

## SATURNISMO

**Estudio del marcador Plumbemia en una muestra  
de la población infantil asturiana**

**Optimización de la determinación analítica de  
la Plumburia y estudio de la delta-aminolevulínico-deshidrasa  
como indicador de su efecto**

*Autora: CARMEN CORRAL ZAPICO*

Para el desarrollo de las funciones vitales en el organismo humano, es condición imprescindible la presencia de ciertos elementos metálicos, pero la creciente actividad industrial ha hecho inevitable un aumento considerable de los mismos en el bioentorno, llegando a generar, desde el punto de vista toxicológico, efectos nocivos de incalculables consecuencias, tanto a nivel laboral como en la población no ocupacional.

Nuestro interés se centra en el estudio del Plomo, del que haremos un breve recorrido histórico en cuanto a su utilización.

El PLOMO es uno de los siete metales de la antigüedad. Y ya en Números XXXI Moisés se dirige a los israelitas recordándoles la purificación del oro, la plata, el hierro, zinc, bronce y del PLOMO.

Más recientemente fueron los romanos los que desarrollaron una extraordinaria tecnología con este metal, en sistemas de conducción de aguas, utensilios de cocina y como ingrediente esencial en los vinos fermentados, calculándose hasta en 1.000 mg/litro, concentración más que suficiente para inducir «intoxicación crónica» a copa diaria.

A la intoxicación por plomo no se la denomina «SATURNISMO» hasta la Edad Media, en razón al nombre de Saturno que los alquimistas daban a este metal.

Cuando en el siglo XV se inventó el tipo de imprenta móvil, fue el plomo la sustancia idónea en aleación con el Zn y Sb, para fundiciones, puesto que realiza una impresión de buena calidad y permite ser refundido en caso de rotura. La aleación con antimonio constituye en la actualidad el principal metal-tipo para la fundición de imprenta.

En el siglo XVIII se utilizan serpentines plomados en la destilación de ron, por lo que es instituida la pena de muerte para quienes añadan acetato de plomo como conservante a los vinos.

Desde la antigüedad ha sido periódicamente redescubierto el peligro de envenamiento por el uso de recipientes esmaltados, pero es en el siglo XIX cuando se toma conciencia social del estudio del Plomo. Y en 1839, Tanquerel des Planches publica en París (1) un trabajo sobre 1.200 casos de intoxicación con plomo, tan completo que poco han podido añadir las investigaciones recientes a sus conocimientos, en cuanto a síntomas y signos de la enfermedad, a la vez que escribe respecto a la absorción de plomo:

«Todas las características de los efectos primarios del plumbismo pueden observarse en seguida en los trabajadores que permanecen habitualmente en una atmósfera de polvo y humos de Pb. Ninguno de los efectos primarios se halla en los trabajadores que manejan plomo en su estado fijo.»


Posteriormente, en 1878, mediante la Ley de Consolidación, se prohibió que los niños y jóvenes trabajasen en la manufactura del plomo blanco, apareciendo en 1883 la primera Ley Parlamentaria dirigida contra la enfermedad ocupacional específica de prevención de intoxicación por plomo, la «Ley de las Fábricas».

Un problema reciente y realmente serio es el riesgo de intoxicación por ingestión de pintura de plomo en los niños, sobre todo en la edad de dentición. Como dato a destacar, en la ciudad de Baltimore (EE.UU.), entre 1931 y 1959 (3) se ha registrado el fallecimiento de 123 niños por este tipo de intoxicación, lo que llevó a promulgar una ley especial en la ciudad, que exigía para toda pintura que contuviese más del 1% de Pb, la inscripción de «PELIGRO», acompañada del texto:

«Contiene plomo tóxico si se ingiere. No aplicarlo a superficies interiores de las viviendas o en lugares dedicados al cuidado de niños, o a marcos de ventanas, juguetes u otros muebles.»

Se exponen, a continuación, de forma esquemática, **las propiedades físico-químicas del Plomo (Pb):**

#### PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS DEL PLOMO (3)

- Grupo IV-B del Sistema Periódico
- Valencias + 2 y + 4
- Peso molecular: 207,2
- Punto de fusión: 327,5° C
- Punto de ebullición: 1.750° C
- Sólido gris, blando y pesado
- Reacciona con  Acidos inorgánicos y orgánicos
- Alcalis

---

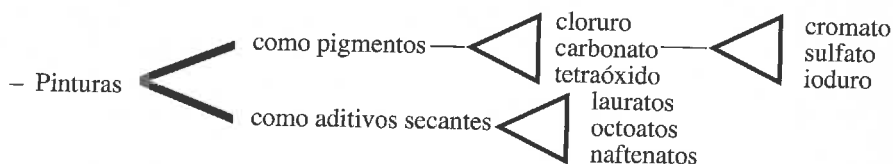
#### PRINCIPAL MINERAL DE PLOMO

La galena (PbS)  
(90% de Pb)

---

### COMPUESTOS DEL PLOMO (3)

Todos con proyección en las industrias de:



- **Fabricación de vidrios:** monóxido.
- **Acumuladores eléctricos:** dióxido.
- **Tintorerías y fabricación de fósforos:** nitrato.
- **Fotografía:** ioduro y nitrato.
- **Explosivos:** azida.
- **Insecticida:** arseniato.
- **Como estabilizante en materiales de plástico:** fosfato y estearatos.
- **Como antidetonantes en los carburantes de motores de explosión:** tetrametilo y tetraetilo.

---

Desde el punto de vista del **metabolismo** del plomo, hemos de considerar (fig. 1):

- **ABSORCION** de los derivados inorgánicos, con sus tres vías de entrada.
- **TRANSPORTE, DEPOSITO Y FIJACION.**
- **EXCRECION.**

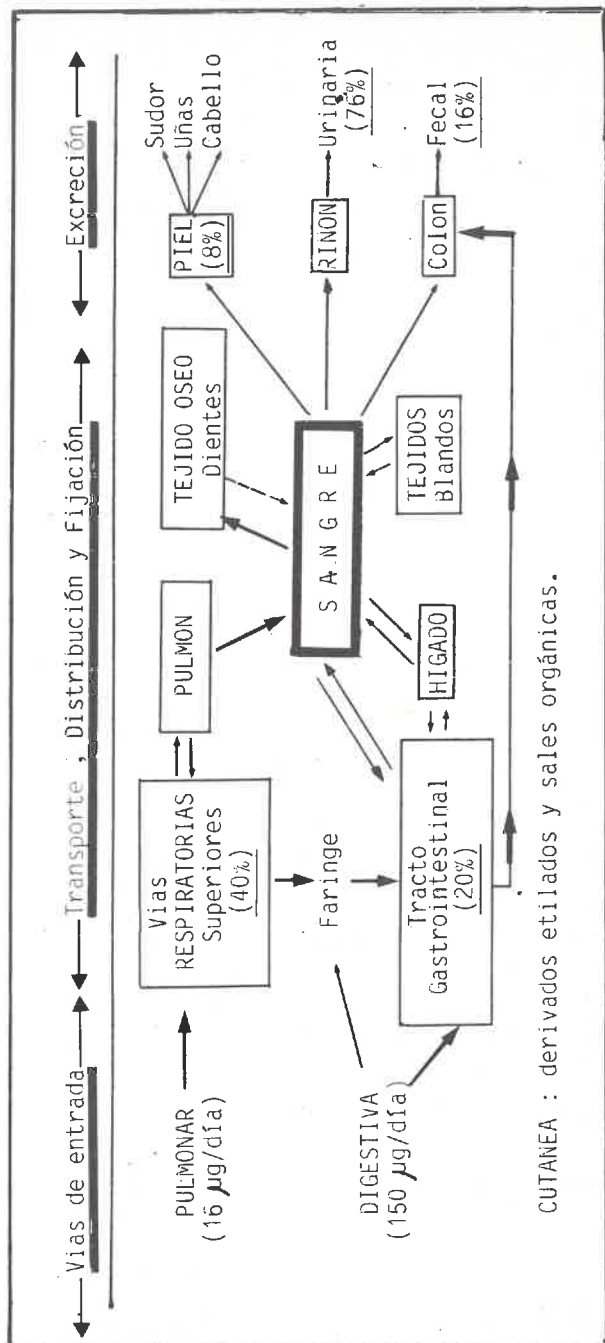
**La vía pulmonar**, de gran interés desde el punto de vista **laboral**. Considerada como la más peligrosa, puesto que el plomo inhalado entra rápidamente en contacto con la circulación, a través del pulmón.

Según la bibliografía consultada, Kehoe (4) y Nozaki (5), el organismo humano retiene sobre un 40% del plomo inhalado en función **del tamaño de partícula:** polvos, humos, nieblas, gases; y de la **velocidad de ventilación del individuo**. Otra parte se elimina a través del tracto gastro-intestinal.

Para la **población en general**, la principal vía de entrada del plomo es la **DIGESTIVA**, que supone unos 150  $\mu\text{g}/\text{día}$ . Del total ingerido **se absorbe** un 20% aproximadamente, para lo cual ha de transformarse previamente en sal soluble por el jugo gástrico; y el 80% restante no es asimilado, excretándose por las heces.

Por **vía cutánea** únicamente se absorben las sales orgánicas y los derivados etilados que pueden, incluso, atravesar la piel intacta.

**MODELO METABOLICO PARA EL PLOMO  
EN EL ORGANISMO HUMANO**



(fig. 1)

Independientemente de la vía de entrada, el plomo absorbido se incorpora a la sangre, donde se fija en un 95% a los hematíes y el resto a las proteínas plasmáticas.

**EL TRANSPORTE SANGUINEO** se efectúa en estado de fosfato de plomo coloidal, ligado a las albúminas y globulinas principalmente, para posteriormente depositarse en dos grandes compartimientos:

- **Tejido óseo y dientes**, de renovación lenta, y
- **La sangre y los tejidos blandos** (pulmones, hígado, riñones, cerebro, médula ósea), de renovación más rápida.

Entre ambos compartimientos existe un intercambio constante de plomo.

**EL BALANCE ABSORCION-EXCRECION** es el que determina la acumulación de plomo en el organismo. Siendo las principales vías de excreción en el ser humano:

- **LA RENAL** por la que se elimina hasta un 76% del plomo absorbido, en función del pH y volumen urinarios.
- **LA FECAL**, por la que se excreta el 16% del Pb absorbido.
- El 8% restante es excretado por **VIA CUTANEA**, a través del sudor, uñas, cabellos...

En ocasiones, también se considera la concentración de plomo **en la leche materna**, que puede llegar hasta 12  $\mu\text{g/litro}$ .

El plomo, además de no ser elemento necesario para las funciones metabólicas de nuestro organismo, llega a causar trastornos considerables a nivel del **METABOLISMO CELULAR**, tales como la inhibición de la actividad enzimática, de enzimas que poseen grupos sulfhidrúlicos (-SH) para su actividad. Así, en la **BIOSINTESIS DEL GRUPO HEMO** (fig. 2), inhibe:

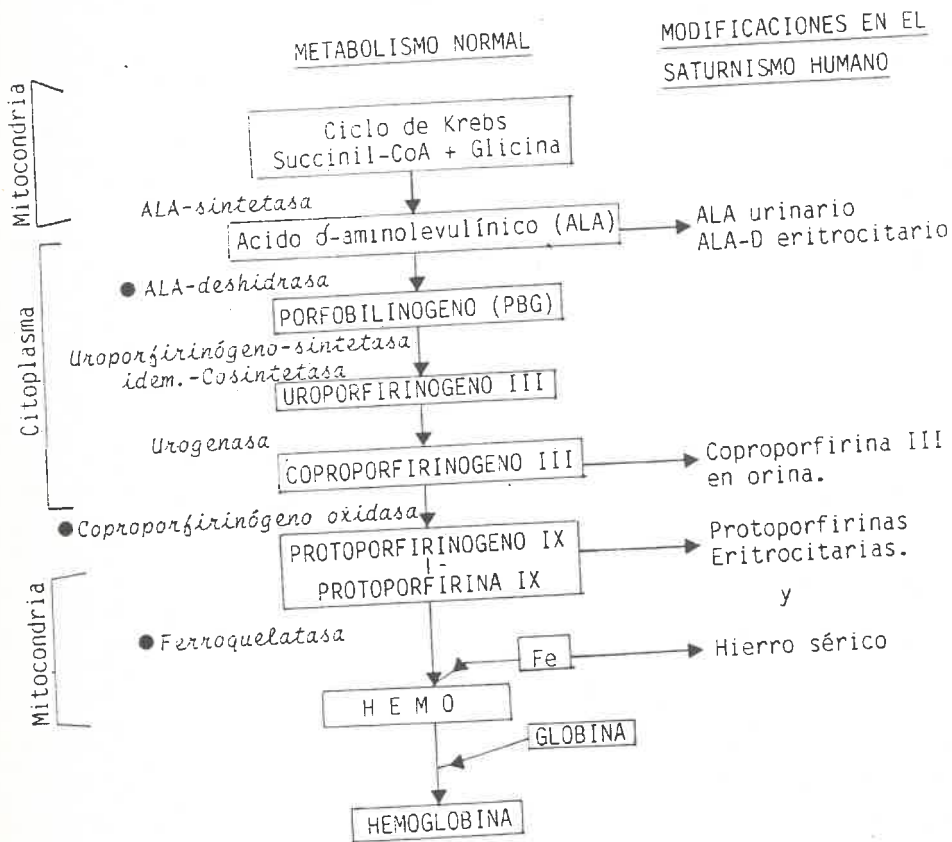
- La actividad de la delta-amino-levulínico deshidrasa, con una eliminación de ácido delta-amino-levulínico por orina, en cantidades anormalmente elevadas.

- A la coproporfirinogénolasa, que se traduce en un aumento de coproporfirina III en orina.

- Y a la ferroquelatasa, con elevación de las tasas de Protoporfirinas eritrocitarias y de hierro sérico.

La disminución de la síntesis de grupos hemo, causa un acortamiento en la vida media de los eritrocitos, y un descenso en el n.º de glóbulos rojos y de la cantidad de hemoglobina por célula. Y como consecuencia de ello, los tejidos que producen células sanguíneas, aumentan su actividad, apareciendo en la sangre glóbulos rojos inmaduros, reticulocitos y células granulosas basófilas, característica esta última de la sangre de los intoxicados por el plomo.

## INTERFERENCIAS DEL Pb EN LA BIOSINTESIS DEL GRUPO HEMO



(●) Etapas enzimáticas inhibidas por el plomo.

(fig. 2)

También el **Pb** produce **efectos tóxicos en los riñones**, por acumulo del metal en los núcleos de las células que rodean los túbulos renales. Las células renales atacadas por el Pb consumen más oxígeno que las normales, lo cual indica que el metal afecta su metabolismo energético, conduciendo al llamado «Síndrome de Fanconi». Este síndrome origina el que las células que rodean los túbulos renales dejen de absorber aminoácidos, glucosa y fosfatos, eliminándose estas sustancias por la orina.

Aunque, acerca de los efectos nocivos del plomo sobre el Sistema Nervioso Central, se tiene menor información a nivel metabólico, sí se sabe de dos mecanismos implicados en la encefalopatía: **Edema y daños en las células nerviosas**.

Por efectos del Pb, las paredes de los vasos sanguíneos resultan alteradas de tal modo que se hacen mucho más permeables y las fugas de líquido causan el edema (hinchazón del tejido cerebral). Y por estar el cerebro en la cavidad craneana rígida, un hinchazón considerable puede destruir los tejidos cerebrales.

Los trastornos que se han descrito hasta aquí son consecuencia del **envenenamiento AGUDO** por plomo, y cuando la **intoxicación es CRÓNICA**, puede ocasionar nefritis crónica (enfermedad caracterizada por el endurecimiento y encogimiento de los tejidos renales) y también afectar al sistema nervioso periférico, fundamentalmente a los nervios de las extremidades (7).

**Nuestro interés en el tema se inicia en tres hechos concretos:**

– Las estadísticas oficiales de Siniestrabilidad Laboral de España, publicadas por el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, de las que se puede deducir que, en los últimos siete años, aproximadamente, 1 de cada 6 enfermedades profesionales están originadas por el plomo o sus compuestos:

#### Enfermedades Profesionales

Año	Totales	Plomo y sus compuestos	%
1978	3.859	844	22
1979	3.665	688	19
1980	3.419	513	15
1981	3.161	376	12
1982	2.933	309	11
1983	2.712	248	9
1984	2.582	210	8

– La falta de datos fiables sobre la impregnación de plomo en la población española, fundamentalmente la infantil, en la que por su etapa de desarrollo los trastornos toxicológicos pueden tener efectos mucho más graves.

– La carencia de una metodología unificada y dirigida a diferenciar lo **normal** de lo **patológico**.



Para estudiar el conjunto de alteraciones causadas por el plomo, en función de emitir un diagnóstico, es evidente la importancia que para el toxicólogo tiene disponer de **INDICADORES** que de una manera fiable, sensible y lo más precozmente posible, alerten de la presencia del metal. Entre los varios que hay nos referiremos únicamente a los parámetros que son objeto de nuestro estudio:

– **PLUMBEMIA** (concentración de plomo en sangre) como indicador de absorción.

– **PLUMBURIA espontánea** (concentración de plomo en orina), como indicador de excreción, referida normalmente a 24 horas.

– **GRADO DE INHIBICION DE LA ACTIVIDAD DE LA delta-AMINO-LEVULINICO-DESHIDRASA en la sangre**, como indicador de efecto. Esta última estrechamente correlacionada con la plumbemia.

El tratamiento del envenenamiento por Pb consiste en disminuir rápidamente la concentración del metal en sangre, hasta niveles normales, mediante los agentes quelantes: AEDT, BAL o d-penicilamina, que son moléculas que enlazan átomos de Pb formando compuestos solubles, que son eliminados a través del hígado y riñones.

#### **Determinación de Plumbemias por espectrofotometría de absorción atómica. Método Delves-Cup.**

**LA PLUMBEMIA** (concentración de plomo en sangre) no refleja la cantidad de Pb acumulado en el organismo, sin embargo, se considera como el **indicador más idóneo** de la exposición al tóxico. Así, en el caso de un trabajador expuesto, sobre todo en las primeras exposiciones, la plumbemia alcanza rápidamente un valor máximo, mientras que la cantidad de plomo almacenado en el organismo sigue creciendo.

Con fecha 23 de agosto de 1982, el Boletín Oficial de las Comunidades Europeas publica la directriz para la protección de los trabajadores que operen con Pb y sus compuestos, considerando como niveles admisibles:

40  $\mu\text{g}/100$  ml. en sangre

Ley de obligado cumplimiento a partir del 1 de enero de 1986.

Más recientemente, el B.O.E. de 24 de abril de 1986, publica la Reglamentación Española para la prevención de riesgos y protección de la salud de los trabajadores, por la presencia de plomo metálico y sus compuestos iónicos, en el ambiente de trabajo. Contemplando la figura del «Trabajador expuesto» (Art. 2.º):

– **En relación con el nivel de plumbemia:** aquél en el que la concentración de plomo en sangre sea  $\geq 40 \mu\text{g}/100$  ml. de sangre (siendo de  $30 \mu\text{g}/100$  ml. para mujeres en período fértil).

– Al mismo tiempo, obliga a las empresas a establecer por sí mismas o a través de los Institutos Nacionales de Seguridad e Higiene en el Trabajo, el establecimiento de sistemas de control médico-preventivos periódicos, para todos los trabajadores expuestos.

– Así como **la importancia de los métodos de: MUESTREO Y ANALISIS** empleados en la valoración del **riesgo** de exposición al plomo.



Entre las numerosas técnicas utilizadas para la determinación del plomo en sangre, los métodos **espectrofotométricos de Absorción Atómica**, han tenido y tienen gran aceptación. En ellos, la muestra a analizar se transforma en vapor atómico, en el que la mayor parte de los átomos están en su estado fundamental o no excitados, por lo que sólo puede absorber radiaciones de un número limitado de longitudes de onda. Es la técnica más utilizada en la detección de trazas de metales en sustancias biológicas.

Hemos utilizado el SISTEMA DE MICROMUESTRA DE DELVES-CUP (8), que el propio Delves ha empleado en la determinación de Plomo en sangre, pudiendo alcanzarse una desviación standard de  $\pm 5\%$ , para concentraciones de 30-50  $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ . de sangre.

### Proceso metodológico

La sangre recién extraída se recoge sobre tubos que contengan anticoagulantes, en nuestro caso ha sido la sal sódica del ácido etileno-diamino-tetracético (AEDT), se agita suavemente y así tratada puede ser conservada a  $4^\circ\text{C}$  hasta el momento de ser analizada.

Se utiliza el **método de adiciones**, con el objeto de evitar efectos matriciales. Para ello, se preparan **blanco y patrones** a partir de una sangre de plumbemia conocida,  $\leq 25\ \mu\text{g}/100\text{ ml}$ ., previamente valorada por el mismo método.

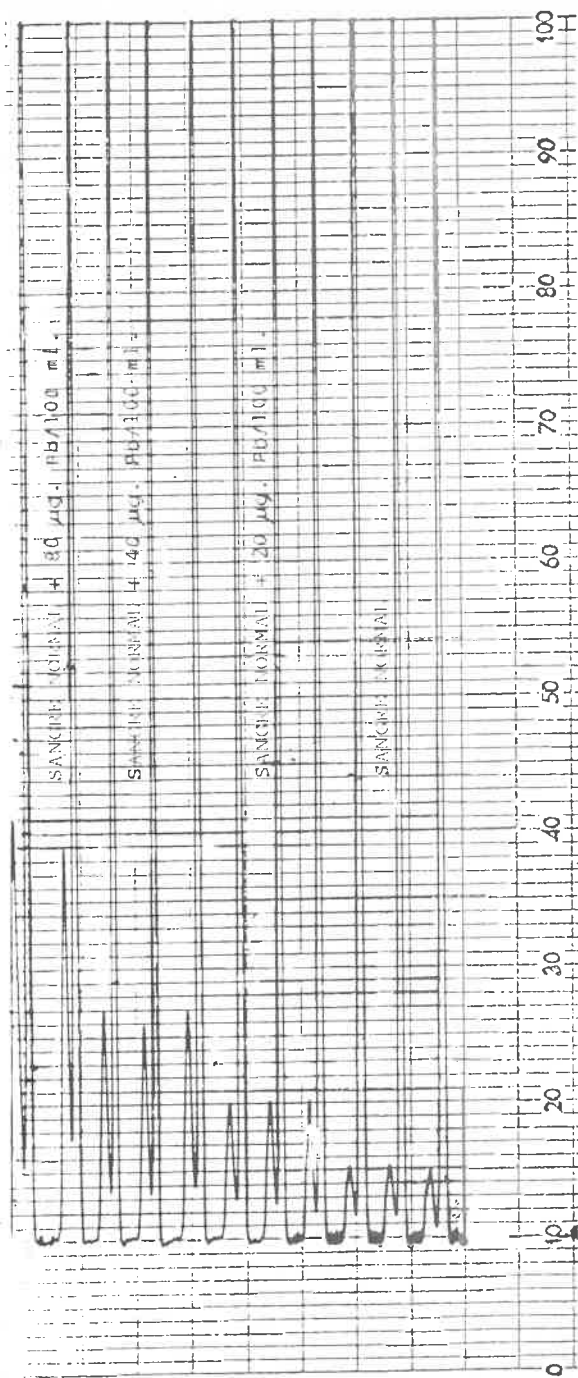
### PREPARACION DE PATRONES Y MUESTRAS

	Patrones	Blanco	Muestra
Sangre (PbS conocida)	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	
Disolución acuosa de Pb	p.p.m 0,2    0,4    0,8 10 $\mu\text{l}$ 10 $\mu\text{l}$ 10 $\mu\text{l}$		
Agua destilada		10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$
Sangre-problema			10 $\mu\text{l}$

Blanco, patrones y problemas, por triplicado, se llevan a sequedad en estufa a  $150^\circ\text{C}$  durante 30 segundos; pasados éstos, se adicionan rápidamente 20  $\mu\text{l}$  de peróxido de hidrógeno al 30% para destruir parte de la materia orgánica; y nuevamente a sequedad a igual temperatura, 3 minutos. Finalmente, se trasladan a la llama aire-acetileno del espectrofotómetro de absorción atómica con el sistema de micromuestra Delves, registrando la señal de absorbancia a 283,3 nm. Con los resultados de absorbancia obtenidos del blanco y patrones, se traza la recta de calibrado, sobre la que se cuantifica la concentración de plomo de cada sangre-problema.

Para cada análisis individual se obtienen dos picos perfectamente resueltos. El primero generado por los productos de combustión de la muestra parcialmente oxidada, y el segundo corresponde al plomo (fig. 3).

**GRAFICA TIPICA DE ADICIONES DE PLOMO  
A UNA SANGRE-PATRON**



(fig. 3)

Dado el gran número de muestras que habitualmente se analizan, **un factor limitante** al método de Delves es su **carestía**, puesto que los microcrisoles por su deterioro y envejecimiento, tienen una vida media de 50 a 60 usos (9), (10) y (11). A esto debe añadirse el precio de 1.500 pesetas/unidad para el caso de los comercializados por Perkin-Elmer. Pero en 1983, el Gabinete Técnico Provincial de Santander nos suministra unos nuevos al precio de 75 pesetas/unidad.

Ante tan evidente diferencia económica, se ha llevado a efecto un estudio comparativo de ambos tipos de microcrisoles en la realización del método instrumental.

Para ello se han elegido **al azar 50 sangres** de trabajadores expuestos y no expuestos de empresas asturianas, que periódicamente asisten a reconocimientos médicos en el G.T.P. de Oviedo del I.N.S.H.T. En la figura 4, cada punto representa las plumbemias obtenidas para cada individuo, utilizando los microcrisoles de fabricación artesanal (X) frente a los comercializados por Perkin-Elmer (Y). De las rectas de regresión y del coeficiente de correlación lineal de Pearson ( $r = + 0,95$ ), se deduce una intensa dependencia directa entre ambos.

Puesto que los datos de X e Y **no son independientes**, para estudiar sobre una misma sangre si existe o no diferencia significativa entre las concentraciones de plomo en sangre encontradas, según se utilice uno u otro tipo de microcrisol, hemos aplicado **el método de significación de la diferencia de medias de muestras pequeñas relacionadas**, considerando para ello una tercera variable  $d = X - Y$ .

Verificadas las hipótesis de:

- **Aleatoriedad**, admitida al nivel de significación 0,05 (recurriendo al test de correlación serial).

- **Normalidad**, admitida al nivel de significación 0,01 (aplicando el test de Kolmogorov-Smirnov y las tablas de Lilliefors).

A continuación se procedió al **contraste de nulidad de la media de la variable «d»**, que nos hace posible aceptar la nulidad al nivel 0,05.

Por ello, se concluye que **la diferencia entre ambas variables X e Y no es significativa**, por lo que se aprueba el uso indistinto de los microcrisoles estudiados en nuestras condiciones experimentales.

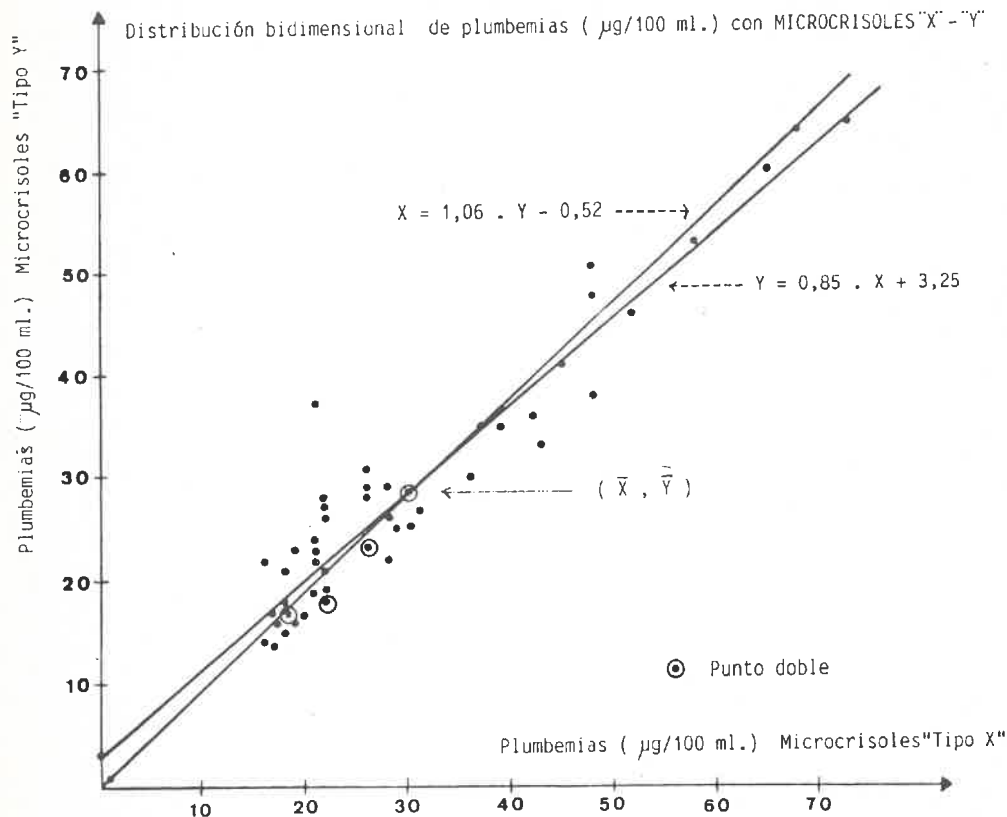
Quizá la mayor dificultad en el estudio de las **intoxicaciones saturninas** radique en la correcta determinación de la plumbemia, ya que resultados erróneos pueden conducir a tratamientos preventivos innecesarios o a una desatención del riesgo inminente.

Ultimamente, han sido numerosos los estudios realizados comparativamente entre laboratorios, tanto a niveles nacionales, como internacionales, y que han puesto de manifiesto los resultados **tan dispersos** que pueden obtenerse de una misma sangre.

Individualmente hemos participado a nivel nacional en dos programas de control de calidad: el primero, realizado únicamente en los Gabinetes Técnicos Provinciales del Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo y el segundo (PICC-Pb.S) abierto a cualquier otro laboratorio que practicase este tipo de análisis.

## RECTAS DE REGRESION

(fig. 4)



### CONTROL DE CALIDAD DE PLOMO EN SANGRE

#### G.T.P. del I.N.S.H.T.

- 11 laboratorios
- Enero-82 a fin-84
- 97 muestras
- 10 Delves (Oviedo)
- 1 Cámara grafito

#### PICC - Plomo en sangre

- Hasta 36 laboratorios
- Enero-85 a julio-86
- 57 muestras
  - Mayoritariamente Delves (Oviedo)
  - Cámara grafito
  - A.A. con extracción APDC
  - 1 electroquímico-A.S.V.

Estudiando conjuntamente el total de muestras analizadas en los dos programas de control de calidad, se llega a que el 70% de nuestros datos pertenecen al intervalo  $\bar{X} \pm \sigma$ , llegando a ser del 100% cuando los límites de aceptación son de  $\bar{X} \pm 2 \sigma$ .

Estudios estadísticos más amplios sobre la base de datos suministrados por todos los participantes nos permitieron admitir la distribución  $\chi^2$  de Pearson como muy adecuada, concluyendo que solamente en ocasiones aisladas (un 4,5%) nuestros resultados fueron algo extremos en comparación con los restantes laboratorios. Por ello, se estima haber demostrado a nivel individual una aceptable calidad en este tipo de análisis.

Anteriormente ya se ha demostrado que la intoxicación saturnina más habitual en la población no ocupacional era la debida a la penetración del plomo por la vía digestiva.

● La mayor parte de los envenenamientos de los últimos años han ocurrido en **niños de 1 a 5 años de edad**, por **ingestión directa**, contribuyendo a ello:

- el polvo callejero
- el hábito de lamer
- chuparse los dedos con las manos sucias
- masticar, e incluso comer, objetos extraños, etc.

● **La absorción**, tanto en **niños** como en **lactantes**, puede llegar hasta un **50% del plomo ingerido**, acrecentándose con:

- Los estados **carenciales de Fe y Ca**, tan comunes en esta edad.
- Los **preparados vitamínicos**, que contengan Vit. D, pues favorece la absorción a nivel de la mucosa intestinal (12) y (13).

– A esto hay que añadir el mayor **RIESGO de acumulación DE PLOMO** en sus tejidos, relacionado con su pleno desarrollo.

Un solo ataque de encefalopatía puede causar un grave retraso mental, y si esto es repetitivo, los daños cerebrales pueden hacerse irreversibles. Como consecuencia, la protección contra las lesiones del sistema nervioso central, debidas a la exposición al plomo, han de mantenerse ya en el propio embrión en desarrollo, pues la sangre placentaria tiene una concentración de plomo proporcional a la de la madre.

En aquellos países en que se ha investigado **la absorción inadecuada de plomo en la población infantil**, los resultados obtenidos han causado alarma y preocupación por los efectos **neurotoxicológicos y psicointelectuales**.

N.º niños intoxicados por plomo	Plumbemias	Investigación
400.000	$\geq 40 \mu\text{g}/100 \text{ ml.}$	(14) Dpto. Salud y Educ. USA-1971
675.000	$> 30 \mu\text{g}/100 \text{ ml.}$	(15) C.D.C. 1978
1 de cada 25 niños	$> 30 \mu\text{g}/100 \text{ ml.}$	(16) NHANES-II 1976-80
36%	$> 30 \mu\text{g}/100 \text{ ml.}$	
11%	$> 80 \mu\text{g}/100 \text{ ml.}$	(17) Al Jahra (Kuwait) 1985

---

**Términos considerados por C.D.C. en 1985 respecto a la intoxicación por plomo en la población infantil (18)**

- **Elevado nivel de Pb en sangre:** plumbemias  $\geq 25 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ .  
(para niños asintomáticos)
  - **Toxicidad de Pb:** (síntomas evidentes)
    - Con niveles elevados de Pb en sangre.
    - y
    - Zn-protoporfirina o EP  $\geq 35 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ .
- 

Con el tema así planteado hemos creído oportuno dedicar una parte de la investigación de este capítulo al estudio de **una muestra de la población infantil asturiana**. En el mes de enero de 1986, hemos elegido 100 niños al azar, de entre los que forman parte de un estudio que se lleva a cabo en el Departamento de Pediatría de la Universidad de Oviedo, y que habían sido ingresados en los Hospitales de Nuestra Señora de Covadonga (Oviedo) y San Agustín (Avilés), por causas muy diversas, y en **ningún caso** por intoxicación saturnina.

En nuestro estudio hemos propuesto como «**valor normal de plumbemia**» en la población infantil el de  $\geq 25 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ ., cifra que el C.D.C. estableció en 1985 y que para nuestra satisfacción la American Academy of Pediatrics ha ratificado en 1987.

Para lograr un mejor manejo de los datos de toda la muestra en estudio, se ha hecho una clasificación atendiendo a las edades de los niños, de ambos sexos (figura 5). En ella se relacionan los valores medios de plumbemias encontrados para la totalidad de los niños estudiados, así como las medias parciales, en función del lugar de hospitalización.

El objetivo de este trabajo es el de dar luz a unos resultados de plomo en sangre de una pequeña muestra de la población infantil asturiana, y que creemos merece atención.

Apoyándonos en el criterio de Evan Charley de que: «El número de casos depende de lo mucho que se busque», instamos desde aquí a los organismos competentes de Sanidad para que incorporen en los programas de reconocimientos médicos, al menos a nivel escolar, la determinación del parámetro **PLUMBEMIA**, simultaneando Campañas de Educación Sanitaria que **orienten y aconsejen** sobre los peligros del saturnismo y la conveniencia de los chequeos rutinarios. Pues **la intoxicación saturnina en la infancia** es una enfermedad que puede ser prevenida.



## CARACTERISTICAS ESTADISTICAS DE LA POBLACION INFANTIL ASTURIANA MUESTREADA

(fig. 5)

EDAD	FRECUENCIA ABSOLUTA	HOSPITAL		VALOR MEDIO DE PLUMBEMIAS ( $\mu\text{g}/100 \text{ ml.}$ )			DESVIACION STANDARD	$\geq 25 \mu\text{g}/100 \text{ ml.}$ (%)
		Oviedo	Avilés	Oviedo	Avilés	Total		
Recién nacidos	33	32	1	23	18	23	14	27
1-12 meses	17	16	1	27	17	26	9	47
1-4 años	15	9	6	26	19	23	7	33
4-8 años	17	11	6	24	20	22	7	24
9-14 años	18	10	8	19	25	22	5	28

Para la totalidad de los niños estudiados, **la plumbemia media hallada ha sido de  $23 \mu\text{g}/100 \text{ ml.}$** , pudiendo observar que casi el 50% de los niños de 1 a 12 meses poseen plumbemias  $\geq 25 \mu\text{g}/100 \text{ ml.}$

**A estos resultados han contribuido casos tan preocupantes como:**

- Un R.N. con plumbemia de  $98 \mu\text{g}/100 \text{ ml.}$ , ingresado con conjuntivitis y esta-filodermia, en Oviedo.
- Otro de **8 meses**, ingresado en Oviedo, por traumatismo craneal, presentó una plumbemia de  $50 \mu\text{g}/100 \text{ ml.}$
- Con **9 meses** de edad e ingresado por convulsión tónico-clónica generalizada, en Oviedo, su plumbemia es  $44 \mu\text{g}/100 \text{ ml.}$
- Un niño de **10 años**, ingresado por apendicitis en Oviedo, presenta una plumbemia de  $34 \mu\text{g}/100 \text{ ml.}$
- Y otros casos similares.

### Determinación de plumburias por espectrofotometría de absorción atómica

Al inicio de la exposición ya hemos dicho que el balance absorción-excreción es el que determina la acumulación de plomo en el organismo. Y para individuos no expuestos laboralmente, se calcula a partir del plomo que ingresa en el ser humano, y el plomo que es excretado:

$$\text{BALANCE} = \text{Pb dietético} - (\text{Pb fecal} + \text{Pb urinario})$$

(No incluye el plomo que ingresa por vía aérea)

Entre 1937 y 1972 han sido numerosas las experiencias realizadas por Kehoe (19), sobre el comportamiento del plomo una vez que ingresa en el organismo humano. Lamentablemente, la sociedad industrializada permanece en balance positivo para el plomo, durante toda la vida, de forma que ya el caudal heredado de la madre, al nacer, supone unos 2 mg., que van incrementándose hasta 100 veces más, con la edad, per-



maneciendo un 90% depositado en el tejido óseo, en forma no tóxica, afortunadamente.

La vida media para la excreción del plomo metabolizado es de unos 25 días, disminuyendo cuando la concentración de plomo en sangre crece, lo que indica un mecanismo de protección natural contra un incremento del metal en el organismo.

El mecanismo de excreción del plomo por la orina parece seguir el metabolismo del calcio, de forma que toda lesión renal favorecerá una retención a nivel tisular, pudiendo aparecer **erróneamente** una plumburia con cifras normales.

La fracción de plomo no excretada se fija en los huesos largos por precipitación al estado de fosfato insoluble (al pH orgánico), siguiendo el metabolismo del calcio. Se puede afirmar que toda fijación de calcio a nivel óseo entraña una fijación de plomo, y a la inversa, toda liberación de Ca conlleva una eliminación de Pb ionizado en la circulación, pudiendo esto explicar la aparición de plumbemias elevadas en sujetos no expuestos al plomo (20). Cuando la velocidad de ingestión del plomo supera a la velocidad de excreción del metal y a la de su almacenamiento en los huesos, el plomo comienza a acumularse en los tejidos blandos (riñón, hígado, pulmones,...) y en la sangre.

Es cierto que una plumburia basal elevada, permite suponer altos niveles de impregnación y consecuentemente plumbemia alta. Pero una excreción en límites «normales» no es suficiente para excluir la posibilidad de una absorción excesiva.

Es necesario añadir aquí la gran discrepancia encontrada en la bibliografía consultada, respecto a lo que se considera «**plumburia normal y patológica**», así para algunos autores son patológicos los valores  $> 20 \mu\text{g}/1.000 \text{ ml.}$ ; mientras que otros sitúan la barrera en 10 veces más; sin dejar de comentar estudios como el publicado en 1982 por Cabeza y col. (6) en el que establecen como **LÍMITE «NORMAL» de plumburia** el de  $< 70 \mu\text{g}/\text{litro}$ , referida a orinas de 24 horas, a efectos de diagnóstico del saturnismo, por ser bastante irregular la excreción urinaria.

La técnica analítica más utilizada para la determinación de trazas de metales, como el plomo, en sustancias biológicas, es la absorción atómica, siendo una aplicación característica de la extracción con disolventes orgánicos, la determinación de plomo en orina (21). Con esta técnica se llegan a determinar concentraciones de  $0,05 \mu\text{g}/\text{litro}$  de plomo en orina.

En nuestro laboratorio del Instituto Nacional de Higiene y Seguridad en el Trabajo (I.N.H.S.T.) de Oviedo, se ha utilizado el método combinado de extracción, por absorción atómica (22), donde han sido analizadas más de 3.000 muestras de orina para el diagnóstico del saturnismo.

La experiencia nos lleva a que factores como pH, fuerza iónica, temperatura de llama, interferencias y otras variables, influyen desde el punto de vista analítico, en los valores de plumburia encontrados y, en consecuencia, a la aportación del mencionado parámetro, en un diagnóstico eficaz y precoz.

Todo lo expuesto nos indujo a proponernos como objetivo **el optimizar este método analítico** (\*), y para lograrlo es necesario un estudio en profundidad que nos informe de la influencia de algunas variables que pueden modificar su utilidad.

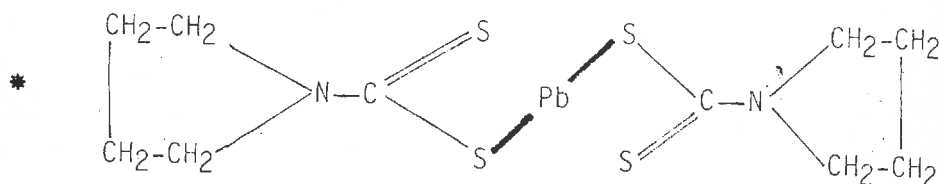
El estudio se inicia con disoluciones acuosas de plomo, pasando paulatinamente al análisis de orinas.

Las muestras se preparan y analizan en idénticas condiciones, centrando la diferencia **únicamente** en el **parámetro a investigar**, manifestando que todos los resultados que aparecen a lo largo de toda la exposición son media de tres análisis.

Para estudiar **directamente con orinas**, se han recogido 1 litro de individuos normales, de los que no se conoce exposición alguna, al que se le ha adicionado HCl al 1% para su almacenamiento a 4° C. Y con el objeto de asegurarle **un contenido mínimo de plomo** al «pool» de orinas, se le añadió 1 ml. de disolución acuosa de nitrato de plomo de 1.000 p.p.m.

### (\*) METODO ANALITICO DE DETERMINACION DE Pb EN ORINA

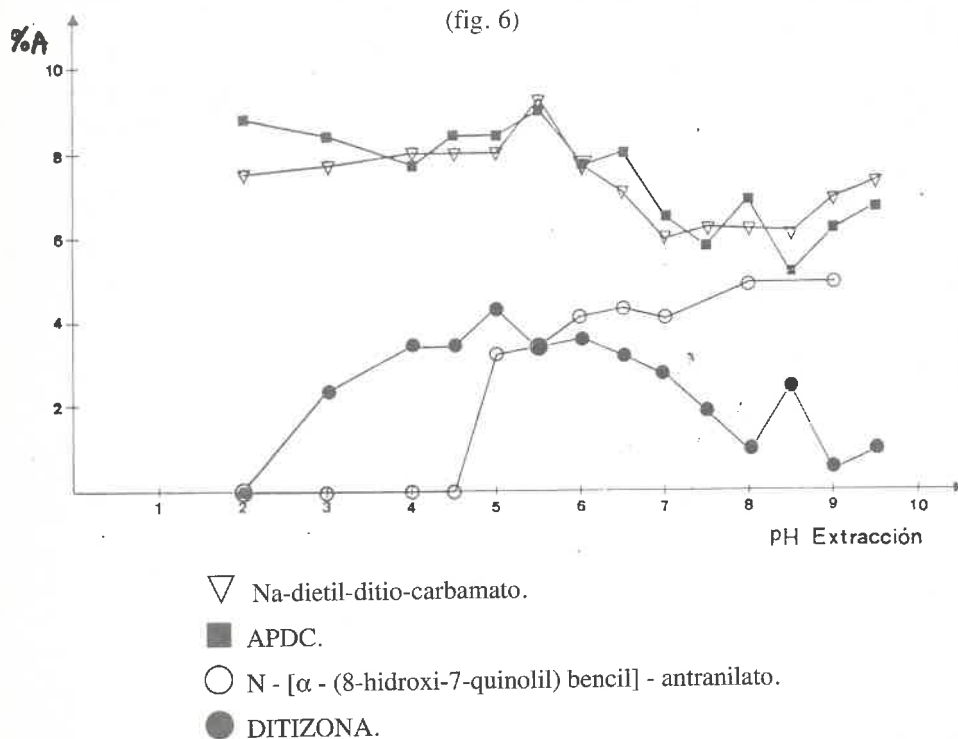
- La orina se trata con HCl al 1%.
- Se conserva a 4° C.
- Procedimiento:
  - 10 ml. de muestra.
  - Desproteinización (1 ml. Tritón X-100)
  - Ajuste del pH (de 4,5 a 5 con HCl o sosa)
  - \* Formación del complejo APDC-Pb (1 ml. APDC al 2%)
  - Extracción del Pb en fase orgánica (5 ml. MIBC)
  - Centrifugación (20 min. a 4.500 r.p.m.)
  - Aspiración directa en la llama aire-acetileno, de la fase orgánica.
  - Lectura de absorbancia a 283,3 nm.
- Paralelamente, se preparan patrones de 10 a 500  $\mu\text{g/litro}$ , que permiten trazar la recta de calibrado y cuantificación de las muestras.



El **COMPLEJANTE** empleado en el método es la sal amónica del ácido pirrolidin-ditio-carboxílico (APDC).

Hemos estudiado el comportamiento de éste y otros complejantes (fig. 6), sobre la disolución acuosa de nitrato de plomo, y aunque en todos los casos aparecen máximos de absorbancia en la zona de pH = 5, se considera como el **más idóneo** entre los estudiados el APDC.

**INFLUENCIA DE LOS COMPLEJANTES ESTUDIADOS  
EN LA DETERMINACION DE PLOMO EN ORINA  
POR ESPECTROFOTOMETRIA DE A.A.**



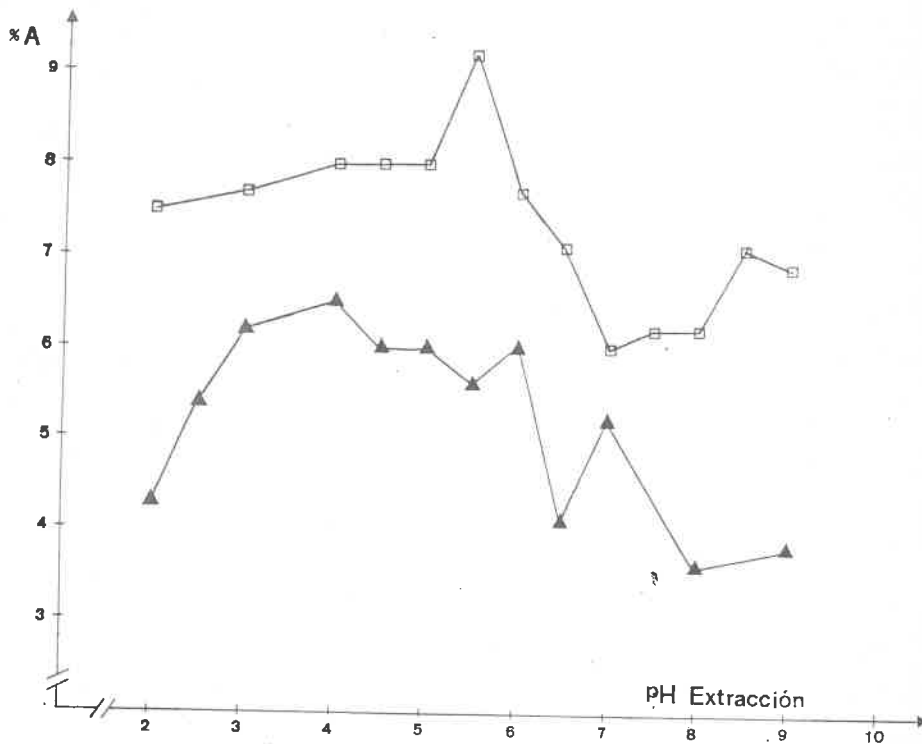
También se ha investigado si suponía ventaja alguna al método la **ADICION CONJUNTA DE COMPLEJANTE Y EXTRACTANTE**, manteniendo la concentración de 20 mg/muestra, como el propio método propone. A la vista de los resultados obtenidos (fig. 7) se estima oportuno el adicionarlos conjuntamente en toda nuestra investigación, lo que implica: **un menor tiempo** en el proceso analítico y **una reducción** de posibles **errores de medida**.

Seguidamente se estudian muestras del «pool» tratadas con 1 ml. de los siguientes **DESPROTEINIZANTES**: (fig. 8). De las absorbancias resultantes se deduce que **no es significativo** el empleo de uno u otro desproteinizante, e incluso en ausencia de éste, por lo que se decide la **NO desproteínización de las muestras** en experiencias posteriores.

A la hora de **AJUSTAR EL pH de las muestras**, el analista se encuentra con que éste es variable de una orina a otra, tanto entre individuos, como en las distintas micciones de una misma persona; contribuyendo además a esto, las gotas de ácido clorhídrico que han sido adicionadas a la orina para su almacenamiento. Por tanto, el ajuste

**COMPARACION DE LOS % OBTENIDOS EN LA DETERMINACION DE PLOMO, AÑADIENDO APDC Y MIBC SEPARADAMENTE (▲), Y ADICIONADOS CONJUNTAMENTE (□), EN MUESTRAS IDENTICAS**

(fig. 7)



de pH supone un gasto de **tiempo** excesivo en el proceso analítico. Ante este problema cotidiano, se ha decidido ajustar los pH con las disoluciones reguladoras (fig. 9) empleando en cada caso 5 ml.

De los resultados obtenidos de absorbancia se concluye que la disolución reguladora más adecuada es la de biftalato potásico / sosa.

Para comprobar si la **VARIACION DE VOLUMEN DE REGULADORA** en el ajuste de pH influye en los valores de absorbancia detectados, se planteó la experiencia que aparece en la 2.<sup>a</sup> parte de la (fig. 9). Y hemos considerado, según los datos obtenidos, que la absorbancia es **independiente** del volumen de reguladora, al menos, en nuestro rango experimentado.

Para investigar si el empleo de otros **DISOLVENTES ORGANICOS** suponían alguna ventaja analítica respecto a la metil-isobutil-cetona, utilizada en el método, nos propusimos trabajar con los que se detallan en la figura 10, utilizando 5 ml. de cada uno. Y de las absorbancias medidas a 283,3 nm., se concluye que la **máxima señal** corresponde a la metil-isobutil-cetona.

**ESTUDIO DE VARIOS DESPROTEIZANTES EN LA DETERMINACION DE Pb EN ORINA POR ABSORCION ATOMICA**

(Fig. 8)

Desproteinizante (1 ml.)	Absorbancia	$\bar{A}$	% A	$\overline{(\% A)}$
TRITON X-100	0,038	0,046	8,3	10
	0,050		10,8	
	0,050		10,8	
	0,046		10,1	
Dodecil-hidrógeno-sulfato sódico	0,053	0,052	11,5	11,3
	0,052		11,3	
	0,051		11,2	
	0,051		11,2	
Ninguno	0,049	0,049	10,7	10,8
	0,049		10,7	
	0,049		10,7	
	0,050		10,9	

**INFLUENCIA DE DISTINTAS REGULADORAS PARA EL AJUSTE DEL pH EN LA DETERMINACION DE Pb EN ORINA POR A.A.**

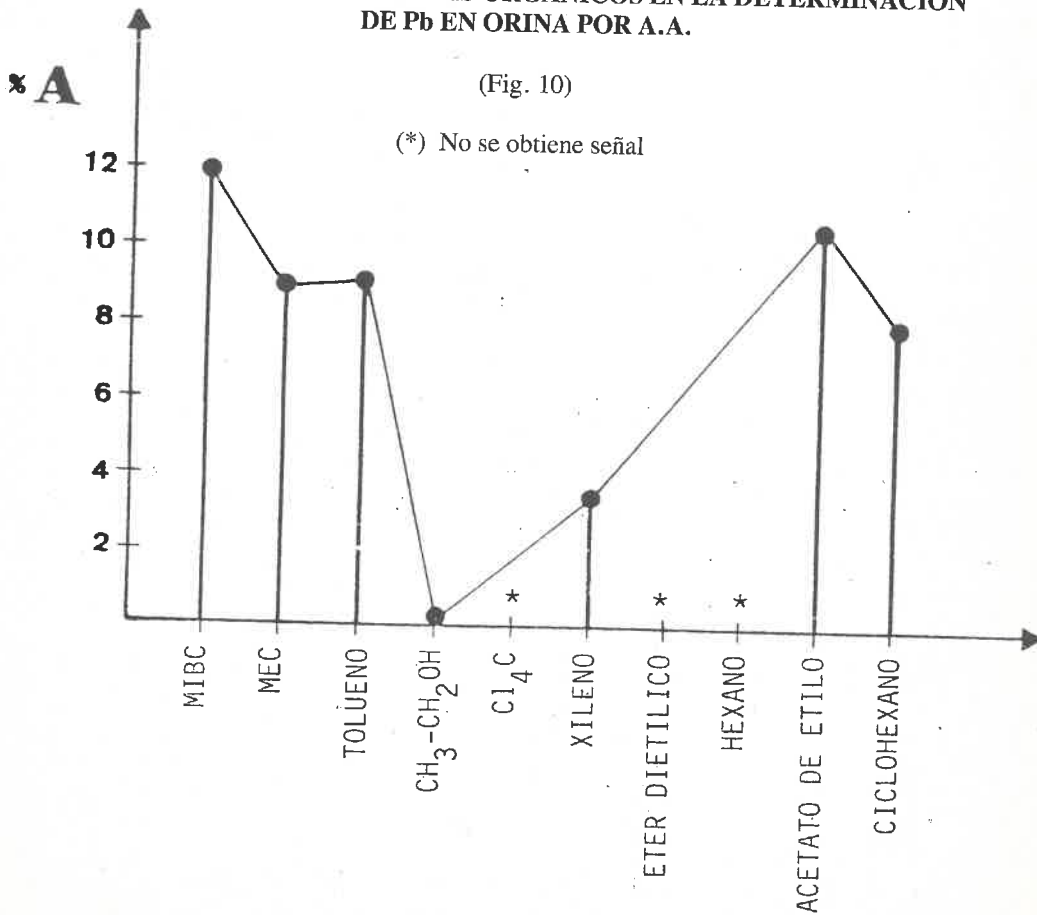
(Fig. 9)

Reguladora	Absorbancia	% A	$\bar{A}$	$\overline{(\% A)}$
Biftalato potásico / sosa, 0,4 M pH = 5,46	0,058	12,5	0,054	11,7
	0,053	11,5		
	0,050	10,9		
Acido acético / Acetato sódico 0,1 M., pH = 5,0	0,042	9,2	0,039	8,3
	0,036	7,9		
	0,040	8,8		
PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub> / PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> Na 0,2 M pH = 5,52	0,013	2,9	0,013	2,9
	0,014	3,2		
	0,013	2,9		

**INFLUENCIA DEL VOLUMEN DE REGULADORA  
BIFTALATO POTASICO/SOSA**

Reguladora (ml.)	Molaridad reguladora en volumen final	Fuerza iónica proporcionada por la reguladora	Absorbancia	$\bar{A}$	% A
2	0,067	0,067	0,064	(0,066 ± 0,004)	13,7
4	0,114	0,114	0,066		14,1
6	0,150	0,150	0,062		13,3
8	0,178	0,178	0,070		14,9

**ESTUDIO DE 10 DISOLVENTES ORGANICOS EN LA DETERMINACION  
DE Pb EN ORINA POR A.A.**



Otro factor a tener en cuenta es el **TIEMPO DE CENTRIFUGACION**, pues de él depende la **total separación de las fases**, aspecto fundamental para practicar una buena medida de absorbancia, en función de la concentración de plomo extraído en la fase orgánica. Centrifugando a 4.500 r.p.m., se variaron los tiempos desde 1 a 20 minutos (fig. 11). Y a mayor tiempo se obtienen mayores absorbancias. Sin embargo, lo hemos situado en 10 minutos por considerar que las diferencias de A no son significativas, frente a lo que supone el tiempo invertido en todo el proceso de análisis.

Tomando como referencia los valores normales de los iones presentes en una orina también normal, hemos estudiado la influencia que pueden ejercer **CANTIDADES ANOMALAS DE ESTOS IONES** en la determinación del plomo en orina por A.A.

Figura 11

**INFLUENCIA DEL TIEMPO DE CENTRIFUGACION  
EN LA DETERMINACION DE Pb  
(por absorción atómica)**

Centrifugación (minutos)	Absorbancia	% A
1	0,052	11,3
2	0,052	11,3
5	0,054	11,7
6	0,056	12,2
10	0,061	13,2
15	0,064	13,7
20	0,074	15,7

**Los valores normales en orina**

***Cationes***

Na <sup>+</sup> .....	30-300 mEq/24 horas.
K <sup>+</sup> .....	26-123 mEq/24 horas.
Ca <sup>2+</sup> .....	2,5-20 mEq/24 horas.
Mg <sup>2+</sup> .....	Aproximadamente 1/3 de la ingesta diaria.
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> .....	La excreción normal de N-amoniaco en 24 h. es de 0,14-1,5 g. en adultos y de 0,56-2,9 g. para niños.



### Aniones

Cl <sup>-</sup> .....	5-20 g/24 horas.
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> .....	Como sulfato inorgánico: 1,5-3,2 g/24 h. o 0,5-1,1 mg/100 ml., expresado como S. Como ión sulfato total, desde 1,8 a 4,1 g/24 h. o 0,6-1,4 g. como S.
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> .....	0,34-1 g. P/24 horas.
C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>2-</sup> .....	Hasta 40 mg/24 horas.
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> .....	0,3-0,4 g/litro.
Citratos .....	0,3-0,9 g/24 h. (Ac. cítrico).

En el estudio individual de cada ión se ha considerado:

- Como muestra de referencia, aquella a la que no se le adiciona reactivo específico.
- Un total de 6 muestras-problema del mismo «pool», únicamente diferenciadas en el volumen del reactivo específico, desde 0 a 3 ml.
- Se admite como interferencia a una variación de  $\pm 15\%$  en la absorbancia con respecto a la obtenida para la muestra de referencia.

En la figura 12 se expone el resumen de todo el estudio, y en el caso concreto del **ión calcio** hemos prescindido de su estudio por dos motivos fundamentales:

- Por la interrelación en cuanto a mecanismos bioquímicos de Pb y Ca.
- Porque la presencia de Ca en orina, en cantidades anormalmente altas, se traduce en la aparición de gran sedimento (por precipitación de sales insolubles de calcio), que lógicamente nos llevarían a una mineralización de la muestra y posterior separación del Ca por métodos tradicionales, como paso previo a la determinación del plomo.

Finalmente, y con referencia a la determinación de Pb en orina por A.A., se procedió a cuantificar la PLUMBURIA del «pool» de orinas, aplicando un método de adiciones. Véase figura 13, de la que se deduce que en los 10 ml. del «pool» de orinas de cada muestra, están presentes 12  $\mu\text{g}$  de plomo, lo que supone una plumburia de 1.200  $\mu\text{g}$ /litro. Descartándole a esto el contenido inicial de plomo adicionado como disolución acuosa de 1.000 p.p.m., se llega a la conclusión de que la plumburia inicial del «pool» de orinas es de 200  $\mu\text{g}$ /litro. Como consecuencia se propone en la determinación de plomo en orina, como innovación, EL METODO DE ADICIONES, que supone ventajas considerables desde el punto de vista metodológico en cuanto a eliminación de interferencias y efectos matriciales.

## INTERFERENCIAS EN LA DETERMINACION DE Pb EN ORINA POR A.A.

(Fig. 12)

Ión	Valores normales (★)	Valor máximo experimentado (*)	Interferencia
Na <sup>+</sup>	46 mg. de Na <sup>+</sup> 117 mg. de NaCl	390 mg. de Na <sup>+</sup> 1.000 mg. de NaCl	NO
C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0,26 mg. de C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>2-</sup> 0,4 mg. de Na <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	1,56 mg. de C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>2-</sup> 2,38 mg. de Na <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	NO
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> <sup>3-</sup>	300 mg. de C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> <sup>3-</sup> 400 mg. de Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	1.540 mg. de C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> <sup>3-</sup> 2.400 mg. de Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	NO
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	4 mg. de CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> 7 mg. de Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	22,8 CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> 40 mg. de Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	(*) SI, al adicionar 3,8 mg. de CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>
K <sup>+</sup>	32 mg. de K <sup>+</sup> 61 mg. de KCl	64 mg. de K <sup>+</sup> 122 mg. de KCl	NO
Cl <sup>-</sup>	133 mg. de Cl <sup>-</sup> 220 mg. de NaCl	607 mg. de Cl <sup>-</sup> 1.000 mg. de NaCl	NO
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	7 mg. en P 80 mg. de Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H	87 mg. en P 400 mg. de Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H	(*) SI, al adicionar 14,7 mg. en P
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	20 mg. de SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> 30 mg. de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	304 mg. de SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> 450 mg. de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	NO
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	10 mg. de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> 40 mg. de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	65,5 mg. de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> 240 mg. de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	NO
Mg <sup>2+</sup>	1,62 mg. de Mg <sup>2+</sup> 16,4 mg. de MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10 mg. de Mg <sup>2+</sup> 100 mg. de MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	NO

● Para 10 ml. de orina.

(★) Corresponde al límite superior del intervalo normal.

(\*) Supone en todos los casos, 6 o más veces, el valor normal.

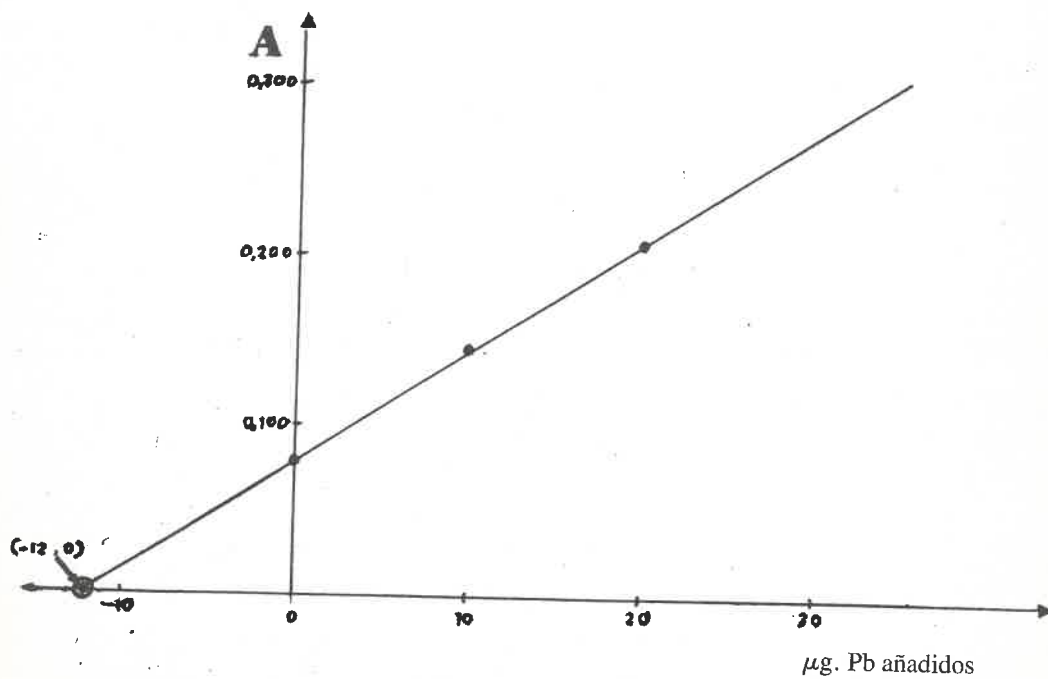
(☆) Mínimo experimentado por encima del límite máximo.

**RELACION ENTRE LOS  $\mu\text{g}$  DE PLOMO AÑADIDOS  
A LAS MUESTRAS-PROBLEMA DEL «POOL» DE ORINAS  
Y LAS ABSORBANCIAS REGISTRADAS.  
METODO DE ADICIONES**

(Fig. 13)

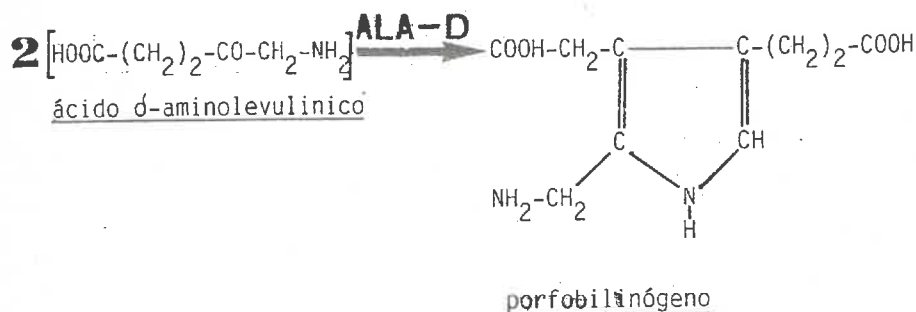
Muestra N.º	«pool» orina (ml)	Disolución de Pb		Absorbancias (283,3 nm)	% A
		(10 p.p.m.) (ml)	Pb añadido ( $\mu\text{g}$ )		
1	10	0	0	0,079	16,6
2	10	1	10	0,145	28,4
3	10	2	20	0,208	38,1
4	10	3	30	0,248	43,5

**RELACION ENTRE  $\mu\text{g}$  DE Pb AÑADIDOS A LAS MUESTRAS  
DEL «POOL» DE ORINAS Y SUS ABSORBANCIAS**



## Determinación espectrofotométrica de la delta-amino-levulínico-deshidrasa (ALA-D)

La  $\delta$ -amino-levulínico-deshidrasa es una enzima eritrocitaria que cataliza la condensación de dos moléculas de ácido amino-levulínico (sustrato) para formar porfobilinógeno (producto):



**PROPIEDADES:** Es una enzima termoestable y típicamente sulfhidrúlica. Sensible a agentes bloqueantes de grupos sulfhidrilo, como metales pesados: Pb, Hg y Cd. Activación por: cisteína, glutatión, Zn, Cu, Al y otros. Es una enzima oligomérica de peso molecular 280.000, formada por 8 subunidades similares, con un átomo de Zn por subunidad. Formación de agregados moleculares que dan origen a especies de pesos moleculares distintos en equilibrio, y su estructura mínima funcional correspondería a la de un dímero de peso molecular 70.000.

Dichas propiedades han sido objeto de numerosos estudios, que han puesto en **divergencia su papel bioquímico**, independiente de su función **principal en la Biosíntesis del grupo hemo** de transformar el ALA en PBG.

Por primera vez, Lichtman y Feldman (23), hace 25 años, han puesto de manifiesto la inhibición del enzima ALA-D por los **metales pesados**, y en concreto por el plomo.

Sin embargo, en los últimos años, han aparecido varias publicaciones con resultados **contradictorios** y que afirman que se produce un **incremento** de la actividad enzimática del ALA-D, tanto en intoxicaciones agudas como crónicas, por Plomo, lo mismo para el ser humano que para animales de experimentación, e independientemente de la vía de entrada del tóxico; y en las condiciones metodológicas en las que se cuantifica el enzima, de una manera casi universal.

Esta situación ha tenido gran influencia en la toxicología del plomo, y actualmente, organismos de gran prestigio como la O.M.S., y el Center for Disease Control (C.D.C.) americano, se han inclinado por las protoporfirinas eritrocitarias (PPE) o la Zn-protoporfirina (Zn-PP) que, conjuntamente con la plumbemia, representan los dos parámetros de mayor utilidad a la hora de efectuar un diagnóstico del saturnismo.

# CUANTIFICACION DE LA $\sigma$ - AMINOLEVULINICO DESHIDRASA

(Fig. 14)

Método Comercial (28)	Método C.E.E. (24) (25) (26) (27)	
MUESTRA	MUESTRA	● BLANCO
+ 0,1 ml. sangre + 0,9 ml. Tritón X-100 (2%)	+ 0,2 ml. sangre + 1,3 ml. agua destilada	+ 0,2 ml. sangre + 1,3 ml. agua destilada
+ 0,5 ml. ALA 0,02 M ★	+ 1 ml. ALA 0,01 M ★	+ 1 ml. ATA-HgCl <sub>2</sub> + 1 ml. ALA
38° C	Incubación 60 min.	37° C
+ 1 ml. ATA 10% *	+ 1 ml. ATA-HgCl <sub>2</sub> *	
10 min. a 2.000 r.p.m. Centrifugación	Centrifugación y filtración	
+ 1 ml. sobrenadante + 1 ml. Ehrlich 1,8 % ☼	+ 1 ml. sobrenadante + 1 ml. Ehrlich 2,5 % ☼	+ 1 ml. sobrenadante + 1 ml. Ehrlich 2,5 %
10 min. en reposo		
553 nm. ★	Lectura de absorbancia	555nm. ★
$U. ALA-D/ml. = \frac{D.O.}{Hto \%} \cdot 15.000$		
$U/l = \frac{A \text{ corregida}}{Hto \%} \cdot 1882 = \mu\text{moles ALA} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{litro RBC}^{-1}$		
● BLANCO	μmoles PBG/10 c.c. de RBC	☼ Valores Normales ☼
+ 1,5 ml. H <sub>2</sub> O destilada + 1,5 ml. Ehrlich 1,8 %	Mét. Comercial (108 a 300)	Mét. C.E.E. Plumbemia de 30 → 60 Act. ALA-D: 32 → 12

Según nuestro criterio, si no todas, gran parte de las dudas que permitirían esclarecer estas discrepancias tienen su origen en las deficiencias metodológicas para la cuantificación de la actividad enzimática del ALA-D. En la figura 14 se exponen las metodologías más empleadas, basadas en la determinación colorimétrica del profobinógeno, en su relación con el cromógeno para-dimetil-amino-benzaldehído (PDMAB).

A partir de estos antecedentes, hemos considerado de gran interés el realizar un estudio de algunas variables que, según nuestro criterio, pueden influir de manera significativa en la metodología empleada, y consecuentemente en la interpretación de los resultados obtenidos.

---

#### VARIABLES ESTUDIADAS EN LA METODOLOGIA DEL ALA-D

- Tiempo transcurrido desde la extracción de la sangre hasta su manipulación.
- Hemolizante empleado.
- Concentración de sustrato (ALA).
- Tiempo de centrifugación.
- Tiempo de incubación.
- Adición o no de cloruro de mercurio.

- 
- (★) Dichas variables han sido experimentadas con sangres «normales» y «patológicas».
  - (★) El método aplicado ha sido el Comercial, en todas las ocasiones.
  - (★) El tiempo de manipulación desde la extracción hasta el procesamiento ha sido siempre < 40 minutos.
- 

Al estudiar la influencia del **TIEMPO DE MANIPULACION** (que hemos estimado aquel transcurrido entre la extracción sobre heparina como anticoagulante, y el pipeteo de la sangre, para su procesamiento), se encuentra que, tanto para sangres normales como patológicas, a partir de las 3 horas se producen **descensos** importantes de la actividad. Ver figura 15. Por tanto, consideramos fundamental la realización de los análisis de las muestras lo más rápidamente posible después de la extracción y, en ningún caso, superar las 3 horas.

Nuestros resultados confirman satisfactoriamente los deducidos por D. Prpic (29), mientras que se diferencia sustancialmente de los aportados por el propio método comercial, que considera que manteniendo la sangre a 4° C no se produce descenso en la actividad enzimática hasta pasadas 24 horas. El método de la Comunidad Económica Europea (C.E.E.) no contempla esta variable. Asimismo, no hemos encontrado variación significativa entre almacenar las muestras a 4° C y mantenerlas a temperatura ambiente.

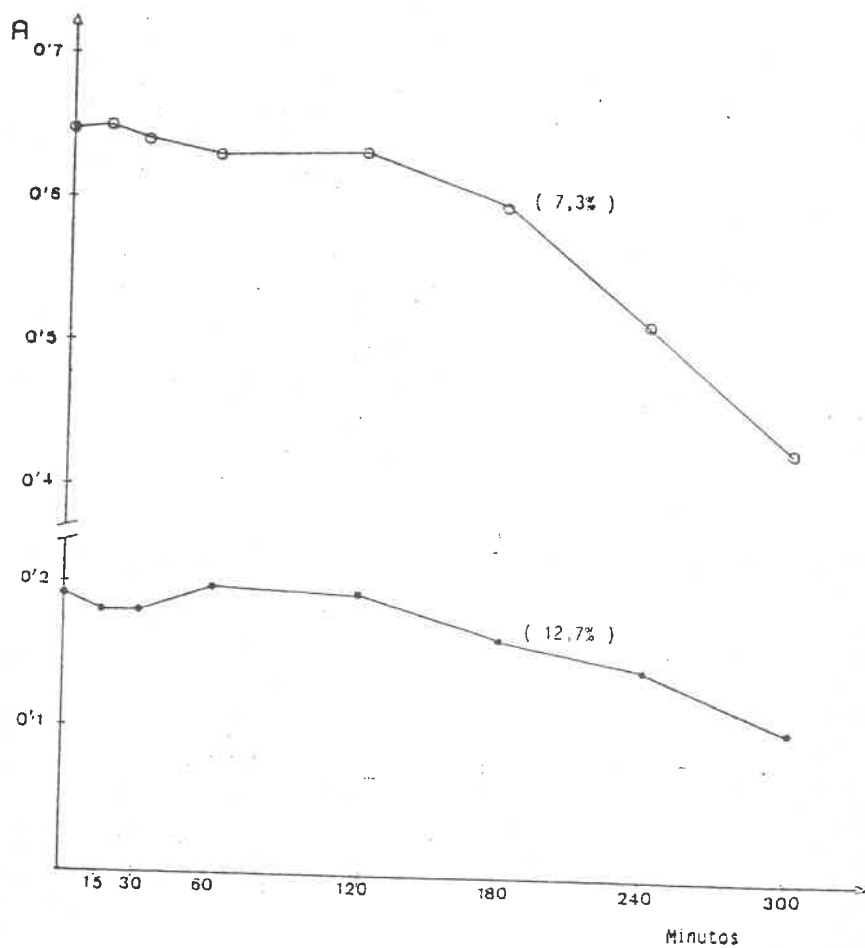
Para investigar la influencia que pudiera tener el **HEMOLIZANTE** se han procesado varias series de una misma sangre, con los hemolizantes que se detallan en la figura 16. De los resultados obtenidos se deduce que el TRITON X-405 es el que propor-

## INFLUENCIA DEL TIEMPO EN LA MEDIDA DE ALA-D

(Fig. 15)

(○) Sangre **Normal** (Plumbemia  $23 \mu\text{g}/100 \text{ ml.}$ )

(●) Sangre **Patológica** (Plumbemia  $68 \mu\text{g}/100 \text{ ml.}$ )

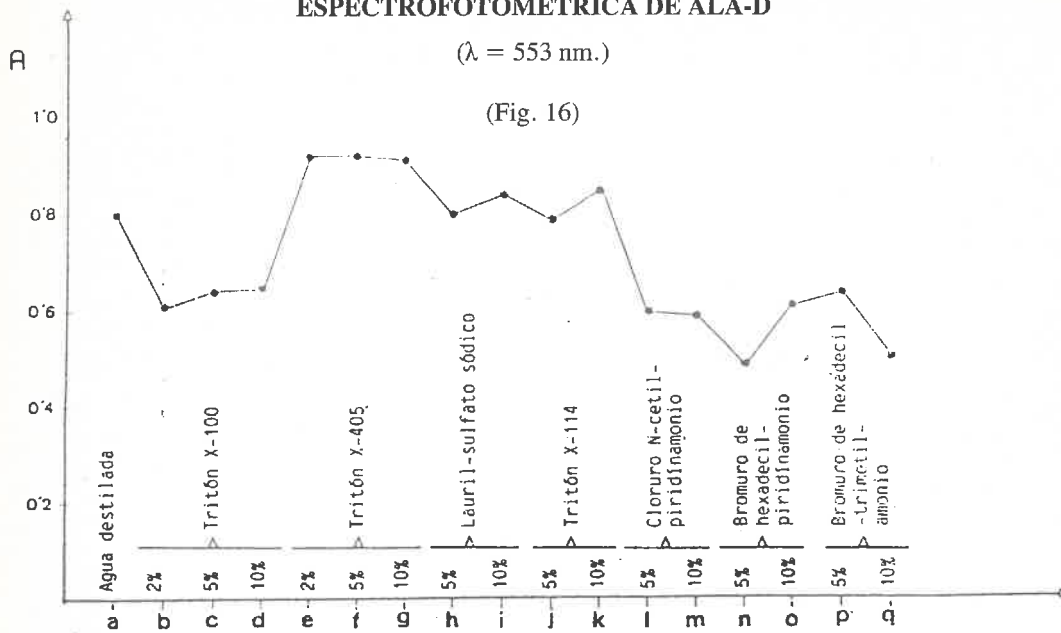




## INFLUENCIA DEL HEMOLIZANTE EN LA DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DE ALA-D

( $\lambda = 553 \text{ nm.}$ )

(Fig. 16)



ciona mejores resultados, no mostrando diferencias en cuanto a la concentración empleada, utilizando la del 5% en sucesivas investigaciones.

En cuanto a la **Concentración de SISTRATO (ALA)** empleada en la determinación del ALA-D y puesto que para poner de manifiesto la actividad enzimática es imprescindible operar en condiciones de saturación, se han preparado dos series de sangres normal y patológica, a las que en el mismo volumen de 0,5 ml. se les han añadido concentraciones de ALA de hasta 3 veces la empleada en el método comercial de 0,02 M. De los resultados obtenidos, se deduce que, si bien las diferencias de absorbancia no son muy apreciables, la disolución que contiene ALA 0,04 M es la más idónea.

Otra de las variables a estudiar es el **TIEMPO DE CENTRIFUGACION**, encontrando de unos autores a otros gran variación, sin evidente justificación. Así, para el trabajo de Bonsignore (30), lo fija en 10 minutos a 2.000 r.p.m. En nuestro estudio, se han experimentado desde 5 a 25 minutos a 2.000 r.p.m. y en una misma sangre. Deduciéndose de los resultados obtenidos que no existe variación significativa en los valores de absorbancia. Por ello, hemos elegido como tiempo óptimo de centrifugación el de 5 minutos.

Para referirnos al **TIEMPO DE INCUBACION**, nos remitimos al razonamiento de Nikkanen (31), de que el incremento de la actividad del ALA-D es lineal para períodos de incubación entre 15 y 90 minutos, recomendando como adecuado 1 hora a 37° C, al mismo tiempo que aconseja reducirlo a 30 min. para casos de chequeos previo de screening, o de aumentarlo a 90 min., si se presume una intoxicación manifiesta de plomo.

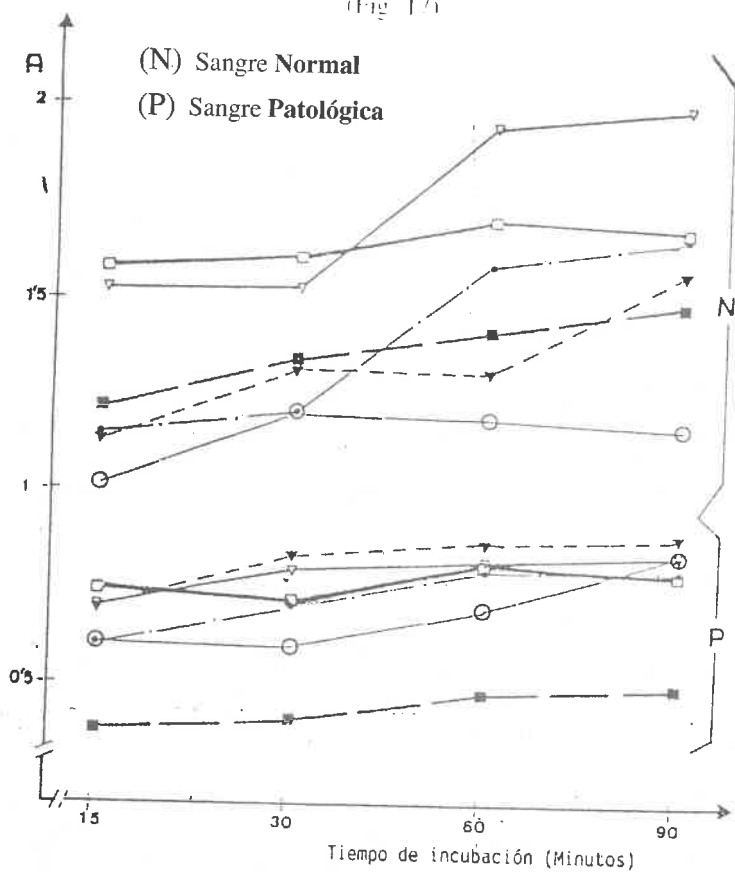
A la vista de los datos obtenidos en nuestras condiciones de trabajo, no se obtiene ventaja alguna al operar con tiempos de incubación mayores de 15 minutos, tanto en sangres normales como patológicas (figura 17).

En cuanto al **DESPROTEINIZANTE** utilizado para detener la reacción ya hemos anunciado anteriormente la diferencia sustancial entre los dos métodos expuestos.

Para comprobar si la presencia del Hg influye o no en la absorbancia registrada, se han preparado 2 series de sangre, una normal y otra patológica que han sido analizadas siguiendo el método comercial, pero utilizando Acido-tricloro-acético (ATA) en unas, y en otras ATA-HgCl<sub>2</sub>, obteniéndose descensos de absorbancia del 50% para sangres normales y del 43% en el caso de las patológicas, cuando se ha empleado el cloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>). Esto puede conducir a la aparición de **casos negativos ciertos**.

### INFLUENCIA DEL TIEMPO DE INCUBACION EN LA DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DE ALA-D

(Fig. 17)



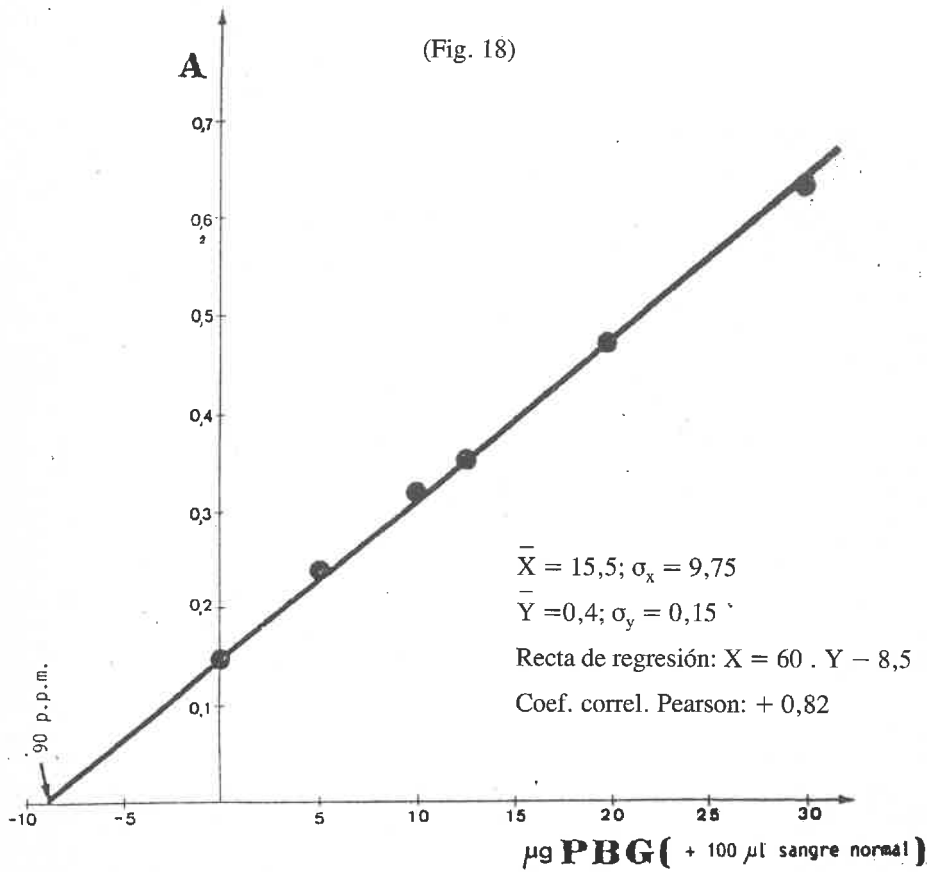
Hemos creído conveniente efectuar un estudio de calibración con el producto a medir: el PORFOBILINOGENO, verificando para ello el cumplimiento de la ley de Beer. A partir del propio PBG puro se prepararon disoluciones acuosas de concentración variable, y representadas frente a las absorbancias obtenidas, nos permiten afirmar una buena linealidad para masas de profobilínogeno entre 1 y 30  $\mu\text{g}$ , en nuestras condiciones de trabajo.

Hallado el coeficiente de extinción molar para el complejo PBG-PDMAB, ha sido el de  $24.465 \pm 2.900$  litro/mol.  $\text{cm.}$ , muy diferente al dado por Mauzerall (32) de 62.000 en muestras de orina y que sirve de partida en los métodos comentados.

Se comprobó la posibilidad de aplicar **EL METODO DE ADICION a la determinación del porfobilinógeno en sangre**, como medida de la actividad enzimática del ALA-D, al igual que se había hecho con los indicadores plumbemia y plumburia.

**METODO DE ADICION PARA EL CALCULO DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DEL ALA-D**

(Fig. 18)

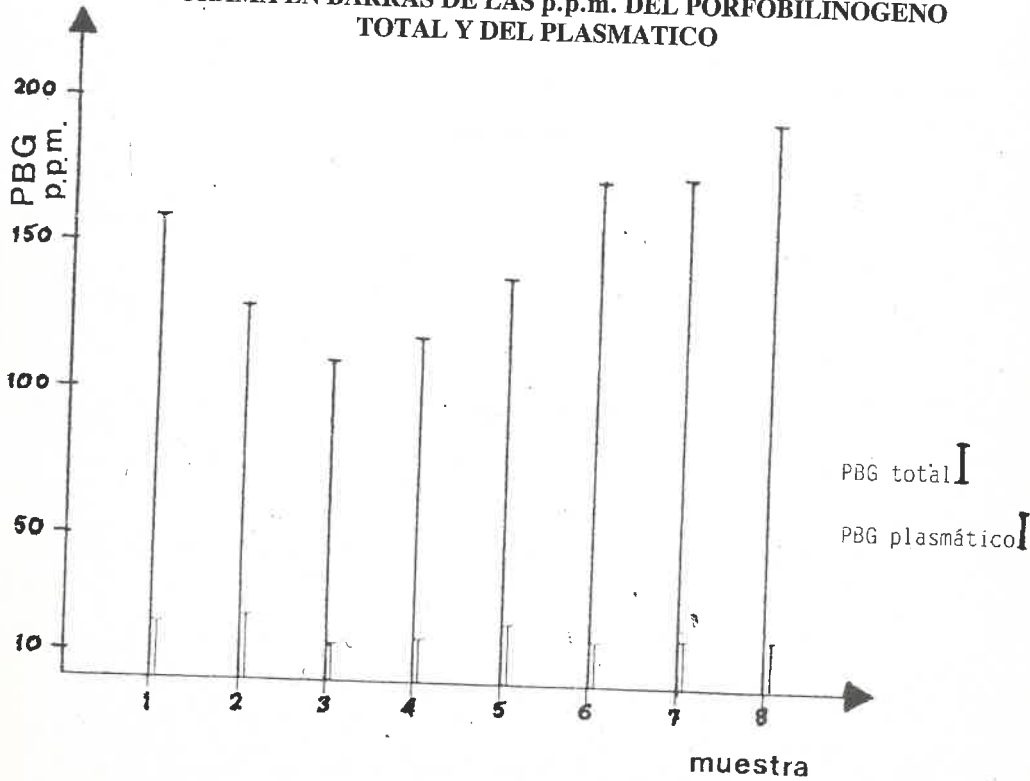


**DETERMINACION DEL PORFOBILINOGENO  
COMO MEDIDA DEL ALA-D.**

(Fig. 19)

Muestra	Absorbancia sangre	Absorbancia plasma	p.p.m. PBG total	p.p.m. PBG plasmático	% PBG plasmático
1	0,130	0,016	159,8	19,7	12,3
2	0,106	0,019	130,3	23,4	17,9
3	0,089	0,011	109,4	13,5	12,4
4	0,098	0,013	120,5	16,0	13,3
5	0,114	0,017	140,2	20,9	14,9
6	0,143	0,013	175,8	16,0	9,0
7	0,176	0,014	216,4	17,2	7,9
8	0,151	0,014	185,6	17,2	9,3

**DIAGRAMA EN BARRAS DE LAS p.p.m. DEL PORFOBILINOGENO  
TOTAL Y DEL PLASMATICO**



A muestras de 100  $\mu$ l. de sangre normal, se les adicionan cantidades de PBG desde 5 a 30  $\mu$ g, según figura 18, tomando como base dicha representación se llega a que la concentración de porfobilinógeno en la sangre analizada es de 90 p.p.m., calculada por el método de adición; o bien, de 82 p.p.m. mediante el calibrado absoluto. Por lo que se propone: «Un cambio en la metodología para evaluar la actividad enzimática del ALA-D que se fundamente en el calibrado absoluto o método de adición conocida de porfobilinógeno, hemoizando con agua destilada, adición de ALA 0,04 M, incubación a 37° C durante 60 minutos y metodología similar al kit comercial, con blanco paralelo.

Finalmente, y con el objeto de tener una idea de los valores **NORMALES DE PORFOBILINOGENO EN SANGRE Y PLASMA**, en nuestras condiciones metodológicas y empleando calibración absoluta, se han analizado 8 sangres y sus correspondientes plasmas, de personas normales y por duplicado. Como puede observarse en la figura 19, las concentraciones de PBG en sangre total varían entre 109,4 y 216,4 p.p.m., y las plasmáticas entre 13,5 y 23,4 p.p.m., contribuyendo por tanto el PBG plasmático entre un 7,9 y 17,9%, sin que exista relación alguna entre ambas.

Por ello es inadecuada la corrección que, respecto del hematrocito, se hace en la cuantificación del ALA-D tanto por el Método Comercial como por el adoptado por la Comunidad Económica Europea.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) TANQUEREL DES PLANCHES, L.: «Traité des maladies de plomb, ou saturnines». París (1839).
- (2) FAIRHALL, L. T.: J. Amer. Chem. Soc., 46: 1.593 (1924); J. Industr. Hyg., 18: 668 (1936). Industrial Toxicology, 2.<sup>a</sup> ed. Williams and Wilkins. Baltimore (1957).
- (3) HAGUENOER, J. M. y FURON, D.: «Toxicologie et Hygiene Industrielles. Tomo II - 2.<sup>a</sup> parte. Los derivados minerales». Ed. Technique & Documentatio. París (1982).
- (4) KEHOE, R. A.: «The metabolism of lead in Health and disease. The Harben Lectures» (1960). J. Roy Inst. Public Health Hyg 24: 81-96, 101-120, 129-143, 177-143, 177-203 (1961).
- (5) NOZAKI, K.: «Method for studies on inhaled particles in human respiratory system and retention of lead fume». Ind. Health, 4, 118-128 (1966).
- (6) CABEZA, J. M. y GARCIA BLANCO, M. A.: «Plumbemia y plumburia en la población laboral expuesta». Química e Industria, 28, 391-5 (1982).
- (7) QUEER, BROSIA: Toxicología Industrial». Ed. Jims (1983).
- (8) DELVES, H. T.: «A Micro-Samplin Method for the Rapid Determination of lead in blood by Atomic-Absorption Spectrophotometry». Analyst. 95, 431-438 (1970).
- (9) FERNANDEZ, F. J.: «Some observations on the determination of lead in blood». A. A. News. 12, (3), 70-72 (1973).
- (10) OLSEN, E. A. and JATLOW, P. I.: «An improved Delves-Cup Atomic Absorption Procedure for the determination of lead in blood an urine». Clin. Chem. 18 (11), 1312-17 (1972).
- (11) EDIGER, A. A. and COLEMAN, R. L.: «A modified Delves-Cup Atomic Absortion Procedure for determination of lead in blood». A. A. News. 11 (2), 33-36 (1972).
- (12) RUBIO y SANCHEZ: «Saturnismo crónico. Manifestaciones neurológicas». Rev. Clin. Esp. 134-567 (1974).

- (13) SANCHEZ SANCHEZ, ARROYO, V. y OTROS: «Valoración de los niveles de plomo en una población expuesta». *Rev. Clin. Esp.* Tomo 157. n.º 1 (1980).
- (14) BROWDER, A. A., JOSELOW, M. N., LOURIA, D. B.: «The problem of lead poisoning». *Medicine* 52: 121-141 (1973).
- (15) MAHAFFEY, K. R., ANNEST, J. L., ROBERTS, J., MURPHY, R. S.: «National estimates of blood lead levels 1976-80: Association with selected demographic and socioeconomic factors». *N. Engl. J. Med.* 307: 573-580 (1982).
- (16) N.H.A.N.E.S. II (NATIONAL HEALTH AND NUTRITION EXAMINATION SURVEY): Niveles de plumbemia estimados en los EE.UU. durante el cuatrienio 1976-1980.
- (17) SHALTOUT, A. A., GHAWAY, M. M., HASSAN, M. F. et al.: «High incidence of lead poisoning revealed by erythrocyte protoporphyrin (EPP) screening in Arabian children». *Ann. Trop. Paediatr.* 5/4 (207-210) (1985).
- (18) PREVENTING LEAD POISONING IN YOUNG CHILDREN: «A Stament by the Centers for Disease Control. U. S. Department of Health and human services». Atlanta, Georgia (1985).
- (19) GROSS, S. B.: «Oral and inhalation lead exposures in human subjets (Kehoe balance experiments)». Department of Environmental Health. University of Cincinnati (1979).
- (20) O.M.S.: «Límites de exposición profesional a los metales pesados que se recomiendan por razones de salud». Ginebra (1980).
- (21) SELANDER y CRAMER. *Brit. J. Industr. Med.* 25, 139 (1968).
- (22) ZINTERHOFER, JATLOW y FAPPIANO: *J. Lab. Clin. Med.* 78, 664 (1971).
- (23) LICHMAN, H. C. and FELDMAN, F.: «In vitro pyrrole and porphyrin systhesis in lead poisoning and iron deficiency». *Jour Clin. Invest.* 42, 830-9 (1963).
- (24) BERLIN, A. and SHALLER, K. H.: «European standardized method for the determination of  $\alpha$ -aminolevulinic acid dehydratase activity in blood». *Z. Khn. Chem. Klin. Biochem.* 12, 389-90 (1974).
- (25) EUROPEAN INTERCOMPARISON PROGRAMMES. - BERLIN, A., DEL CASTILHO, P. and SMEETS, J.: «Commission of the European Communities, Luxembourg 1.033-1.049 (1974).
- (26) BERLIN, A., SHALLER, K. H. and SMEETS, J.: Standarization of ALA-D activity determinations at the European level. Intercalibration and applications. Proceedings of the International Symposium Environmental Health aspects of lead». Amsterdam. October 2-6, págs. 1.087-1.100 (1972).
- (27) «Proposta di un método standardizato per la determinazione dell'activita ala-deidratasica eritrocitaria (Seminario organizzato dalla C.E.E., Erlangen 24-28 sett). (1973). *La Medicina del lavoro*, 64, n.ºs 9-10, pág. 383-5 (1973).
- (28) SIBAR Diagnósticos.-KIT actividad ALA-dehidrasa (ALA-D KIT).
- (29) PRPIC-MAJIC, D., MUELLER, P. K., LEW, V. C. and twiss, S.: «Delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D). Stability in human blood». *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 34, 315-9 (1973).
- (30) BONSIGNORE and col.: «Studi sulla intossicazione umana sperimentale da piombo. Sul meccanismo inhibitorio dell'ALA-deidratasi eritrocitaria». *Med. Lavoro* 59, 419-24 (1968).
- (31) NIKKANEN, J. HERNBERG, S. and TOLA, S.: «Modifications of the delta-aminolevulinic acid dehydratase test and their significance for assessing different intensities of lead exposure». *Work. Environ. Health* 9, 46-52 (1972).
- (32) MAUZERALL, D. y GRANICK, S.: «The occurrence and determination of delta-aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine». *J. Biol. Chem.* 219, 435-46 (1956).

