azar. Sus edades fluctúan entre 18 y 26 años (49 mujeres y 51 varones). Se les aplicó una encuesta: un interrogatorio para evaluar el estado de salud general y poder llevar de este modo un mejor control. Posteriormente se les extrajo una muestra sanguínea y se obtuvo nuestro plasma problema, que se congeló a -2°C hasta el momento del análisis.

En el inicio del estudio de las muestras se desproteinizaron para lograr la liberación del cobre unido a la ceruloplasmina (proteína transportadora de cobre), utilizando como desproteinizador el HNO_3 y HCl .

Posteriormente, se elaboraron los estándares para la curva de calibración con un estándar de cobre de 100ppm en 2% de ácido nítrico certificado por la Cenam, lo que arrojó un valor agregado a esta investigación. Asimismo, para monitorear el proceso, las lecturas se alternaron con los estándares mencionados como si fueran muestras problema, aportando una mayor confiabilidad de los resultados.

Al momento de analizar las muestras por el método de EAA en horno de grafito, las concentraciones de cobre obtenidas resultaron ser más altas de lo esperado; por lo tanto, se optó por cambiar el método a modalidad flama ya que este detecta concentraciones más altas.

Una vez obtenidas las lecturas, se realizó un estudio estadístico con el programa Minitab 13.2, principal herramienta para el análisis de los datos. Mediante el método de espectrofotometría de absorción atómica en flama se determinó que los valores normales por este método oscilan entre 1.038ppm y 1.086ppm.

Posteriormente se comparó el método colorimétrico con el EAA en flama. Los valores reportados en la

bibliografía de las concentraciones de cobre por colorimetría son de 0.7ppm a 1.4ppm. Se realizó el análisis estadístico comparativo entre ambas técnicas y se llegó a la conclusión de que ambos métodos resultan similares para la determinación de este metal, por el valor de $P = 0.303$. Sin embargo, el de EAA en flama presenta una mayor sensibilidad, ya que las cantidades que este detecta es de ppm; es decir, son mucho más pequeñas que las utilizadas en el método colorimétrico (mg/dl), además de las interferencias por otros agentes utilizados en el manejo de la técnica.

En el desarrollo de esta prueba piloto se encontraron otros métodos que pueden ser de utilidad en posteriores investigaciones, como el de tecnología de la teoría de microondas y la adición de estándares conocidos.

Considerando que el cobre es un nutriente esencial, se debería considerar su determinación de manera más exacta para poderlo utilizar como un elemento más para el diagnóstico diferencial de muchas enfermedades provocadas por la deficiencia o el exceso de dicho metabolito como se mencionó anteriormente en los antecedentes de esta investigación.

En el mundo de los elementos huella en particular y el de los metales en general es un área del conocimiento en pleno desarrollo por sus implicaciones sobre la fisiopatología del hombre, en gran parte por descubrir.

Es importante el papel que los bioquímicos clínicos desarrollan no solo para el diagnóstico rápido y preciso de la enfermedad en el individuo, sino también en el seguimiento y control de los distintos factores nutricionales y medioambientales que condicionan el presente y futuro de la comunidad.

Referencias

- BRENNER, I.: "Manifestations of copper excess", *Am J Clin Nutr.* 67, S (1998), 1069S-73S.
- JIMÉNEZ-DÍAZ, M. y N.K. SCHOSINSKY: "Validación de la determinación de cobre en suero empleando el ácido bicinónico: relación cobre/ceruloplasmina en pacientes con enfermedad de Wilson y pacientes sin la enfermedad", *Revista Costa Rica Ciencia Medica*, vol. 23, nums. 1-2 (2004), 2002.
- "Minerales esenciales", <http://www.alimentacion-sana.com.ar/informaciones/novedades/minerales2.htm#co>, (consultado en septiembre 20 de del 2005).
- "Criterios para la elección de un espectrómetro de absorción atómica", <http://www.perkinelmer.cl/notas/not02.asp>. (consultado en septiembre 8 del 2005).
- "Métodos espectrofotométricos II", www.uniovi.es/QFAnalitica/trans/uimFores/Metodos_esp_ectrofotometricosII04-5.ppt (consultado en septiembre 8 del 2005).
- R., CARLOS-DÍAZ; P. HENRÍQUEZ-SÁNCHEZ; B. FÉLIX-LÓPEZ; L. RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ y M.LI. SERRA: "Serum copper and zinc concentrations in a representative sample the Canarian population", *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, t. 16, n. 2 (2002), p. 75.
- MÉNDEZ, M.A.; M. ARAYA; M. OLIVARES; F. PIZARRO y M. GONZÁLEZ: "Sex and Ceruloplasmin Modulate the Response to Copper Exposure in Healthy Individuals", *Environmental Health Perspectives*, t. 112, n. 17 (2004), p. 1654, 4 pp.
- M.M. O PENA; J. LEE y D.J. THIELE: "A delicate balance: Homeostatic control of copper uptake and distribution", *The Journal of Nutrition*, t. 130, n. 1S (2000), p. C1251, 10 pp. ©