

Importancia de la técnica de activación neutrónica para el análisis de elementos traza en materiales biológicos

Blanca Torres*, Patricia Bedregal, Pablo Mendoza, Marco Ubillus, Eduardo Montoya
Dirección de Investigación y Desarrollo, Instituto Peruano de Energía Nuclear, Av. Canadá 1470
Lima 41, Lima Perú

Resumen

El estudio de materiales biológicos actualmente tiene un interés creciente, por la importancia que tiene el conocimiento de la concentración de los elementos traza esenciales y tóxicos, para determinar los efectos que tienen en la salud y el medioambiente. En este trabajo se presenta el desarrollo de métodos de análisis para cuantificar elementos de interés en diferentes matrices como Se en huevo, Se en plasma, As, Hg, Sb, Na y Br en cabello, determinación multielemental en algas marinas en polvo; utilizando la técnica de Activación Neutrónica según el método del k_0 . Para asegurar la calidad de los resultados se analizaron los materiales de referencia: IAEA 366, IAEA A 392, MRC DOLT 3, en el caso de selenio en huevo se usó comparativamente el método de adición estándar.

Abstract

Nowadays, the studies in biological materials are increasing every day for the great importance to know the concentrations of the essential and toxic trace elements, to determine the effects on health and environment. This work show the development of the analytical methods to quantify interest element in different matrices so as Selenium in egg, Se in plasma, arsenic in human hair and multielemental concentrations in sea algae, using the k_0 based method Neutron Activation Analysis. To asses the quality of results we have used reference material such as IAEA 336 Lichen trace elements, IAEA-0392 Algae environmental level, MRC Dolt 3 Dog fish liver. In the case of selenium in egg the standard addition method was used to compare.

1. Introducción

La investigación de elementos traza en materiales biológicos se ha incrementado debido al rol que tienen en la salud y las enfermedades. Los elementos traza como tóxicos alcanzan el cuerpo humano a través de los alimentos, aire ambiental y otras exposiciones accidentales y ocupacionales. La utilidad de los elementos esenciales se debe a que son cofactores en el metabolismo enzimático. Desde el punto de vista de la seguridad en alimentos, es necesario tener información de los niveles de ambos, tóxicos y esenciales, para compararlos con los límites máximos permisibles dentro de los estándares nacionales e internacionales. En este contexto, una técnica moderna como el análisis por activación neutrónica tiene un papel importante en los programas de control y monitoreo ambiental. Desde el punto de vista de salud pública, es importante monitorear periódicamente el contenido de elementos traza en los alimentos, para asegurar el contenido de los elementos traza así como verificar si los elementos tóxicos están presentes en bajas concentraciones, y

que no implique riesgos para la salud humana [1]. En éste trabajo, uno de los elementos que se analiza es el selenio; que en un principio, se creía dañino para la salud pero ahora se conoce que es un elemento esencial para la salud y actúa como un antioxidante bloqueando las moléculas conocidas como radicales libres que dañan al DNA. Actualmente, se conoce que la ingesta de 200 microgramos de selenio previene el cáncer a la próstata, colon y tumores malignos de los pulmones. Por otro lado, la deficiencia de Se en animales está relacionada con la enfermedad degenerativa de los músculos blancos (white muscle disease) mientras que un exceso de Se en la dieta causa el "blind saggars". En los hombres la deficiencia de Se produce cardiomiopatía crónica, aumenta el tamaño del corazón o el músculo lo hace más grueso [2]. Desde hace algunos años, la determinación de niveles traza en cabello humano ha sido importante porque está siendo usado continuamente como

* Correspondencia autor: btorres@ipen.gob.pe

biomonitor de elementos traza esenciales o tóxicos como As, Hg que han sido propuestos para evaluar la exposición medioambiental, estado nutricional y para el diagnóstico de enfermedades. [3].

Desde el punto de vista nutricional, los investigadores están estudiando el valor proteico de muchos materiales biológicos, entre ellos, las algas marinas por su alto valor proteico, comparable con la soya pero de alta digestibilidad, los nutrientes y micro nutrientes contenidos en ellas son ricos en oligoelementos, minerales como el Na, Ca, Mg, Zn, K, P, Fe, Cu, Al, S y son empleados para combatir la anemia [4]. Entre las mujeres pre-menopáusicas japonesas el cáncer a la mama es 3 veces menor porque ingieren dietas con contiene Fucoidal, un éster sulfato polisacárido presente en las paredes celulares de estas plantas que actúa estimulando el sistema inmunológico, ejerciendo una acción antitumoral. Actualmente, se esta haciendo un tratamiento de los principios activos para crear fármacos contra el cáncer [5].

En este trabajo se ha determinado los elementos anteriormente mencionados, utilizando la técnica de activación neutrónica. Simultáneamente, para asegurar los resultados obtenidos se han analizado materiales de referencia de matriz parecida a las muestras y en el caso de Se en huevo, por no tener una muestra de control se ha utilizado el método de adición estándar para comprobar los resultados obtenidos.

2. Análisis de los materiales biológicos

2.1 Toma y preparación de la muestra

a. Muestra de huevo: Las muestras fueron secadas y liofilizadas a 25 °C molidas y homogenizadas, luego se tomó alícuotas para realizar el análisis respectivo.

b. La muestra de plasma liofilizado no tuvo un pretratamiento para el análisis.

c. La muestra de cabello: fue recolectada y lavada de acuerdo con el protocolo recomendado por el OIEA [3]; los filamentos de cabello fueron cortados cerca de la región occipital a una longitud aproximada de 5 cm y guardados dentro de bolsas de polietileno, para ser cortados en pedazos de 2 mm de longitud utilizando tijeras de acero inoxidable y luego lavados en un matraz con EXTRAN neutro, acetona y agua [6] y secado en un papel de filtro a temperatura ambiente.

d. La muestra de algas en polvo fue analizada sin ningún tratamiento.

2.2 Procedimiento analítico

Se pesaron aproximadamente 300 mg de cada muestra biológica por triplicado al igual que los materiales de referencia luego se hicieron pastillas de 13 mm de diámetro y 2 mm de espesor utilizando una prensa hidráulica, las pastillas se pusieron en bolsita de polietileno y luego envueltas en papel de aluminio para codificarlas; de la misma manera, se procedió con los comparadores de sodio y blancos. Para cada material biológico se siguió el siguiente procedimiento:

a. Análisis de Se en muestras de huevo (clara y yema). Se tomaron alícuotas de aproximadamente 300 a 400 mg y se hicieron pastillas utilizando una prensa hidráulica y puestas en bolsitas de polietileno y aluminio previamente codificados para luego ser irradiadas conjuntamente con los comparadores de sodio preparados de la misma forma. Las irradiaciones fueron hechas en el reactor de 10 MW durante 3 h a un flujo de $4 * 10^{13} \text{ n.cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, después de 14 días de decaimiento las muestras y material de referencia fueron medidos en un espectrómetro gamma de alta eficiencia en contacto detector- muestra durante 10000 s y los comparadores de sodio después de 8 días durante 500 s. El tratamiento del espectro se realizó utilizando el Genie 2 K a una energía de 264.7 keV correspondiente al ^{65}Se . El cálculo de la concentración se realizó considerando el factor de dilución por liofilización en un programa elaborado por el laboratorio.

Para asegurar la calidad de los resultados y por no contar con material de referencia certificado para dicha matriz se procedió a realizar la determinación de Se por el método de adición estándar que consiste en: A una sub muestra de la muestra analizada por activación neutrónica se le agregó una solución estándar con concentraciones conocidas de Se, en éste caso 100 y 200 μg y mediante una curva de calibración se obtiene la concentración de la muestra extrapolando hacia el eje de las X y por intercepto con ella se obtiene la concentración de Se en la muestra desconocida. [7].

b. Análisis de Se en muestras de plasma liofilizado: Se tomaron alícuotas de aproximadamente 200 a 300 mg, se hicieron

pastillas utilizando una prensa hidráulica y se colocaron en bolsitas de polietileno y aluminio previamente codificados, para luego ser irradiadas conjuntamente con comparadores de sodio, material de referencia y blancos preparados de la misma forma. Las irradiaciones fueron hechas en el reactor de 10 MW durante 5 h a un flujo de $4 \times 10^{13} \text{ n.cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Después de 10 días de decaimiento las muestras y material de referencia fueron medidos en un espectrómetro gamma de alta eficiencia, a una distancia detector muestra de 12.5 mm, durante 10000 s y los comparadores de sodio después de 8 días durante 500 s. El tratamiento del espectro se realizó utilizando el programa Genie 2 K de CANBERRA, para identificar y evaluar el ^{75}Se a una energía de 264.7 keV. El cálculo de la concentración se realizó con un programa elaborado en el laboratorio.

c. Análisis de As, Hg, Sb, Br y Na en cabello: Se pesaron 250 mg aproximadamente de cabello previamente preparado en un porta muestra de polietileno y sellado herméticamente al calor al igual que la muestra de referencia, comparadores de sodio y blancos, colocados dentro de un vial de irradiación, poniendo alternadamente muestra y comparador, para ser enviado al núcleo del reactor mediante un sistema neumático a 320 kW y a un flujo de $5 \times 10^{11} \text{ n.cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e irradiado durante 5000 s. Después de un tiempo de decaimiento de 6 días las muestras se midieron en contacto detector muestra durante 10000 s y los comparadores de sodio durante 600 s. Luego fueron procesados los espectros mediante el programa Genie 2 K, para evaluar e identificar siguientes radioisótopos: ^{76}As a 559.1 keV; Hg a 279 keV; ^{122}Sb a 564 keV; ^{82}Br a 776.5 y ^{24}Na a 1368.5 keV. La concentración de los elementos se calculó mediante un programa elaborado en el laboratorio.

d. Determinación multielemental en muestras de alga en polvo: Se pesaron aproximadamente 500 a 700 mg de alga en polvo dentro de un porta muestras de polietileno sellado herméticamente al calor al igual que la muestra de referencia, comparadores de sodio y blancos, colocados dentro de un vial de irradiación, poniendo alternadamente muestra y comparador, para ser irradiado los elementos de vida media corta en el núcleo del reactor a 320 kW y a un

flujo de $5 \times 10^{11} \text{ n.cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ mediante un sistema neumático para ser irradiados durante 600 s y medidos después de 400s a 217 mm detector muestra durante 600s. Posteriormente, los espectros fueron procesados mediante el programa Genie 2 K, para evaluar e identificar los siguientes radioisótopos: ^{28}Al a 1779 keV; ^{49}Ca a 3084 keV; Cl a 2167 keV; ^{66}Cu a 1039 keV; ^{128}I a 443 keV; ^{42}K a 1524 keV; ^{27}Mg a 1014 keV; ^{56}Mn a 1811 keV; ^{24}Na a 1368 keV y ^{52}V a 1431 keV. La concentración de los elementos se calculó mediante un software elaborado en el laboratorio.

Irradiación de elementos de vida media y larga: Las muestras, materiales de referencia, comparadores y blancos puestos dentro de un vial de irradiación para ser irradiados durante 6 h en el reactor nuclear a un flujo de $4 \times 10^{13} \text{ n.cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, después de un decaimiento de 14 d fueron medidos en el espectrómetro gamma durante 10000 s a 12.5 mm detector-muestra y luego los comparadores fueron medidos después de 10 h durante 2000s y evaluados los espectros mediante el programa Genie 2 K para evaluar e identificar los siguientes radionucleidos: ^{56}As a 559 keV; ^{131}Ba a 496 keV; ^{82}Br a 776 keV; ^{115}Cd a 528 keV; ^{141}Ce a 145 keV; ^{60}Co a 1332.5 keV; ^{51}Cr a 320 keV; ^{134}Cs a 796 keV; ^{59}Fe a 1099 keV; ^{181}Hf a 482 keV; y ^{140}La a 1596 keV. La concentración de los elementos se calculó mediante un programa elaborado en el laboratorio.

3. Resultados

Los resultados obtenidos en el presente estudio se presentan en las tablas 1 a 5. La validación de los métodos utilizados se evaluó usando los materiales de referencia IAEA 336 Lichen trace elements, DOLT 3 Dog fish liver, IAEA A392 Algae environmental level. En el caso de Se en huevo se utilizó el método de adición estándar para comparar los resultados con los obtenidos por activación neutrónica. Todos los resultados concuerdan con los valores certificados.

Tabla 1: Determinación de Se en muestra de huevo por AAN y Adición estándar. Resultados en mg/kg.

Muestra	Resultado QUIM	MRC
X AAN	0.42 +/- 0.06	
Ad. Std	0.0178	0.0184

Figura 1: Determinación de Se en clara y yema de huevo por el método de Adición Estándar.

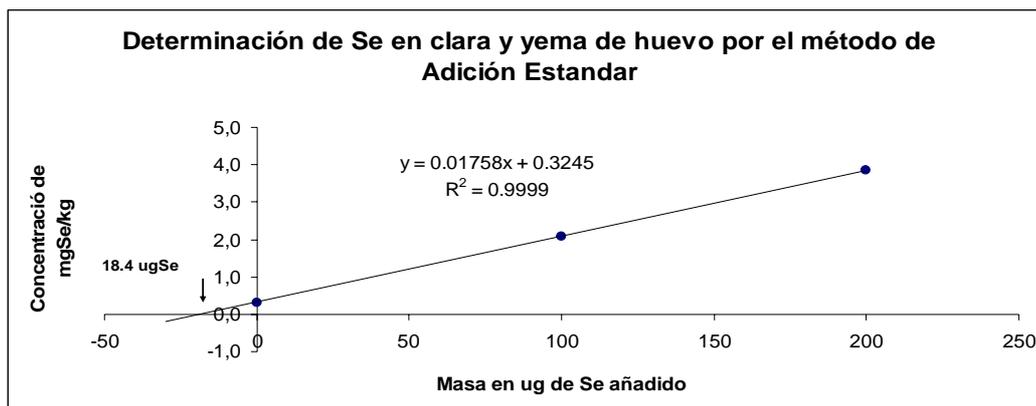


Tabla 2: Determinación de Se en muestra de plasma liofilizado. Resultados en mg/kg.

Muestra	Resultado QUIM	MRC
X AAN	3.30 +/- 0.25	
DOLT 3	7.22 +/- 0.03	7.06 +/- 0.48

Tabla 3: Determinación de As, Br, Hg, Na, Sb en muestra de cabello por AAN. Resultados en mg/kg.

Elemento	Resultado +/- I.C	L.D
As	ND	0.05
Br	2.88 +/- 0.10	
Hg	1.41 +/- 0.04	
Na	9.96 +/- 0.67	
Sb	0.032 +/- 0.007	

Tabla 4: Determinación de As, Br, Na, Sb en muestra de MRC-IAEA Lichen 336 Lichen trace element. Resultados en mg/kg.

Elemento	QUIM +/- I.C	MRC 392 +/- I.C
As	0.61 +/- 0.07	0.63 +/- 0.16
Br	11.7 +/- 0.5	12.9 +/- 3.4
Na	315.6 +/- 3.3	320 +/- 80
Sb	0.060 +/- 0.007	0.073 +/- 0.020

Tabla 5: Determinación multielemental en Mr IAEA A392 IAEA A392 A Algae environmental level Resultados en mg/kg.

Elemento	Resultados	Valores certificados
Al	39.28 +/- 0.49	37.26 +/- 3.99
Ca	2760 +/- 280	2698 +/- 13
Cl	804 +/- 34	815 +/- 62
Cu	20.64 +/- 6.49	22.38 +/- 1.41
K	8181 +/- 970	9112 +/- 188
Mn	68.47 +/- 7.48	66.39 +/- 1.49
Mg	2520 +/- 31	2314 +/- 87
Na	690 +/- 53	661 +/- 24
V	1.36 +/- 0.19	1.13 +/- 0.13

Tabla 6: Determinación multielemental en la muestra de algas. Resultados en mg/kg.

Elemento	Unidad	Resultados +/- L.C
Al	mg/kg	2460 ± 220
As	µg/kg	6.20 ± 0.70
Ba	mg/kg	30.44 ± 1.20
Br	mg/kg	358 ± 10
Ca	mg/kg	8800 ± 2100
Cd	µg/kg	3.40 ± 0.10
Ce	mg/kg	2.10 ± 0.10
Cl	mg/kg	14160 ± 450
Co	mg/kg	0.751 ± 0.048
Cr	mg/kg	2.50 ± 0.20
Cs	mg/kg	0.080 ± 0.010
Cu	mg/kg	2.80 ± 0.32
Fe	mg/kg	1060 ± 140
I	mg/kg	98 ± 14
K	mg/kg	20490 ± 3300
Mg	mg/kg	22950 ± 360
Mn	mg/kg	47.0 ± 3.6
Na	mg/kg	11750 ± 320
Pb	µg/kg	3.300 ± 0.048
Rb	mg/kg	11.66 ± 0.86
Sb	mg/kg	ND 0.1
Sc	mg/kg	0.303 ± 0.037
Se	mg/kg	0.230 ± 0.021
Sr	mg/kg	87.0 ± 13.0
Zn	mg/kg	20.00 ± 2.10

4. Conclusiones

Se ha establecido métodos analíticos adecuados para la determinación de elementos en materiales biológicos.

Como se muestra en los resultados obtenidos la técnica de activación neutrónica juega un papel muy importante en diferentes campos de la investigación como se informa aquí relacionado con los materiales biológicos. Su

importancia radica en su alto grado de exactitud y en el mismo proceso analítico: Poco manipuleo de las muestras, alta sensibilidad, consiguiendo resultados por debajo de los máximos permisibles, cantidad pequeña de muestra utilizada. En experimentos de los investigadores la técnica ayuda esencialmente para el control y prevención de la salud; monitoreo, control y regulación del medioambiente; nutrición, caracterización.

5. Bibliografía

[1] Parr RM. Current role of NAA in biological and health related environmental studies as exemplified by program of the IAEA. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 2001; 244(1).

[2] Katz SA, Chatt A. The use of hair as a biopsy for trace elements in the human body. NAHRES-22. Vienna: Austria; 1994.

[3] IAEA. Application of hair As an indicator for trace element exposure in man. A. Review NAHRES-22. Vienna: Austria; 1994.

[4] Valentín Arteaga. Las algas marinas. *Revista Interforum* [serie en Internet] 2001. [citado el 27 May 2007]. Disponible en: www.revistainterforum.com/español/articulo/0827761/Naturalmente.htm.

[5] Grupo Zeltia. Aislamiento de nuevas entidades químicas (NCE) de origen marino con utilidad terapéuticas *Materia progress*. [serie en Internet]. Disponible en: <http://fadweb.org/premsamater/wp-content/uploads/2008/02/01algszeltia.pdf>

[6] Vasconcellos MBA, Bode P, G. Paletti G, Catharino GM, Ammerlaan AK, Saiki M, Fávoro DLT, Byrne AR, Baruzzi R, Rodríguez DA. *Journal of Radioanalytical Chemistry*. 2000; 244(1): 81-85.

[7] Montoya E, Mendoza P, Torres B. Implementation and Evaluation of Limited versión of the INAA-k-Sub-Cero Standardization Method. *Proceedings of a 2nd Interantional k₀ Users Workshop*. Ljubljana: Slovenia; 1996. p. 148-151.

[8] Harris Daniel. *Quantitative analysis 6th Edition* New York W.H. Freeman; 2003.