



**UNIVERSIDAD DE LA SERENA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUIMICA**

**DETERMINACION DE SELENIO Y ZINC EN PLASMA  
MEDIANTE ANALISIS POR ACTIVACION NEUTRONICA  
INSTRUMENTAL**

**Seminario para optar al Grado  
de Licenciado en Química**


**Profesor Patrocinante: Dr. Luis Arancibia Lopez  
Dr. Guillermo Saá Gamboa**

**Profesor Guía : Dr. Manuel Ruz Ortiz**

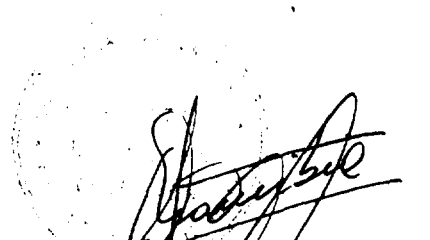
**Nombre Alumno : Luis Muñoz Anrique**

## CALIFICACION

ALUMNO	Calificación Informe	Calificación Individual	Calificación Final
	7.0	7.0	7.0



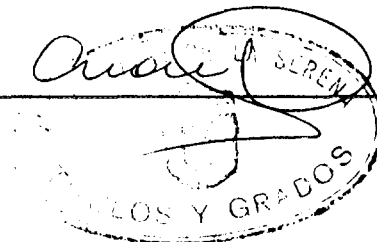
Dr. Luis Arancibia López  
Dr. Guillermo Saá Gamboa



Dr. Luis Arancibia López  
Director Depto. de Química

Fecha de Presentación: 19-5-1997

Firma y Timbre Recepción: \_\_\_\_\_



UNIVERSIDAD DE LA SERENA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPTO. DE QUIMICA

---

A Patricia, mi esposa, y a mis  
hijos, por el tiempo que me  
regalaron para la realización de  
este proyecto.

2/2

### **Determination of Selenium and Zinc in rat plasma by instrumental neutron activation analysis**

To evaluate the effects on the thyroid function when simple or multiple zinc, selenium and iodine deficiency are induced, research was carried out in laboratory animals. For simultaneously determining the Zn and Se concentration in rat plasma, an instrumental neutron activation technique was applied. A clean laboratory, class 100, was used for the preparation of the samples. High purity materials were used for sample collection and storage. Irradiation, decay and counting parameters were optimized to obtain the best sensitivity, accuracy and precision in the analysis. The Zn and Se concentrations were determined from the peak area of gamma-rays of 1115 and 265 KeV respectively. The analytical methodology used was validated with standard reference materials. The procedure used for the analysis, including the phases of collection, treatment of the samples and analytical determination was considered suitable for the study of trace elements in biological samples, especially plasma. (author)

### **Determinacion de selenio y zinc en plasma de ratas mediante analisis por activacion neutronica instrumental**

Con el propósito de evaluar los efectos que se producen sobre la función tiroidea cuando se induce una deficiencia simple o múltiple de zinc, selenio y yodo, se llevó a cabo una investigación en animales de experimentación. Se aplicó la técnica de análisis por activación neutrónica instrumental para la determinación de Se y Zn en plasma de ratas. Se utilizó un laboratorio limpio clase 100 para la preparación de las muestras y se emplearon materiales de alta pureza para su recolección y almacenamiento. Se optimizaron los parámetros de irradiación, decaimiento y conteo de las muestras con el propósito de alcanzar la mejor sensibilidad, exactitud y precisión analítica. Las concentraciones de Se y Zn fueron determinadas evaluando las áreas de los fotopicos de 265 y 1115 KeV respectivamente. El método analítico fue validado utilizando materiales de referencia. El procedimiento utilizado para el análisis, incluidas las fases de recolección, tratamiento de muestras y determinación analítica, resultó adecuado para el estudio evaluativo de elementos traza en matrices biológicas y especialmente en plasma. (autor)

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis agradecimientos a todas aquellas personas que colaboraron en la realización de este trabajo.

A mis profesores patrocinantes, los doctores Luis Arancibia y Guillermo Saá por el apoyo y preocupación brindada.

A mi profesor guía, Dr. Manuel Ruz por su constante orientación, asesoría, ayuda y estímulo.

A mi esposa, hijos y a toda mi familia por la paciencia, comprensión y cariño que siempre me brindaron.

A mis colegas del Laboratorio de Análisis por Activación, en especial al Sr. Victor Cassorla, Srta. Ingrid Kohnenkamp y Sra. Nuri Gras por las correcciones y asesoría en la redacción del texto y en el diseño de gráficos y a todos los miembros de la Comisión Chilena de Energía Nuclear por las facilidades que me otorgaron para la realización de este trabajo.

A CONICYT, quienes a través de FONDECYT patrocinaron esta investigación.

### **III. INDICE**

	Pág.
<b>IV. Introducción</b> .....	1
<b>V. Marco Teórico</b> .....	5
1. Aspectos nutricionales del Zinc .....	5
2. Evaluación nutricional de Zinc.....	7
3. Magnitud de la deficiencia de Zinc en Chile.....	8
4. Aspectos nutricionales de Selenio.....	8
5. Evaluación del estado nutricional de Selenio.....	11
6. Magnitud de la deficiencia y/o toxicidad de Selenio en Chile.....	11
7. Interacción nutrición-sistema endocrino.....	12
8. Interacción Zinc-función tiroídea.....	14
9. Interacción Selenio-función tiroídea.....	15
10. Química analítica de trazas.....	16
11. Conceptos generales del trabajo en salas limpias.....	17
12. Fundamentos del análisis por activación neutrónica.....	23
12.1 Reacciones nucleares.....	23
12.2 Reacciones con neutrones.....	27
12.3 Sección eficaz.....	29
12.4 Ecuación general de activación.....	31
12.5 Análisis por activación.....	37
12.5.1 Método absoluto.....	39
12.5.2 Método del comparador.....	42
12.6 Características del análisis por activación neutrónica.....	44
<b>VI. Desarrollo Experimental</b> .....	48

VI.1	Materiales y método.....	48
VI.1.1	Estudio experimental y muestreo.....	50
VI.1.2	Análisis por activación de dietas y plasmas.....	52
VI.2	Resultados.....	59
VI.3	Discusión de los resultados.....	68
<b>VII</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>77</b>
<b>VIII.</b>	<b>Referencias.....</b>	<b>79</b>
	Anexo.....	86
	Anexo 1. Composición de dieta experimental en base a aminoácidos....	86
	Anexo 2. Mezcla mineral modificada.....	87
	Anexo 3. Mezcla de Vitaminas.....	88

## **I. RESUMEN**

Además de la clásica relación entre yodo y la función tiroidea, se han descrito recientemente algunas asociaciones entre el funcionamiento de esta glándula y otros micronutrientes como zinc y selenio, las que podrían tener importantes efectos en la salud. A través del proyecto FONDECYT 1950734 se están estudiando las características de la interacción entre el estado nutricional de zinc, selenio y yodo con la función tiroidea.

Con el propósito de evaluar los efectos que se producen sobre la función tiroidea cuando se induce una deficiencia simple o múltiple de zinc, selenio y yodo, se llevó a cabo una fase de la investigación en animales de experimentación.

Un aspecto fundamental en esta etapa del proyecto, es la determinación de selenio y zinc tanto en las dietas suministradas como en el plasma de los animales de experimentación, para lo que se requiere una metodología analítica que posea buenas propiedades en la sensibilidad, exactitud y precisión para los elementos mencionados.

En el presente seminario se aplicó la técnica de análisis por activación neutrónica instrumental en el análisis de plasma y dietas. Se utilizó un laboratorio limpio (clase 100) para la preparación de las muestras y se emplearon materiales de alta pureza para su recolección y almacenamiento. Se optimizaron los parámetros de irradiación, decaimiento y conteo de las muestras con el propósito de alcanzar la mejor sensibilidad en el análisis. La metodología analítica empleada fue validada utilizando materiales de referencia. Aplicando el



test “t de Student”, se determinó que los resultados obtenidos con la técnica de activación neutrónica en el análisis de estos materiales no presentan diferencias significativas con los valores certificados.

La medida de la actividad de las muestras fue llevada a cabo con un espectrómetro gama conectado a un cambiador automático de muestras y los espectros obtenidos fueron procesados con una tarjeta analizadora multicanal S-100. La información obtenida fue reducida a unidades de concentración a través de un programa especialmente desarrollado en nuestro laboratorio, el que utiliza como soporte el programa EXCEL versión 6.1.

El procedimiento utilizado para el análisis, incluidas las fases de recolección, tratamiento de muestras y determinación analítica se consideró adecuado para el estudio evaluativo de elementos traza en matrices biológicas y especialmente en plasma.

## **II. ABSTRACT**

Besides the classical relationship between iodine and the thyroid function, some associations had recently been described between the metabolism of this gland and other micronutrients like zinc and selenium, that could have important effects in the health. Through the research project FONDECYT 1950734 the characteristics of the interaction between the nutritional status of zinc, selenium and iodine with the thyroid function are being studied.

To evaluate the effects on the thyroid function when simple or multiple zinc, selenium and iodine deficiency are induced, a phase of the research was carried out in experimental animals.

A key aspect in this phase of the project, is the determination of selenium and zinc in the experimental diets and plasma of the animals. To accomplish this determinations an analytical methodology that possess good properties in sensitivity, accuracy and precision for the elements mentioned is required.

In this seminar, the technique of instrumental neutron activation analysis was applied to the analysis of plasma and diets. A clean laboratory (class 100) was used for the preparation of the samples. High purity materials were occupied for sample collection and storage. Irradiation, decay and counting parametes were optimized with the purpose of

reaching the best sensitivity in the analysis. The analytical methodology used was validated by using standard reference materials. Applying the Student's Test, it was determined that the results obtained with the neutron activation technique in the analysis of these materials do not have significant differences with the certified values.

The measurement of the activity of the samples was carried out with a gamma spectrometry equipment connected to an automatic sample changer. Spectra obtained were processed with a multichannel analyzer card S-100. The data were reduced to concentrations units through a program specially designed in our laboratory; this software runs under the EXCEL program, version 6.1.

The procedure used for the analysis, including the phases of collection, treatment of the samples and analytical determination was considered suitable for the evaluative study of trace elements in biological matrices, specially in plasma.

#### **IV. INTRODUCCION**

El avance en el esclarecimiento de los roles de algunos micronutrientes como el selenio y el zinc en el metabolismo, ha sido notable en los últimos años. Un claro ejemplo de esta situación es lo concerniente al selenio. Así, se ha establecido sólidamente su participación en el sistema protector contra el daño inducido por radicales libres a nivel celular, al formar parte estructural de la enzima glutatión peroxidasa. Hasta hace algunos años se creía que el único rol del selenio era el ya descrito, sin embargo, estudios conducidos en forma reciente han confirmado su participación en otras funciones. Una de las que ha despertado más atención es su interrelación con la función tiroidea, ya que se ha identificado que la enzima 5´deyodasa tipo I, que está involucrada en la conversión de T4 a T3 es una selenoenzima.

Experimentos conducidos en animales de experimentación severamente deficientes tanto en yodo como en selenio han demostrado que la deficiencia de selenio potencia los efectos deletéreos de un déficit preexistente de yodo en términos de alteración de la concentración de hormonas tiroideas en plasma, hígado y glándula tiroideas. Estudios pioneros en humanos, conducidos en algunas zonas de Africa donde existe una elevada prevalencia de cretinismo endémico, parecen corroborar las observaciones iniciales en ratas.

En cuanto al zinc, se conoce en la actualidad que está involucrado en el funcionamiento de un alto número de enzimas, algunas de las cuales desempeñan funciones

claves a nivel de la síntesis de ácidos nucleicos; este oligoelemento tiene además un papel directo en la expresión genética al formar parte de los denominados “zinc fingers”. Estas estructuras forman parte de proteínas que regulan en forma específica la expresión de ciertos genes. Por otra parte, se ha descrito una importante función de este micronutriente a nivel de membranas celulares. De esta forma, el zinc participa a múltiples niveles y en varios sistemas en el organismo.

Una importante atención reciben los estudios sobre la relación zinc-sistema endocrino, particularmente en cuanto a la hormona del crecimiento, hormonas sexuales, metabolismo glucídico y hormona tiroidea. En forma reciente se ha agregado otra área de alto interés, como es la de zinc-función tiroidea. Investigaciones conducidas tanto en animales de experimentación como en humanos, han demostrado alteraciones significativas de la función tiroidea en cuadros de deficiencia de zinc. En efecto, en estudios de depleción- repleción de zinc, se observaron niveles reducidos de TSH, T4 total y T4 libre durante la fase de depleción, volviendo los valores a límites normales luego de la repleción con este micronutriente.

Un enfoque moderno del estudio de la función de los nutrientes y las consecuencias de sus desbalances, conlleva la evaluación de los efectos de sus interacciones sobre funciones específicas. A nivel de la función tiroidea, y dada la limitada información disponible, permanecen aún sin respuesta varias preguntas acerca de las consecuencias de distintas combinaciones de interacción entre el estado de zinc, selenio y yodo. Así por

ejemplo, no se conocen los efectos de la interacción de la deficiencia combinada de zinc y selenio sobre la función tiroidea, igual cosa sucede con los efectos de déficit simultáneo de los tres nutrientes (Se, Zn, I) sobre el funcionamiento del tiroides.

Financiado por CONICYT, a través de un proyecto FONDECYT, se está ejecutando un proyecto de investigación que espera responder a las interrogantes planteadas a través de estudios en animales de experimentación y en humanos. Un aspecto de esta investigación contempla el desarrollo de una fase a efectuarse en animales de experimentación, donde se utilizará un diseño de interacciones múltiples que permitirá dilucidar algunas interrogantes pendientes, como las mencionadas, y aportar al conocimiento general de los aspectos fisiológicos que gobiernan la acción de estos micronutrientes.

Para la realización de esta fase se contempla la evaluación de los efectos sobre la función tiroidea cuando se manipula la dieta de los animales de experimentación para inducir una deficiencia simple o múltiple de zinc y selenio.

Un proyecto como el descrito requiere de procedimientos y metodologías analíticas altamente precisas, exactas, sensibles y validadas que permitan determinar con un alto grado de confiabilidad las concentraciones de selenio y zinc en muestras de alimento sintético y en muestras de plasma animal. En el presente trabajo se aplicó la técnica nuclear denominada análisis por activación neutrónica en su forma instrumental en el análisis de las matrices descritas. Se validó la metodología analítica mediante el uso de materiales de referencia y se

aplicaron estrictas normas de “limpieza” en la recolección, almacenamiento y preparación de las muestras, utilizando una sala limpia y materiales de alta pureza.

Los resultados obtenidos fueron analizados a través de las tendencias que se generaron las que se interpretaron a través de gráficas. Los resultados de los análisis de dietas y plasmas se relacionaron y estudiaron en conjunto con otros estudios realizados en el proyecto.

## **V. MARCO TEORICO**

### **1. ASPECTOS NUTRICIONALES DEL ZINC**

La deficiencia de zinc en humanos fue descrita por primera vez por Valle y colaboradores en el año 1956 en pacientes con cirrosis de Laennec (Solomons N, 1988). Luego en 1961, se reporta la ocurrencia de deficiencia de zinc de origen nutricional en un grupo de niños iraníes (Prasad A., 1961). Estas observaciones fueron realizadas mientras se estudiaba en niños del área rural de Shiraz, Irán, la etiología de un síndrome caracterizado por : enanismo, anemia, hipogonodismo, hepatoesplenomegalia, resequedad de la piel, letargo mental y geofagia. Observaciones similares se efectuaron posteriormente en Egipto (Prasad A., 1963). Estos hallazgos constituyeron el punto de partida para la realización de numerosos estudios acerca de los roles de este mineral en el organismo y las consecuencias de diversos grados de deficiencia.

En la actualidad se conoce que el zinc tiene un rol vital en el metabolismo. En gran medida esto ocurre a través de la participación en el funcionamiento de un elevado número de enzimas (alrededor de 200). Algunas de éstas participan en rutas metabólicas de singular importancia, como es el caso de aquellas relacionadas con la síntesis y degradación de DNA y RNA y proteínas (Clegg M., 1989). Sin embargo es también reconocido en la actualidad que no todos los signos observados en cuadros de deficiencia de zinc pueden ser atribuidos a su rol de asociación con enzimas. Bettger (Bettger W., 1993), en una reciente revisión



resume la evidencia acumulada que indica una participación de zinc a nivel de membranas, y la trascendencia de esta función. Específicamente el zinc actuaría a nivel de receptores de superficie, canales iónicos y actividad de algunas enzimas.

En forma adicional al papel, mediado por enzimas, que tiene el zinc en el metabolismo de los ácidos nucleicos, este oligoelemento tiene una participación directa en la expresión genética a través de los denominados “zinc fingers”. Estas son secuencias de aminoácidos que tienen una configuración espacial característica otorgada por la presencia de zinc en algunos puntos claves; estas estructuras forman parte de proteínas que regulan la expresión de ciertos genes (Kurt A., 1987). Debido a la relevancia de la asociación zinc-expresión genética, no es sorprendente que en la actualidad esta área sea centro de una gran actividad de investigación.

Como consecuencia, la participación de este oligoelemento a nivel fisiológico, ocurre en los procesos de crecimiento, maduración sexual, fertilidad, metabolismo de vitamina A, metabolismo de hormonas esteroidales y tiroideas, respuesta inmune, sentido del gusto y apetito, entre otras (Hambidge K., 1989).

## **2. EVALUACIÓN NUTRICIONAL DEL ZINC**

Un factor importante a considerar en el estudio de la nutrición de zinc en grupos de la población, es la dificultad de un diagnóstico preciso, debido a la falta de un indicador

(bioquímico o funcional) que sea lo suficientemente sensible y específico. Ello obliga al uso de una batería de indicadores, siendo altamente deseable además, la evaluación de la respuesta en crecimiento frente a una suplementación con zinc, lo que implica un largo período de observación. Aunque este acercamiento es oneroso, constituye la metodología más sólida, mientras no sea identificado un indicador de uso más simple pero por sobre todo confiable.

Dentro de los indicadores que han sido propuestos, se cuentan: concentración de zinc en plasma, eritrocitos, leucocitos, plaquetas, cabello, orina, saliva, uñas, sudor; concentración de metalotioneína en eritrocito; actividad de enzimas como fosfatasa alcalina, 5 nucleotidasa, enzima convertidora de angiotensina 1, anhidrasa carbónica; pruebas funcionales como adaptación a la oscuridad, agudeza del gusto, quemotaxis de leucocitos in vitro, capacidad de respuesta de hipersensibilidad retardada, entre otros (Gibson R., 1989).

A pesar del importante número de indicadores propuestos, cada uno de ellos por separado presenta algunos inconvenientes en su interpretación. Una discusión detallada de estos aspectos se encuentran en los estudios de Ruz y colaboradores, quienes evaluaron la respuesta de un total de 16 indicadores de nutrición de zinc durante los períodos de depleción y repleción experimental de zinc en adultos (Ruz M., 1992).

### **3. MAGNITUD DE LA DEFICIENCIA DE ZINC EN CHILE**

En parte por las razones señaladas anteriormente, no es fácil especificar la magnitud de la deficiencia de zinc en poblaciones. Estudios conducidos tanto en niños como en adultos de nivel socioeconómico medio-bajo y bajo, han revelado en forma consistente bajas ingestas de este oligoelemento., del orden de 50 a 75 % de la ingesta recomendada (Ruz M., 1985). Además, dadas las características de la dieta de estos grupos, altos contenidos de fitatos y fibras, la absorción de zinc nativo estaría reducido.

En estos estudios, la proporción de sujetos con valores subnormales de los indicadores utilizados fue variable, posiblemente como consecuencia de los inconvenientes propios de los mismos. Sin embargo, las pruebas más sólidas de que efectivamente la deficiencia de zinc estaría presente en algunos segmentos de los grupos sociales más desprotegidos han sido obtenidas con los estudios de suplementación conducidos por varios investigadores y que recientemente han sido resumidos (Ruz M., 1992).

### **4. ASPECTOS NUTRICIONALES DEL SELENIO**

Los estudios acerca de la importancia del selenio para la salud se originan en forma relativamente reciente, cuando se describió en China la asociación entre el estado nutricional deficiente de selenio y la ocurrencia de un tipo de miocardiopatía llamada enfermedad de Keshan, la cual afecta principalmente a niños y mujeres en edad fértil (Keshan Disease

Group, 1979a). Más aún, los síntomas de esta enfermedad pudieron ser prevenidos a través de la suplementación con este oligoelemento (Keshan Disease Group, 1979b). En la actualidad, la información disponible, aunque en muchos casos contradictoria, sugiere algún grado de asociación entre este estado nutricional deficiente de selenio y: cáncer, asma, arteroesclerosis, cirrosis hepática, artritis, distrofia muscular, fibrosis quística, infertilidad, cataratas y retinopatía diabética, entre otras (Robinson M., 1982).

El rol central del selenio en el metabolismo es a través de su participación como parte integral de la enzima glutatión peroxidasa, la cual constituye uno de los mecanismos de protección en contra del daño inducido por el stress oxidativo a nivel celular (Burk R., 1989). Una evidencia más reciente señala que el selenio forma parte de un número importante de seleno proteínas, muchas de las cuales están aún en la etapa de caracterización. Sin embargo, se ha informado que la deficiencia nutricional de selenio en modelos experimentales afecta, en forma independiente de su rol como componente de la glutatión peroxidasa, el sistema de desintoxicación hepática de xenobióticos y algunas funciones relacionadas con la respuesta inmune (inespecífica, humoral, celular y citotoxicidad) (Spallholz J., 1990). Adicionalmente, una función que está recibiendo gran atención es aquella relacionada con el requerimiento de selenio para un normal metabolismo de hormonas tiroideas.

El contenido de Se en los alimentos está fuertemente relacionado condicionado por el tipo de suelos, especialmente en cuanto a sus características de pH, capacidad de fijación

de selenio y actividad microbiana (Gissel-Nielsen G., 1984). También afectan el contenido de selenio de los alimentos, las condiciones climáticas, tipo de fertilizantes y la forma química del selenio presente (Gissel-Nielsen G., 1984). Estos factores ocasionan que el contenido de selenio en los alimentos, especialmente en aquellos de origen vegetal, sea muy heterogéneo, presentando una distribución geográfica particular, haciendo a la vez poco confiable el uso de tablas de composición de alimentos de origen foráneo.

Los efectos de estas diferencias en el contenido de los alimentos son dramáticos, lo que se evidencia en las ingestas habituales de selenio en los lugares ya señalados. Por ejemplo, información obtenida en China, indica que la ingesta promedio de selenio puede ser desde 11 ug/d (microgramos/día) en zonas donde los suelos poseen muy bajo contenido de selenio, hasta cifras de 4990 ug/d en áreas seleníferas (Diplock A., 1987). Datos provenientes de distintos países señalan que las ingestas habituales de selenio se ubican entre los 20 y 300 ug/d (Diplock A., 1987). La ingesta recomendada de selenio en adultos, es de 70 ug/d en hombres y 55 ug/d en mujeres . Los mejores alimentos aportadores de selenio en la dieta son los mariscos y carnes. Los granos proporcionan una cantidad variable dependiendo de las características del terreno de cultivo. Las frutas y verduras, usualmente son aportadores modestos de este oligoelemento (Mason A., 1988).

## **5. EVALUACIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL DE SELENIO.**

Para la evaluación del estado nutricional de selenio en humanos se dispone de una batería de indicadores, sugiriéndose el empleo simultáneo de más de uno para una adecuada descripción de la situación nutricional. Dentro de los indicadores propuestos se cuentan: Concentración de selenio en suero o plasma, plaquetas, eritrocitos, sangre total, orina, uñas y cabello. Se recomienda la inclusión de una prueba de tipo funcional, como es la determinación de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa, ésta se encuentra dramáticamente disminuida en situaciones de ingestas bajas de selenio por tiempos prolongados (Levander O., 1985).

## **6. MAGNITUD DE LA DEFICIENCIA Y/O TOXICIDAD DEL SELENIO EN CHILE.**

Los problemas ocasionados por ingestas inadecuadas de selenio pueden ocasionar efectos negativos tanto por déficit como por exceso. A nivel mundial se han descrito zonas de bajo selenio donde se han reportado signos compatibles con el déficit nutricional de este oligoelemento. Tal es el caso de Nueva Zelandia, Finlandia, China y Zaire. Por otra parte, existen zonas en el mundo donde los problemas son ocasionados por exceso de selenio, como es el caso de algunas regiones de los Estados Unidos y muy especialmente en Venezuela y China (Levander O., 1987).

En Chile, la información disponible es sólo de carácter preliminar y fue proporcionada a través de un proyecto FONDECYT finalizado el año 1994. En esta investigación se exploraron las relaciones entre las características de distintas zonas geográficas y el estado nutricional de selenio. Con el desarrollo de este proyecto fue posible determinar, usando alimento como indicadores, que la distribución del contenido alimentario de selenio es mucho más variable que la de otros micronutrientes, llegando a existir notables diferencias, de hasta 10 veces al comparar la zona más baja (localidades de la zona sur) con aquella donde el contenido fue el más alto (localidades en el extremo norte). La región metropolitana se ubicó en un lugar intermedio.

## **7. INTERACCION NUTRICION-SISTEMA ENDOCRINO**

A medida que las carencias nutricionales más extremas pueden ser controladas, se hacen evidentes algunas asociaciones o condiciones hasta ese entonces desconocidas, o que no habían generado suficiente atención. Tal es el caso del estímulo notable que en los últimos años ha tenido el área de los roles metabólicos de los llamados elementos traza u oligoelementos. Dentro de los campos que han generado mayor atención está la asociación entre algunos oligoelementos y la función endocrina. Algunos ejemplos lo constituyen: a) zinc y hormona del crecimiento y factores de crecimiento, b) zinc y cobre y hormonas sexuales, c) zinc, cobre y selenio y función adrenal, d) zinc, cromo, manganeso y metabolismo de hidratos de carbono, e) zinc y hormona tiroidea, entre otros (Bunce G., 1989).

Otra área de interacción nutrición-endocrinología es la correspondiente a elementos traza y función tiroidea. La asociación entre yodo y función de la glándula tiroidea es conocida desde hace muchos años. Resulta frustrante sin embargo, que a pesar de conocerse con detalles el importante rol del yodo en el metabolismo, al formar parte estructural de las hormonas tiroideas, la deficiencia de yodo continúa siendo a nivel mundial una de las carencias más prevalentes. Basta señalar que alrededor de 200 a 300 millones de personas en todo el mundo presentan bocio y un número cercano a seis millones manifiestan cretinismo endémico (International Council for Control Iodine Deficiency, 1990).

Afortunadamente, Chile presenta una situación de bajo riesgo en este sentido. La información más reciente acerca de la prevalencia de bocio en escolares, señala que de una cifra del orden de 19 % en 1982, se produjo una disminución siete años después de haberse iniciado un programa de yodación de la sal a nivel nacional, a valores cercanos a 8 % (Pozzo M., 1989). Cabe señalar sin embargo, que la prevalencia de bocio no siempre es proporcional al déficit de yodo, sino que hay otros elementos que deben ser considerados, como es el caso de la existencia de algunos bocígenos naturales como los tiocianatos, además de factores de origen genético que condicionan la aparición de esta manifestación (Muzzo S., 1984).

En cuanto a posibles efectos de deficiencia de otros nutrientes específicos, aparte del yodo, algunos autores han descrito asociaciones entre zinc y la función tiroidea y selenio y



función tiroidea, los que han despertado gran interés por las consecuencias que ellas podrían representar.

## **8. INTERACCION ZINC-FUNCION TIROIDEA.**

En los clásicos estudios conducidos en Egipto e Irán en la década de los 60, se realizaron algunas observaciones aisladas de interés, como por ejemplo la reportada por Sandstead y colaboradores (Sandstead H., 1967). Estos autores señalaron una alta prevalencia de bocio entre los sujetos que presentaban el síndrome de enanismo y anemia causado por deficiencia de zinc. Estas observaciones pasaron inadvertidas hasta 1980, cuando Morley (Morley J., 1980) encontró que la deficiencia de zinc en ratas disminuía los niveles de T3 más allá de lo que era inducido por una simple restricción energética de la dieta.

Otras observaciones de interés son por ejemplo, las de Aihara y colaboradores (Aihara K., 1984), quienes reportaron variaciones de algunos parámetros de estado de zinc en pacientes con distintos tipos de patología tiroidea. El estudio realizado por Wada y King en 1986, entregó una interesante pieza de información. En este, se produjo una depleción experimental de zinc en sujetos adultos, quienes fueron luego sometidos a un período de repleción. Los niveles de TSH, T4 total y T4 libre tendieron a ser más bajos durante el período de depleción y a retornar a los valores iniciales después de la repleción.

## 9. INTERACCIÓN SELENIO-FUNCIÓN TIROÍDEA

Las observaciones acerca de la relación selenio-función tiroidea son recientes. En 1987 Goyens y colaboradores (Goyens P., 1987) estudiaron dos áreas de Africa absolutamente comparables en todos los parámetros, excepto en la prevalencias de bocio y cretinismo; encontrándose que el estado nutricional de selenio estaba significativamente más deteriorado en la zona de alta prevalencia de bocio y cretinismo. Se sugirió la hipótesis que el desarrollo de cretinismo de tipo mixidematoso sería el resultado del aumento exagerado de peróxidos, los cuales, debido a una actividad disminuida de la enzima glutatión peroxidasa, superarían la capacidad de control de los mecanismos protectores produciéndose así la atrofia de la glándula tiroides (Corvilain B., 1993).

Otros autores han encontrado que el selenio además de su rol como parte de la enzima glutatión peroxidasa, participa en el metabolismo de las hormonas tiroideas a nivel extraglandular. En 1987, un grupo de investigadores del Rowett Research Institute en Escocia, agregan una pieza de información que ha dado un impulso insospechado en esta área. Una serie de estudios de este grupo demostró que el selenio es parte integral de la enzima 5' deiodinasa tipo I, la cual convierte T4 en T3 a nivel de hígado y riñon (Beckett G., 1987). Cabe señalar que estas son las fuentes cuantitativamente más importantes de generación de T3. Esta misma enzima participa en la degradación posterior de T3.

## 10. QUIMICA ANALITICA DE TRAZAS

La problemática descrita, estimula e intensifica el desarrollo de nuevas técnicas y métodos analíticos introduciendo nuevas dimensiones en el campo de la química analítica. Así, los métodos analíticos a nivel de trazas son cada vez más indispensables para todo tipo de investigaciones científicas. Nuevos métodos tales como diferentes modos de activación neutrónica (Muñoz L., 1993) y de espectrofotometría de absorción atómica (Bruhn C., 1987), compiten con métodos básicamente antiguos, pero recientemente revisados y actualizados, tales como polarografía y voltamperometría (Stegen S., 1992), fluorescencia de rayos x, espectrometría de masas, espectroscopía de emisión, colorimetría automatizada, métodos cromatográficos modernos, etc.

En muchos laboratorios, principalmente de servicios, el análisis clásico realizado generalmente por personal experto y con años de experiencia, ha sido reemplazado por un moderno equipamiento y por personal menos especializado originando, en algunas ocasiones, una gran cantidad de resultados erróneos. Esto queda de manifiesto cuando se evalúan los resultados de ejercicios de intercomparación. Algunos resultados del análisis de ciertos materiales biológicos (Cd, Cu, Zn, y otros elementos en harina de soya y tabaco) fueron evaluados por el autor de este seminario (Gras N., 1993) obteniendo grandes desviaciones tanto en bajas como en altas concentraciones.

Stoeppler (Stoeppler M., 1985), recientemente concluyó que el análisis de elementos a nivel de trazas realizado por laboratorios sin experiencia, más parece un juego riesgoso, imprudente o temerario con un final impredecible, que un proceso de laboratorio bien definido y exacto. Esto obliga a considerar con suma precaución los resultados de publicaciones que informan datos analíticos en distintas áreas de la investigación, especialmente cuando son citados solo como referencias. Son muchas las razones que se esgrimen para justificar los errores cometidos; estos van desde la utilización de un sólo método de análisis, sin la comprobación de la existencia de errores sistemáticos y sin la utilización de materiales de referencia, hasta personal inexperto que maneja como una “caja negra” equipamiento de alto costo en laboratorios que no poseen áreas limpias ni procedimientos adecuados de manejo de muestras.

En el desarrollo analítico del presente seminario se tuvieron en cuenta las consideraciones descritas, las que junto con la aplicación de la técnica de análisis por activación neutrónica instrumental como metodología analítica y la utilización de una sala limpia clase 100 con materiales de cuarzo, de titanio y contenedores de teflón permitieron eliminar los riesgos de contaminación durante la ejecución de los análisis.

## **11. CONCEPTOS GENERALES DEL TRABAJO EN SALAS LIMPIAS**

El material particulado está compuesto por pequeños trozos de materia los que usualmente presentan dimensiones microscópicas. Este puede ser cualquier material,

orgánico o inorgánico y puede encontrarse en gases, líquidos o sólidos y también como material suspendido o decantado (Niper John, 1985). Cuando está suspendido en un gas se le denomina aerosol y cuando está en un líquido, suspensión. Cuando está decantado en el fondo de un líquido se le denomina precipitado y cuando está suspendido en un sólido, materia ocluida.

Cuando se trata de determinar la fuente del material particulado se deben tener en cuenta varios factores, tales como, tamaño, forma y dureza. De estos, sin duda que el más importante es el tamaño, ya que a menudo es el tamaño del material particulado el que determina el grado de problema que potencialmente puede provocar.

La unidad de medida convencional para partículas finas es el micrón, el cual es la millonésima parte de un metro. Las moléculas tienen un diámetro aproximado de 0.001 micrón y el cabello humano usualmente un diámetro de 20 a 200 micrones. El material particulado comunmente está en un rango que varía entre 0.01 micrón y 1000 micrones. Finalmente, el tamaño de la partícula es la característica más importante ya que está directamente relacionado con la capacidad que posee de contaminar.

Contaminación es cualquier sustancia extraña que puede provocar un efecto perjudicial en cualquier procedimiento que se está tratando de realizar. Específicamente, contaminación por material particulado es cualquier objeto que se puede distribuir en el aire en la forma de partículas finas. Algunas de las partículas pequeñas pueden permanecer

suspendidas en el aire indefinidamente, pero las más grandes, tales como arena, suciedad, cabellos, hilachas por ejemplo, eventualmente decantan y provocan problemas. En otras palabras, toda contaminación está compuesta de finas partículas, pero no todas las partículas finas son contaminantes.

Una partícula llega a ser contaminante cuando causa problemas, cuando posee las propiedades que ocasionarán daño, cuando pueden llegar o estar en lugares o áreas vulnerables y cuando existe un número significativo de ellas.

Dentro de las fuentes de contaminación más comunes podemos citar las soldaduras, objetos metálicos, pegamentos, moledoras, etc. También se pueden incluir elementos tales como burbujas de aire, granos de arena, impurezas disueltas que luego recristalizan, vidrios, plásticos, líquidos de limpieza que al evaporarse dejan residuos contaminantes. También se pueden mencionar las piezas de instrumentos que producen óxidos metálicos los que pueden crecer por nucleación. Pero sin duda, la principal fuente de contaminación es la provocada por las personas. Estas pueden difundir a través de la piel, el cabello y las emisiones tanto orales como nasales, produciendo una cantidad de partículas por minuto que varía entre 100.000 y 3.000.000, con un diámetro de 0.5 micrones o más.

La mayoría de los equipos fabricados para purificar el aire y eliminar el material particulado usan métodos gravitacionales e inerciales tales como filtración, lavado y precipitación electrostática, los que remueven una buena proporción del material particulado

en un volumen de aire determinado aunque no son capaces de removerlo todo. La eficiencia de los sistemas es de vital importancia ya que en una sala limpia se debe fijar y posteriormente mantener un grado de limpieza determinado. Para esto se deben utilizar filtros de aire.

Uno de los filtros más utilizados son los denominados filtros HEPA (High Efficiency Particulate Air Filter) o también conocidos como filtros absolutos, los que poseen una alta eficiencia en la remoción de material particulado.

Se puede definir una sala limpia como cualquier sala o área en la cual se hace un intento por limitar, controlar y eliminar la contaminación por material particulado. La palabra *intento* es importante ya que, como se detallará, no existen las salas totalmente limpias. Sólo hay grados de limpieza, los que a menudo son suficientemente buenos para los propósitos que se necesitan.

Las salas limpias son necesarias para un gran número de procesos en los que se requieren ambientes limpios. El trabajo en electrónica, en aviones, proceso de alimentos, la pureza de la mayoría de las drogas y productos químicos a menudo se ven alterados por la presencia no deseada de bacterias, virus, partículas sub-micrónicas y condiciones ambientales inadecuadas. Las salas limpias son básicamente una herramienta que permite eliminar eficientemente y en distintos grados, de acuerdo a la calidad de la sala, el material particulado.

Existen dos tipos de salas limpias: las convencionales y las de flujo laminar. En el presente trabajo se abordan conceptos generales para ambos tipos de salas.

En una sala limpia existen sistemas de control de aire a través de los cuales se fijan y luego se mantienen ciertos grados de limpieza controlando la generación de material particulado dentro de la sala. La limpieza de la sala depende de la capacidad que posee el sistema controlador del aire para eliminar los contaminantes de la sala. Existen cuatro factores de los cuales depende esta función: a) La efectividad del filtro; b) El número de veces que se cambia el aire de la sala; c) La distribución del aire dentro de la sala y 4) La generación de una presión adecuada.

La consideración más importante que debe ser tomada en cuenta para lograr una buena eficiencia es tener bajas velocidades de aire entrando a través de grandes áreas (altas velocidades pueden provocar turbulencias y agitación de la contaminación desde el suelo). Una medida estándar para el cambio de aire de una sala limpia es de aproximadamente 20 veces por hora. Algunos estudios indican que sobre esta cantidad, las corrientes de aire agitan más polvo que el que pueden extraer.

En la construcción de una sala limpia se deben considerar algunos factores en la elección de los materiales, tales como:



**Pisos :** Se ha estimado que 150 millones de partículas del tamaño de micrones pueden ser generadas desde el piso desde un área del tamaño de una estampilla. Por esta razón, se debe seleccionar un piso con una gran vida y alta resistencia al rompimiento. Algunos materiales de calidad más utilizados son el vinilo, derivados epóxidos y poliuretano.

**Muros :** Estos no deberían descascararse. Preferiblemente se deben construir de acero inoxidable con terminaciones de plástico laminado o porcelana. También pueden construirse de fibra con terminaciones de pintura epóxida.

**Techos :** Pueden ser fabricados de cualquier material que no acumule o produzca polvo y que sea limpiado fácilmente. Para su elección se debe considerar que no existen riesgos de daño por impactación de objetos. A menudo se recomienda fabricarlo con paneles revestidos de vinilo, con bordes de aluminio. Las luces deben ser fluorescentes pues de esta manera se pueden limpiar fácilmente. También se recomienda que cada posición de trabajo (campana) posea una luz fluorescente.

Por último, a pesar de todo lo considerado, una sala limpia no trabajará efectivamente si no se deja en las manos de personal competente. La contaminación generada por los usuarios y por sus hábitos de trabajo sólo puede ser controlada por los mismos usuarios mediante el uso de protocolos y procedimientos rigurosamente establecidos.

## **12. FUNDAMENTOS DEL ANALISIS POR ACTIVACION NEUTRONICA INSTRUMENTAL (AANI)**

### **12.1 REACCIONES NUCLEARES:**

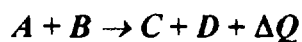
Una reacción nuclear podría definirse como los cambios o transformaciones inducidos en los núcleos por la interacción de partículas nucleares de todo tipo (neutrones, protones, deuterones, partículas alfa, fotones, núcleos pesados, etc.) conducentes a la producción de nuevos núclidos, generalmente inestables y por ende radiactivos, y a la emisión de partículas nucleares iguales o distintas de las iniciadoras de la reacción.

Hay un fuerte paralelismo entre las reacciones químicas y las reacciones nucleares, que tienen en común factores tales como: cambios en el estado energético de los productos intervinientes en la misma, unos requerimientos mínimos de energía para iniciarse la reacción y una velocidad de producción. Asimismo, la similitud continúa en el objeto del estudio de los resultados de las reacciones, que en las nucleares son los productos resultantes de la interacción de los núclidos y las partículas nucleares incidentes, mientras que en las reacciones químicas es la transformación de los reactivos iniciales en los productos finales de la reacción.

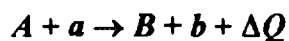
Sin embargo, las diferencias existentes entre ambos tipos de reacciones son importantes (Travesí A., 1975):

- a) Mientras que en las reacciones químicas los productos reaccionantes y finales son átomos completos que sufren transformaciones en su envoltura electrónica sin que se modifique el núcleo, en las reacciones nucleares intervienen directamente el mismo núcleo de los átomos que se transforma por la modificación de las partículas elementales que lo componen.
- b) La escala de energías puestas en juego en ambos tipos de reacciones es fantásticamente diferente, ya que en las reacciones químicas es del orden de unos pocos electrón-voltios (eV), mientras que en las reacciones nucleares es de varios miles o millones de electrón-voltios.
- c) Asimismo, en las reacciones químicas intervienen millones de átomos, mientras que en una reacción nuclear toman parte un número relativamente reducido de núcleos.
- d) También existen diferencias notables en las posibilidades de observación y estudio de ambos tipos de reacciones. Mientras que para el estudio de las reacciones químicas sólo se pueden observar en forma global, estudiando todo su conjunto, en las reacciones nucleares es posible observar el comportamiento de las partículas en forma individual.

La nomenclatura habitual de una reacción química es :



siendo  $A$  y  $B$  los reactivos; y  $C$  y  $D$  los productos finales de la reacción.  $\Delta Q$  es el cambio de energía del sistema inicial y final. Una reacción nuclear escrita de esta forma sería :



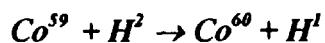
siendo  $A$  el núcleo blanco,  $a$  la partícula nuclear bombardeante o incidente,  $B$  el núcleo producido en la reacción,  $b$  la partícula nuclear emitida, mientras que  $\Delta Q$  es el cambio de energía del sistema.

Abreviadamente la reacción nuclear se representa en la forma:



En esta nomenclatura, primero se indica el núclido objeto de la reacción nuclear, también llamado núclido blanco, seguido de un paréntesis en el que se dan los símbolos abreviados de las partículas nucleares incidentes y emitida, separadas por una coma, y finalmente fuera del paréntesis el núclido resultante. Asimismo, y en la parte superior derecha del símbolo químico del núclido (que evita el indicar el número másico  $Z$  del mismo) se suele escribir en forma de subíndice el número de nucleones  $A$  del mismo.

Por ejemplo, la reacción nuclear producida bombardeando los núclidos de cobalto con deuterones se representaría de la forma siguiente, escrita en forma de reacción química.



Que escrita abreviadamente sería:



Al igual que las reacciones químicas que tienen que estar equilibradas en cuanto al número de átomos en ambos miembros, las reacciones nucleares tienen que estar equilibradas en cuanto al número de masa A y el número de cargas de los núcleos Z, en el balance total de los núcleos y partículas nucleares iniciales y finales de la misma.

Las reacciones nucleares de interés en análisis por activación son aquellas que conducen primordialmente a producir un núclido radiactivo, cuya radiación puede medirse más o menos fácilmente mediante un detector apropiado de la misma. Únicamente presentan interés aquellas producidas por partículas nucleares que pueden obtenerse en el laboratorio y disponer de ellas para la irradiación de las muestras.

Las reacciones nucleares de interés en análisis por activación pueden clasificarse en tres grupos, de acuerdo con el tipo de partículas bombardeantes, que en orden de facilidad de obtención de las partículas es el siguiente: reacciones con neutrones, reacciones con partículas cargadas y reacciones con fotones. En la presente tesis sólo se utilizaron reacciones nucleares con neutrones, por esa razón sólo se hará referencia a este tipo de reacciones.

## 12.2 REACCIONES CON NEUTRONES

El neutrón al interactuar con un núcleo forma un núcleo compuesto, que inmediatamente se desintegra produciéndose la reacción nuclear correspondiente, cuya probabilidad depende en grado importante de la energía cinética del neutrón incidente.

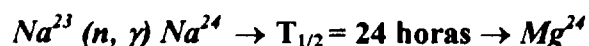
En general, al ser los neutrones partículas sin carga no necesitan vencer la fuerza de repulsión de los núcleos por lo que las reacciones con neutrones tienen una alta probabilidad de ocurrir. El tipo de reacción producida, captura de neutrones, transmutación, dispersión inelástica, o fisión, depende esencialmente de la energía cinética del neutrón incidente y del núcleo bombardeado.

Las reacciones de captura de neutrones o  $(n, \gamma)$  son las más probables con neutrones de baja energía y al incrementarse la energía cinética del neutrón decrece la probabilidad de producirse la reacción de captura. Cuando la energía del neutrón alcanza 2-3 MeV las reacciones de transmutación tipo  $(n, p)$   $(n, \alpha)$  llegan a ser muy probables, especialmente con núclidos de bajo peso atómico.

Aún los neutrones de muy baja energía cinética son capaces de formar núcleos compuestos con una energía de excitación de 6-8 MeV, suministrada íntegramente a expensas de la energía de ligadura del neutrón.

La reacción más común de activación con neutrones es la captura de neutrones o reacción  $(n, \gamma)$ , en la cual un neutrón de baja energía es capturado por el núcleo con la emisión de un rayo gama inmediato a la captura (gama instantáneo).

Un ejemplo típico de esta reacción sería el siguiente:



Obsérvese que la captura de neutrones produce un isótopo radiactivo del mismo elemento blanco que incrementa su peso atómico en una unidad. Sin embargo, la reacción de captura de neutrones no conduce en todos los casos a la formación de un isótopo radiactivo ya que algunos elementos presentan una serie sucesiva de isótopos estables, como el calcio, cuyos isótopos de números de masa 42, 43 y 44 son estables. En este caso la captura de neutrones por los dos primeros núclidos conducirá a núclidos estables y sólo la reacción nuclear del último de la serie, el calcio-44, conducirá a la formación de un núclido radiactivo:



Para cada núcleo compuesto en estado excitado, pueden ser posibles varios tipos de reacciones nucleares, desde el punto de vista energético. Las probabilidades de producirse

cada reacción depende de la cantidad de energía de excitación y de la localización de los centros de energía en el núcleo compuesto y en el núcleo producto. En consecuencia la probabilidad de producirse cada tipo de reacción depende en definitiva de la energía del neutrón incidente y del tipo de núcleo absorbente.

### 12.3 SECCIÓN EFICAZ

El ritmo de producción de una reacción nuclear, o sea el número de reacciones nucleares producidas por unidad de tiempo, es una función dependiente no sólo del número de partículas incidentes por unidad de tiempo y del número de núcleos existentes en el material irradiado por unidad de volumen, sino también de la probabilidad de que la partícula incidente reaccione con un núcleo. Esta probabilidad de que ocurra la reacción nuclear se llama sección eficaz o transversal (cross section, en la literatura inglesa) y depende del tipo de núcleo, del tipo de partícula, de su energía y de la reacción nuclear considerada.

Para profundizar en el concepto, consideremos el caso particular de una reacción nuclear inducida por neutrones. El flujo de neutrones lo definimos como el número de neutrones pasando a través de una superficie de un centímetro cuadrado durante un segundo. Se representa por  $\phi$ . También se puede considerar como el producto de la densidad de neutrones ( $n \cdot \text{cm}^{-3}$ ), número de neutrones por centímetro cúbico, por su velocidad  $v$  en centímetros por segundo ( $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ).



$$\phi = n \cdot v$$

siendo sus dimensiones:

$$n \cdot \text{cm}^{-3} \cdot \text{cm} \cdot \text{s}^{-1} = n \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$$

o sea número de neutrones por centímetro cuadrado por segundo.

Si consideramos que un flujo neutrónico de estas características, homogéneo y constante en el tiempo, atraviesa una capa monoatómica de materia que contiene  $N$  núcleos por centímetro cuadrado, y el número de reacciones nucleares que ocurren en un centímetro cuadrado es  $X$ , podríamos definir la sección eficaz de la reacción nuclear considerada como la probabilidad de que ocurra esa reacción nuclear, o lo que es igual al cociente entre el número de reacciones producidas y el número total de casos posibles dado por  $N$  y  $\phi$ .

$$\sigma = \frac{X}{N \cdot \phi} \frac{\text{número de reacciones producidas}}{\text{número total de casos posibles}}$$

y sus dimensiones serían:

$$\frac{\text{Reacciones (cm}^{-2}) \cdot (\text{s}^{-1})}{n \cdot (\text{cm}^{-2}) \cdot (\text{s}^{-1}) \cdot (\text{cm}^{-2})} = \text{cm}^2$$

Es decir, las dimensiones de la sección eficaz son las de una superficie. Físicamente se puede considerar como el área de la superficie del núcleo que cuando recibiera el impacto del neutrón ocasionaría la reacción nuclear considerada. Si en la ecuación anterior despejamos  $X$ , nos queda:

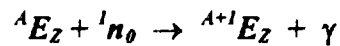
$$X = \sigma \cdot \phi \cdot N$$

Es decir, que el número de interacciones nucleares  $X$  producido en un área de 1 centímetro cuadrado durante un segundo, es directamente proporcional al flujo y al número de átomos existentes, siendo la constante de proporcionalidad precisamente la sección eficaz de la reacción considerada expresada en  $\text{cm}^2$ .

## **12.4 ECUACIÓN GENERAL DE ACTIVACIÓN**

Sabemos que cuando un elemento monoisotópico se bombardea con un flujo de neutrones de una energía determinada se produce una reacción nuclear característica, con una cierta probabilidad dada por su sección eficaz correspondiente. En el caso de la existencia de varios isótopos del mismo elemento, cada uno de los isótopos sufre la reacción nuclear correspondiente con su respectiva sección eficaz y produciendo un radionúclido de características propias y bien determinadas.

La ecuación de la activación con neutrones de un elemento  $E$  de número atómico  $Z$  y de peso atómico  $A$ , se puede escribir así:



O sea se produce un isótopo del elemento  $E$ , con el mismo número atómico  $Z$ , y de un peso atómico una unidad mayor, siempre que nos referimos a la reacción nuclear tipo  $(n, \gamma)$ , o captura de neutrones, la reacción más importante y utilizada en AANI.

La ecuación anterior se puede escribir simplificadamente de la siguiente forma:



siendo  $K$  el número de átomos del isótopo  ${}^A E_Z$  que se transforman en el isótopo  ${}^{A+1} E$  por la acción de los neutrones.  $L$  es el número de átomos  ${}^{A+1} E$  producidos.

El número de átomos del elemento  $L$  que se forman por unidad de tiempo,  $F_L$ , es como sabemos proporcional al flujo neutrónico  $\phi$  y al número de átomos existentes del isótopo estable  $K$ , que llamaremos  $N$ , siendo la constante de proporcionalidad la sección eficaz de activación del elemento  $\sigma$ . Por lo tanto podemos escribir:

$$F_L = \sigma \phi N$$

Ahora bien, el isótopo  $L$  que se forma es radiactivo y se desintegra como sabemos proporcionalmente al número de átomos del mismo, con su constante de semidesintegración característica  $\lambda$ .

Entonces la velocidad de formación neta por unidad de tiempo de los átomos del isótopo radiactivo  $L$ , viene dada por la velocidad de formación menos la de desintegración y podemos escribir:

$$\frac{dN_L}{dt} = F_L - \lambda N$$

sustituyendo  $F_L$  por su valor tenemos:

$$\frac{dN_L}{dt} = \sigma \phi N - \lambda N_L$$

que es una ecuación diferencial de primer orden lineal.

Para conocer el número de átomos radiactivos existentes en el instante de tiempo  $t$ , a partir de la irradiación, hay que resolver la última ecuación e integrarla entre los límites  $t = 0$  y  $t = t$ . La constante de integración  $C$  se calcula sustituyendo en la expresión de la integral por las condiciones iniciales  $t = 0$  y  $N_1 = 0$ , es decir que en el origen de la irradiación no existía ningún átomo radiactivo.

El resultado de estas transformaciones conduce a la ecuación:

$$N_L = \frac{\phi \sigma N}{\lambda} (1 - e^{-\lambda t})$$

pasando  $\lambda$  al primer miembro y considerando que  $N_L \lambda$  es la actividad del isótopo radiactivo en el tiempo  $t$ , nos queda:

$$A_t = N \phi \sigma (1 - e^{-\lambda t})$$

siendo:

$A_t$  : la actividad producida del isótopo  $L$  expresada en desintegraciones por segundo (d.p.s.) en el tiempo  $t$  de irradiación.

$N$  : el número de átomos del núcleo bombardeado existentes en la muestra.

$\sigma$  : la sección eficaz de activación para el isótopo considerado, expresada en barns ( $10^{-24} \text{ cm}^2$ ).

$\lambda$  : es la constante de desintegración del núclido radiactivo formado.

$\phi$  : es el flujo de neutrones o partículas bombardantes expresado en neutrones por centímetro cuadrado por segundo.

La expresión  $(1 - e^{-\lambda t})$  llamada factor de saturación, merece una atención especial. Al aumentar el valor de  $t$  y tender hacia el infinito, el valor de la exponencial  $e^{-\lambda t}$  tiende a cero y el valor del paréntesis o factor de saturación puede alcanzar un valor máximo de la

unidad. Como es conocido que  $\lambda = \ln 2 / T_{1/2}$ , siendo  $T_{1/2}$  el período de semidesintegración del radionúclido producido, el valor del factor de saturación es  $(1 - e^{-\ln 2 / T_{1/2}})$ .

Entonces, el factor de saturación es la relación de la actividad producida en un tiempo  $t$ , a la que se produciría en un tiempo infinito de irradiación, que es la máxima que podría producirse y que se llama actividad de saturación, cuyo valor sería:

$$A_s = N \phi \sigma$$

El tiempo en el cual se alcanza el valor de la actividad de saturación, en el que se llega a un equilibrio entre la formación y desintegración de átomos radiactivos, depende entonces del período de semidesintegración del radioisótopo producido en la activación, dado que la relación entre el tiempo de irradiación y el período de semidesintegración es la que hace que el valor de la exponencial tienda a ser despreciable.

Volviendo a la ecuación que nos expresa la actividad del isótopo producido en la irradiación, consideremos que el número de átomos  $N$  del elemento estable existente en la muestra irradiada viene dado por:

$$N = \frac{6,02 \cdot 10^{23} \cdot W \cdot \theta}{M}$$

siendo:

$6,02 \cdot 10^{23}$  : el número de Avogadro

$W$  : el peso de elemento existente en la muestra irradiada expresada en gramos.

$\theta$  : la abundancia isotópica del isótopo que sufre la reacción nuclear expresada en tanto por uno

$M$  : es el peso atómico del elemento considerado.

Sustituyendo el valor de  $N$  y poniendo los valores de  $\lambda$ , la constante de semidesintegración, en función del periodo de semidesintegración  $T_{1/2}$  nos queda:

$$A_t = \frac{6,02 \cdot 10^{23} \cdot W \cdot \phi \cdot \theta \cdot \sigma (1 - e^{-t \ln 2 / T_{1/2}})}{M}$$

que es denominada “ecuación general de activación” y que nos expresa la actividad absoluta producida durante la irradiación de  $W$  gramos de un elemento, en función de los parámetros que figuran en el segundo miembro de la expresión. Esta actividad se refiere a la actividad producida inmediatamente después del fin de la irradiación. Necesariamente entre el fin de irradiación y el momento de la medida pasa un tiempo  $t$ , por lo que habrá que introducir la correspondiente corrección por desintegración radiactiva, que viene dada por la expresión :

$$e^{-t \ln 2 / T_{1/2}}$$

que al introducirla en la ecuación general, nos queda la ecuación corregida por desintegración radiactiva:

$$A = \frac{6,02 \cdot 10^{23} \cdot W \cdot \phi \cdot \sigma \cdot (1 - e^{-t \ln 2 / T_{1/2}}) \cdot e^{-t_1 \ln 2 / T_{1/2}}}{M}$$

refiriéndose  $A$  a la actividad absoluta producida del radionúclido en una irradiación de un tiempo de duración  $t$ , medida en un tiempo  $t_1$  después del final de irradiación. En la ecuación, el tiempo se puede expresar en cualquier unidad siempre que se exprese en las mismas unidades que el períodos de semidesintegración  $T_{1/2}$  del radionúclido producido, y la actividad  $A$  viene siempre expresada en desintegraciones por segundo.

## 12.5 ANALISIS POR ACTIVACION

El análisis por activación en general podría definirse como un método analítico basado en la producción y la medida de la radiactividad inducida en las muestras mediante bombardeo de las mismas con partículas nucleares. En concreto, en el caso de análisis por activación neutrónica, las partículas nucleares utilizadas para el bombardeo serían los neutrones de una fuente apropiada, como en este trabajo, un reactor nuclear.



Con el bombardeo de las muestras con neutrones los núclidos presentes en las misma sufren reacciones nucleares que conducen a la producción, en mayor o menor grado, dependiendo del núclido y de las características del bombardeo, de productos radiactivos específicos para cada núclido, cuya identificación y medida cuantitativa de la cantidad formada, nos permite no sólo identificar los componentes de la muestra, sino también realizar un análisis cuantitativo de los mismos.

Como se ha mencionado, las reacciones nucleares producidas por neutrones conducen a la formación de un producto radiactivo específico para cada reacción nuclear que depende del núcleo bombardeado y de la energía de los neutrones bombardeantes. Como a su vez cada núclido radiactivo es perfectamente identificable por el tipo y energía de las radiaciones emitidas y por su período de semidesintegración, características únicas para cada núclido y que no se duplican en ningún caso conocido, el análisis por activación es un método muy específico cuando se utiliza en la irradiación de las muestras un solo tipo de partículas y de una energía determinada. Otras características importantes del análisis por activación son su sensibilidad y la ausencia de contaminaciones en el tratamiento posterior a la irradiación.

Entonces, un análisis por activación neutrónica consta fundamentalmente de dos etapas principales: producción de la actividad mediante la irradiación con neutrones y la identificación y medida de la misma mediante detectores adecuados. Sin embargo, como casi todos los núclidos componentes de la muestra producen isótopos radiactivos, es preciso

medir selectivamente la actividad del radionúclido o de los radionúclidos deseados en presencia de otras actividades. Esto es posible realizarlo a través de la técnica de espectrometría gama que utiliza modernos detectores de radiación gama acoplados a cambiadores automáticos de muestras y a microcomputadores.

### 12.5.1 METODO ABSOLUTO

Un despeje matemático en la ecuación general de activación nos permite calcular el peso en gramos  $W$  del elemento irradiado en función de las características nucleares del núcleo blanco y del producto y los parámetros de la irradiación midiendo la actividad del núclido formado:

$$W = \frac{A \cdot M}{6,02 \cdot 10^{23} \cdot \phi \cdot \theta \cdot \sigma \cdot (1 - e^{-\lambda t}) \cdot e^{-\lambda t_1}}$$

Para conocer el peso en gramos del elemento  $W$  existente en la muestra irradiada es necesario conocer, con la mayor exactitud posible, los parámetros del segundo miembro de la ecuación. De todos ellos, quizás los únicos parámetros que se pueden conocer con precisión, son el tiempo de irradiación  $t$  y el tiempo  $t_1$  que transcurre entre el final de irradiación y la medida de la actividad. En cuanto a un parámetro experimental, como el flujo neutrónico  $\phi$ , se hace necesario medirlo para cada posición de irradiación, y su valor, además de estar sometido a cierta imprecisión experimental, puede variar dentro de ciertos márgenes, según la potencia de operación del reactor, disposición de los elementos

combustibles, grado de quemado de los mismos, proximidad de las muestras, etc., de una irradiación a otra. Como consecuencia, los valores del flujo neutrónico  $\phi$  sólo son aproximados y nunca exactos.

Si revisamos las constantes nucleares que intervienen en la fórmula, nos encontramos con que es posible obtener datos precisos y concordantes sólo de los siguientes:

$T_{1/2}$  período de semidesintegración del núclido producto de la reacción.

$M$  peso atómico del elemento que sufre la reacción nuclear.

$\theta$  abundancia isotópica natural del isótopo origen de la reacción.

Sin embargo al tratar de obtener el valor de la sección eficaz de activación  $\sigma$  del isótopo que sufre la reacción nuclear considerada, nos encontramos que los valores que nos ofrece la literatura no coinciden en absoluto, sino que muestran valores muy discrepantes y están en constante revisión y cambio, con lo cual se plantea un serio problema cuando se debe escoger el valor más adecuado. En adición, estos valores han sido determinados experimentalmente y están sujetos a una imprecisión que la mayoría de las veces se desconoce.

Otro parámetro que hace difícil la aplicación del método absoluto es la medida de la actividad  $A$  del núclido producido en la irradiación, la que se refiere a la actividad absoluta del núclido, expresada en desintegraciones por segundo. En la práctica las medidas de la actividad se refieren a medidas relativas y sólo miden una fracción de la actividad absoluta del núclido, fracción que es proporcional a la misma. El valor de la constante de

proporcionalidad depende, entre otras cosas, del tipo y energía de la radiación medida, del tipo de detector empleado, de la configuración geométrica de la muestra, de la configuración geométrica del conjunto muestra-detector, de la eficiencia del detector para la energía de radiación medida, de la relación de desintegración de la radiación medida, de la autoabsorción, etc.

Por esto es preciso o bien realizar una medida absoluta de la actividad, lo cual es una técnica difícil y no siempre posible, o bien utilizar un detector calibrado previamente con núclidos patrones de actividad absoluta conocida, normalizando todos los parámetros de geometría de la muestra detector y obtener experimentalmente la curva de eficiencia del detector en función de la radiación medida para efectuar la correspondiente corrección.

Como es lógico, todo este conjunto de determinaciones experimentales están sujetos a una cierta imprecisión y la posibilidad de errores sistemáticos. Pero aún así, el paso de la actividad medida en nuestro conjunto calibrado a actividad absoluta depende en último término de la relación de desintegración de la radiación que se está midiendo con la actividad total del radionúclido, relación dada por el esquema de desintegración, la que no se conoce con mucha precisión para muchos radionúclidos.

Como conclusión, se puede afirmar que los resultados obtenidos por el método absoluto, están sujetos a una gran imprecisión y pueden estar sometidos a errores sistemáticos importantes, para cada caso concreto, lo que hace que en la práctica el método

absoluto de activación se utilice en raros casos y la mayoría de las veces, como en el presente trabajo, se utilice el método del comparador.

### **12.5.2 MÉTODO DEL COMPARADOR**

Para eliminar los inconvenientes del método absoluto se utiliza el método del comparador, que consiste en irradiar simultáneamente con las muestras desconocidas un peso conocido del elemento o elementos que se quiere determinar y medir la actividad relativa de la muestra y del comparador con el mismo detector y en las mismas condiciones geométricas para ambas muestras y para el conjunto muestra detector.

En estas condiciones podemos ver que todos los parámetros nucleares y de la irradiación que intervienen en la fórmula de la ecuación general de activación son análogos para la muestra y el comparador, independientemente de sus valores absolutos; asimismo dado que las muestras se han irradiado simultáneamente el mismo tiempo, el valor del factor de saturación será el mismo para ambas muestras, como lo será el flujo neutrónico, si la irradiación se realiza en posiciones muy próximas, y en el caso de que hubiese diferencias apreciables, bastará corregir por las variaciones relativas de flujo debidas a la posición de irradiación mediante el empleo de un monitor de flujo neutrónico adecuado.

Asimismo, como las actividades medidas para la muestra desconocida y el comparador se realizan en las mismas condiciones, no importa el valor absoluto de la

constante de proporcionalidad, entre la actividad medida y la actividad absoluta, sino que es el mismo para ambas medidas, independientemente del conocimiento del esquema de desintegración del núcleo medido. Entonces, aplicando la ecuación general de activación tanto para la muestra como para el comparador obtenemos dos ecuaciones similares, que divididas entre sí, después de sustituir los valores de las actividades absolutas para la muestra y para el comparador por sus actividades relativas por la constante de proporcionalidad desconocida, que desaparece al dividir, nos queda la llamada relación de Boyd (Boyd G., 1949):

$$\frac{A_m}{A_c} = \frac{W_m}{W_c}$$

Siendo  $A_m$  y  $A_c$  las actividades relativas medidas en el equipo de detección en las mismas condiciones, correspondientes a la muestra desconocida y al comparador respectivamente. Estas actividades están corregidas por las diferencias de tiempo en la medida de las mismas debido a la desintegración radiactiva, corrección muy fácil de efectuar utilizando el período de semidesintegración del radionúcleo medido.

$W_m$  y  $W_c$  son respectivamente el peso del elemento blanco en la muestra y en el comparador.

De la relación de Boyd se puede despejar fácilmente el peso del elemento a determinar en la muestra desconocida :

$$W_m = W_c \cdot \frac{A_m}{A_c}$$

El método de análisis por activación utilizando comparadores es el más utilizado y generalmente aceptado por todos los autores, debido a su simplicidad e independencia de las constantes nucleares del núclido bombardeado y del producto de la reacción. Requiere únicamente irradiar los comparadores de peso conocido simultáneamente con las muestras en posiciones muy próximas donde reciban el mismo flujo neutrónico o bien corregir con monitores si existen diferencias apreciables del flujo y procesar y medir las muestras y los comparadores en el mismo detector y en las mismas condiciones.

## **12.6 CARACTERISTICAS DEL ANALISIS POR ACTIVACION NEUTRONICA INSTRUMENTAL**

Las características más atractivas del AANI son (Bode P., 1996):

- (i) El método no es destructivo. No hay necesidad de convertir la muestra en una solución previo al análisis.
- (ii) Existen muchos parámetros experimentales que pueden ser optimizados para alcanzar los mejores límites de detección. La energía y el flujo de los neutrones puede ser modificado lo cual permite una activación selectiva. El tiempo de irradiación se puede modificar a

voluntad con el propósito de realizar activación de elementos con períodos de semidesintegración ( $t_{1/2}$ ) corto. Las diferencias en los  $t_{1/2}$  entre los diferentes radionúclidos es una herramienta para discriminar entre ellos. Las interferencias espectrales pueden ser superadas usando diferentes líneas de rayos gama y más de un radionúclido para identificar los elementos.

- (iii) El método entrega en forma simultánea información multielemental.
- (iv) Para muchos elementos, se obtienen límites de detección que van desde los  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  hasta los  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ .
- (v) El AANI es un método que está basado en procesos que tienen lugar en el núcleo de los elementos. El estado químico y físico de los elementos no tiene influencia en el resultado final.
- (vi) La ausencia de etapas que involucran pre-tratamiento de las muestras y por sobretodo, la naturaleza física de la técnica, razón por cual cada etapa puede ser descrita en forma paramétrica, permite obtener resultados exactos e independientes de la concentración.
- (vii) La ausencia de cualquier etapa que se relacione con pre-tratamiento de las muestras (con los posibles riesgos de introducir contaminación) hace del AANI una técnica muy adecuada para la determinación de concentraciones muy pequeñas.
- (viii) Los elementos C, H, N, y O, macro constituyentes en muchas muestras, son casi insensibles a la activación con neutrones. Esta ausencia virtual permite detectar elementos traza aún en presencia de altas concentraciones de los macroelementos mencionados.

Las principales desventajas del AANI, frente a otras técnicas analíticas son las siguientes:



- (i) Algunos elementos no pueden ser determinados por esta técnica, o al menos no en bajas concentraciones. Por ejemplo, la activación de plomo (Pb) y una posterior medición sólo es posible para cantidades del orden de los miligramos. Para aplicaciones en investigaciones relacionadas con el medio ambiente el límite de detección de esta técnica , para el Pb, es inadecuado.
- (ii) El AANI no es adecuado para la determinación de trazas en muestras de agua sin una previa pre-concentración de las muestras.
- (iii) Este método, como otros métodos elementales, sólo entrega información sobre concentraciones totales de elementos. No especifica el estado físico o químico.
- (iv) Para elementos que generan isótopos de  $t_{1/2}$  largo, el tiempo de total de análisis es muy largo, del orden de 3 a 4 semanas.
- (v) El AANI no está disponible para cualquier laboratorio químico ya que requiere de instrumental altamente sofisticado.
- (vi) El laboratorio donde se realiza el AANI debe contar con los requerimientos legales para seguridad radiológica. Esto puede implicar altas inversiones cuando se desea implementar un laboratorio. Se debe contar con un oficial de protección radiológica y con lugares especiales para disponer el material radiactivo de desecho. Los analistas deben ser entrenados en aspectos de seguridad radiológica y en los aspectos prácticos del manejo de la radiactividad.

(vii) La combinación de un método físico y un análisis químico requiere de un acabado conocimiento de ambas disciplinas para una operación efectiva. No todos los laboratorios de AAN están conformados por equipos multidisciplinarios.

(viii) La necesidad de contar con un reactor nuclear.

## **VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL**

### **VI.1 MATERIALES Y METODO**

#### **Materiales**

- Frascos de polietileno. ZEPHIR.
- Cápsulas cilíndricas de polietileno de alta densidad.
- Material de vidrio (matraces, pipetas,...). Clase A.
- Papel de aluminio. ALUSA.
- Guantes de plástico desechables. CLINIC-AID.
- Alambre de hierro, 99.87 % de pureza. Reactor Experiments INC.
- Cápsulas de cuarzo de alta pureza. VITREOSIL.

#### **Equipos**

- Reactor Nuclear RECH-1 tipo Herald (5 MW de potencia). FAIREY ENGINEERING, ENGLAND.
- Balanza analítica. METTLER H54AR (sensibilidad 0,01 mg).
- Balanza de torsión. WHITE ELECT. IND. Co. LTD.
- Laboratorio de Espectrometría gama con el siguiente equipamiento:

- ◇ Analizador multicanal Serie 85, Canberra y electrónica asociada.
- ◇ Analizador multicanal Serie 40, Canberra y electrónica asociada.
- ◇ Tarjeta multicanal S-100
- ◇ 2 Detectores de Germanio-Litio
- ◇ Detector de Germanio hiperpuro.
- ◇ Cambiador automático de muestras.
- ◇ Computador PC con Software para control de cambiador automático de muestras, para análisis de espectros gama y para tratamiento estadístico de resultados.

### **Reactivos**

- Materiales de referencia Animal Blood IAEA-A-13, Pig Kidney BCR-CRM-186 y Oyster Tissue NIST-SRM-1566 A.
- Acido Nítrico 65 % p. a. MERCK.

## VI.1.1 ESTUDIO EXPERIMENTAL Y MUESTREO

Se utilizaron ratas de ambos sexos de 21 días de edad de la cepa Wistar del vivero del Departamento de Nutrición de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Al momento del destete (21 días) las ratas fueron ubicadas en jaulas individuales especialmente adaptadas para permitir un ambiente libre de contaminación. Tanto la dieta como el agua de bebida (agua desionizada) se les entregó *ad libitum* durante un período de seis semanas. Al finalizar este período se les sometió a las determinaciones que luego se detallan.

En relación a cada uno de los nutrientes de interés se formaron dos grandes categorías: una en que el contenido de nutrientes en la dieta es adecuado (+), y otra donde el nutriente de interés se encuentra en déficit (-). Para cubrir todas las posibilidades de interacción, se formaron un total de 8 grupos experimentales. Cada grupo estuvo constituido por un mínimo de 12 ratas. Los grupos fueron:

A) Zn (+)	Se (-)	I (+)
B) Zn (+)	Se (+)	I (-)
C) Zn (-)	Se (+)	I (+)
D) Zn (+)	Se (-)	I (-)
E) Zn (-)	Se (-)	I (-)
F) Zn (-)	Se (+)	I (-)
G) Zn (-)	Se (-)	I (+)
H) Zn (+)	Se (+)	I (+) (Control <i>ad-libitum</i> )
Z) Zn (+)	Se (+)	I (+) (Control <i>pair-fed</i> )

El grupo H corresponde al grupo control. Debido a que es conocido que la deficiencia de zinc *per se* provoca una disminución significativa del apetito (no así la deficiencia de Se y I), se constituyó un grupo adicional denominado “Control *pair-fed*”

(grupo Z), al cual se le entregó la misma dieta del grupo H pero en la cantidad que es consumida en promedio por las ratas del grupo C.

Todas las dietas tuvieron la misma composición, con la sola excepción de la mezcla mineral. La composición, según el proveedor (DIETS, Inc, USA), se observa en el anexo 1, 2 y 3. Cabe señalar, que a través de las dietas utilizadas, el aporte de energía y nutrientes (salvo las excepciones dadas por el diseño) está de acuerdo a las cifras de ingestas recomendadas para este tipo de animales de experimentación del American Institute of Nutrition (AIN, 1977).

Para asegurar que las dietas cumplieran con las especificaciones del protocolo, se analizaron los lotes de éstas en forma regular para determinar el contenido de selenio y zinc a través de la técnica de activación neutrónica y yodo según AOAC(AOAC, 1980).

Al momento final del experimento, las ratas fueron sacrificadas y se les determinó en sangre:

- Se en plasma mediante activación neutrónica
- Zn en plasma mediante activación neutrónica
- Otros análisis involucrados en el proyecto, tales como
  - Actividad de glutathion peroxidasa en eritrocito (enzima Se dependiente)
  - Actividad de fosfatasa alcalina en plasma (enzima Zn dependiente)

Después de seis semanas de consumo de las dietas experimentales, las ratas fueron sacrificadas y se procedió a realizar las determinaciones especificadas en el párrafo anterior.

Las muestras de plasma fueron recolectadas utilizando jeringas TERUMO, revisadas en cuanto a la probable contaminación por trazas de los elementos de interés, almacenándolas luego en tubos de plástico FALCON con tapa. Todo el material utilizado en la recolección de las muestras fue previamente dejado en  $\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O} = 1:3$ , durante 24 horas, luego enjuagado con agua bidestilada y finalmente secado en estufa, todo esto con el propósito de evitar cualquier riesgo de contaminación.

Las muestras así recolectadas fueron congeladas a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  para su posterior análisis.

#### **VI.1.2 ANALISIS POR ACTIVACION DE DIETAS Y PLASMA**

Los principales parámetros a determinar en el análisis por activación instrumental son los tiempos de irradiación, de decaimiento y de medida. En el presente trabajo estos tiempos fueron determinados experimentalmente sometiendo muestras de plasma a distintos tiempos de irradiación de decaimiento y de medida. Las condiciones óptimas determinadas fueron 24 horas de irradiación, 20 días de decaimiento y 2 horas de medida.

Las distintas dietas suministradas a las ratas, las muestras de plasma descongeladas de las ratas sacrificadas, los materiales de referencia y los patrones de los elementos que se deseaban determinar fueron encapsulados en cuarzo de alta pureza en un laboratorio limpio clase 100 en el Centro de Estudios Nucleares La Reina. Un laboratorio clase 100 es aquel que contiene un máximo de 100 partículas de polvo de diámetro de 0.5 a 5 micrones por pie cúbico. Este tipo de laboratorio cuenta con sistemas de extracción y recirculación de aire a través de filtros EPA que permiten evitar los riesgos de contaminación cuando se manipula el material que se desea analizar.

Una vez selladas las cápsulas y colocados los alambres de hierro de alta pureza a modo de cinturón, para corregir las diferencias en los flujos neutrónicos del reactor, se procedió a irradiar las muestras con neutrones en el reactor nuclear RECH-1 de la Comisión Chilena de Energía Nuclear. Aproximadamente 200 mg de muestra en el caso de las dietas y 300  $\mu$ l en el suero, fueron irradiados en el reactor nuclear RECH-1 durante 24 horas con un flujo neutrónico térmico aproximado de  $1.2 \cdot 10^{24} \text{ n} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

Como las muestras estaban ubicadas en distintas posiciones en el núcleo del reactor, recibieron distintas cantidades de neutrones, razón por la cual se debieron realizar las correcciones necesarias. Para esto se colocó en cada muestra un anillo de hierro de 0.2 mm de espesor y 99.87 % de pureza. Este alambre se activó durante la irradiación produciendo el radioisótopo  $\text{Fe}^{59}$ , siendo su actividad específica directamente proporcional al flujo



neutrónico recibido por las muestras que se encontraban junto a él, lo que permitió determinar el flujo relativo recibido y realizar las correcciones correspondientes.

Después de irradiadas, las muestras y patrones se dejaron decaer por aproximadamente 20 días antes de ser medidas, esto se realizó con el propósito de eliminar las interferencias espectrales producidas por la radiación que emiten los radioisótopos de periodo de semidesintegración corto generados al mismo tiempo que los radioisótopos de interés. Una vez que las muestras decayeron, se transfirieron a cápsulas de plástico especialmente diseñadas y fabricadas para el cambiador automático de muestras utilizado para el conteo.

La medida de la actividad se realizó durante 2 horas por muestra y para ello se utilizó un espectrómetro gama de alta resolución conectado con un intercambiador de muestras a través de un microcomputador PC. Las características de los radionúclidos que se evaluaron se presentan en la tabla 1.

**Tabla 1. Características de los radionúclidos analizados.**

<b>ELEMENTO</b>	<b>RADIONUCLIDO</b>	<b>ENERGIA DEL RAYO GAMMA (KeV)</b>	<b>PERIODO DE SEMIDESINTEGRACION</b>
Se	<sup>75</sup> Se	265	120 d
Zn	<sup>65</sup> Zn	1115	244 d

Como se mencionó anteriormente, cada muestra fue acompañada por un monitor de hierro, el que permitió realizar las correcciones por la diferencia en el flujo neutrónico recibido por las muestras en las distintas posiciones de irradiación del reactor nuclear. Esta corrección se realiza dividiendo la actividad de cada radioisótopo medido en cada muestra por su correspondiente factor de corrección de flujo  $F_i$ . Este factor de corrección, estimado para cada posición de irradiación se calcula de la siguiente forma:

A cada monitor irradiado se le determinó su peso y su actividad y posteriormente su actividad específica (actividad / peso). Luego se determinó el factor  $F_i$  dividiendo la actividad específica de cada uno de los monitores por la mayor actividad específica.

$$F_i = \frac{A_{\text{esp}_i}}{A_{\text{esp}_i \text{ máx.}}}, \text{ donde:}$$

$$A_{\text{esp}_i} = \frac{A_i}{m_i} = \text{Actividad específica del monitor } i \text{ que acompaña a cada muestra}$$

$A_i$  = Actividad del monitor  $i$ .

$m_i$  = masa del monitor  $i$ .

$A_{\text{esp}_i \text{ máx}}$  = valor máximo de actividad en el monitor  $i$ .

Luego de la corrección por flujo, las actividades fueron corregidas por decaimiento radiactivo. Tanto en las determinaciones de selenio como en las de zinc, se consideró como tiempo de decaimiento el lapso de tiempo transcurrido entre la primera muestra medida y

todas las demás, es decir se consideró como tiempo de decaimiento igual a cero a la primera muestra medida. Para esta corrección se utilizó la ecuación de decaimiento radiactivo (Fridlander G., 1980):

$$A = A_0 \cdot \exp (-0.693 \cdot t_d / t_{1/2}), \text{ donde:}$$

**A** = actividad de la muestra leída a tiempo  $t = t_d$

**A<sub>0</sub>** = actividad de la muestra corregida a tiempo  $t = 0$

**t<sub>d</sub>** = tiempo de decaimiento en horas

**t<sub>1/2</sub>** = período de semidesintegración del radionúclido en horas

Para una mejor comprensión de lo mencionado, se describirán los pasos que se deben seguir para calcular la concentración de un elemento cuando se tienen los datos necesarios.

Para este ejemplo se considerará la determinación de selenio en una muestra de dieta. Para esto se pesaron 0.21 gramos de muestra y 0.18 gramos de un patrón que contiene 20 ppm de selenio. Ambas se irradiaron durante 24 horas en distintas posiciones en el núcleo del reactor. Después de un período de decaimiento de 20 días, ambas se midieron durante dos horas en un espectrómetro gama, en la misma geometría muestra-detector. Los datos obtenidos se presentan en la tabla 2.

**Tabla 2. Datos obtenidos de la medición de una muestra de dieta y un comparador.**

<b>Muestra</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Actividad (cpm)</b>	<b>Desv Std (%)</b>	<b>hora conteo</b>	<b>Tiempo decaimiento (h)</b>
Dieta	0.21	4600	2.3	15:00	0
Comparador	0,18	6200	2.1	17:30	2.5

Es necesario mencionar que el espectrómetro gama entrega una desviación estándar producto de la estadística de conteo, que corresponde a la imprecisión en la medición de la actividad y que es inherente a la técnica de espectrometría gama.

Con esta información se procede a corregir la actividad por flujo neutrónico y por decaimiento radiactivo. Primeramente se debe calcular el factor de flujo  $F_i$ , para lo cual, se pesan y se le determina la actividad a los monitores que acompañaba a cada una de las muestras que se está analizando. Los datos obtenidos y el cálculo de los factores se presentan en la tabla 3.

**Tabla 3. Cálculo de factor de corrección por flujo neutrónico**

<b>Monitor</b>	<b>Peso (mg)</b>	<b>Actividad (cpm)</b>	<b>Actividad/peso</b>	<b><math>F_i</math></b>
Dieta	13.2	3450	261	1
Comparador	12.9	3090	239	0.912

Una vez obtenido el factor de flujo, las actividades de la muestra y del comparador se dividen por el factor que les corresponde. Estas nuevas actividades se corrigen ahora por decaimiento radiactivo, utilizando la ecuación de decaimiento mencionada anteriormente. Así se obtienen las actividades a tiempo de decaimiento  $t = 0$ . Las actividades corregidas se observan en la tabla 4.

**Tabla 4. Actividades de las muestras corregidas por diferencias en flujos y decaimientos.**

Muestra	Actividad corregida por flujo neutrónico	Actividad corregida por decaimiento radiactivo
Dieta	4600	4600
Comparador	6813	6815

Finalmente, con las actividades corregidas y utilizando la relación de Boyd, se puede calcular la concentración de selenio en la muestra:

Concentración de selenio en el comparador = **20 ppm**

· peso del comparador = **0.18 g**

Cantidad de selenio en el comparador = **20 · 0.18 = 3.6 µg**

En la relación de Boyd tenemos :

$$\frac{A_m}{A_c} = \frac{W_m}{W_c}$$

Reemplazando nuestros valores tenemos:

$$\frac{4600}{6815} = \frac{W_m}{3.6}$$

Se calcula un peso del elemento selenio en la muestra de 2.42  $\mu\text{g}$ . Si se divide este peso del elemento por el peso de muestra analizado se obtiene  $2.42 / 0.21 = 11.6 \text{ ppm}$ .

La desviación estándar del análisis puede estimarse a partir de la desviación estándar producto de la estadística de conteo, la que en este caso es igual a la raíz cuadrada de la suma de las desviaciones estándar al cuadrado de la muestra y el comparador,

$$\sqrt{(2.3)^2 + (2.1)^2} = 3.1 \%$$

Las muestras y los patrones fueron medidos utilizando un cambiador automático de muestras y los cálculos anteriormente descritos realizados por un programa diseñado bajo el soporte de EXCEL. Todo esto permite optimizar el uso de los recursos del laboratorio ya que se reducen los tiempos de análisis, si se compara con el tiempo de demora al efectuar los cálculos y el conteo en forma manual.

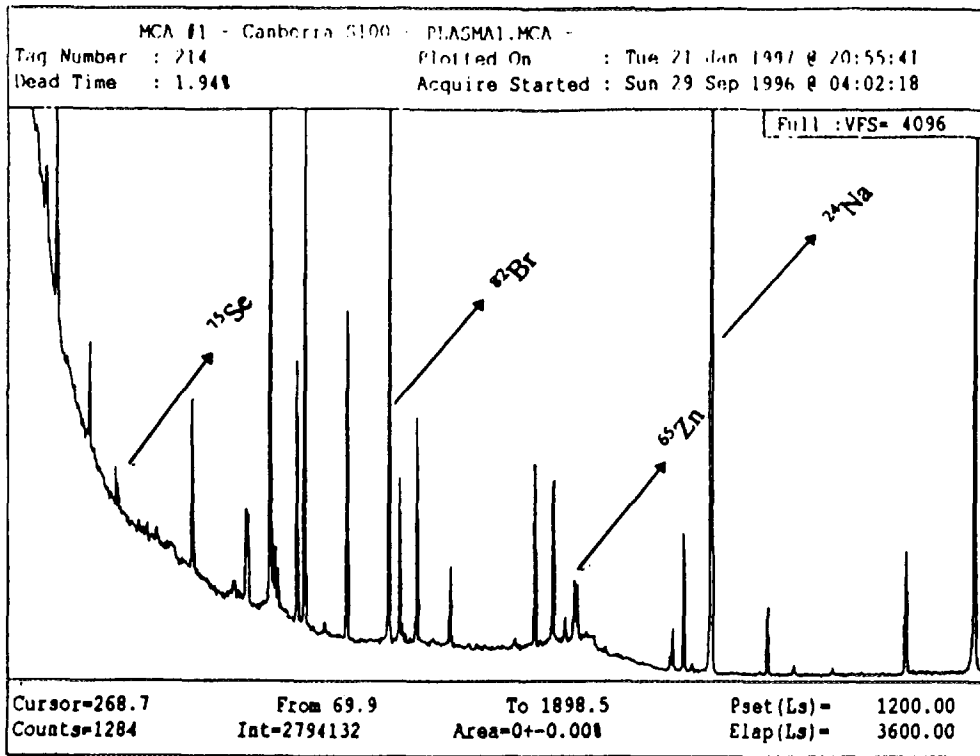
## VI.2 RESULTADOS

Con el propósito de obtener la mejor sensibilidad, precisión y exactitud en los resultados se determinaron experimentalmente los tiempos de irradiación, de decaimiento y de conteo, los que resultaron ser de 24 horas, 20 días y 2 horas respectivamente.

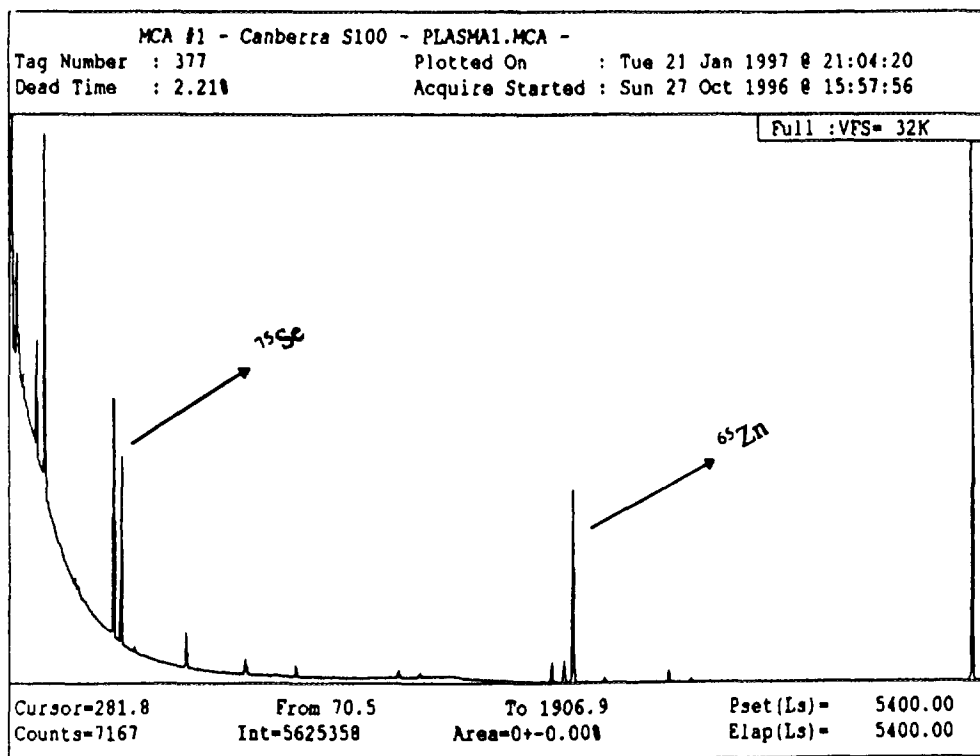
Un tiempo de irradiación menor al utilizado provoca una menor activación de las muestras haciendo disminuir la sensibilidad en el análisis. Una irradiación de más de 24 horas no puede ser llevada a cabo ya que este es el máximo tiempo que opera el reactor nuclear por semana.

Un menor tiempo de decaimiento provocará interferencias espectrales graves debido a la aparición de fotopicos intensos de radioisótopos que poseen un período de semidesintegración menor que el de los radioisótopos de interés. Esto trae como consecuencia la obtención de resultados inexactos. Un tiempo de decaimiento mayor al de 20 días sólo traerá como consecuencia una demora excesiva en la obtención de los resultados, mientras que la mejora en la calidad de los mismos casi es imperceptible.

En las figuras 1 y 2 se observan dos espectros gama de muestras medidas a diferentes tiempos de decaimiento. En estos espectros se puede apreciar como las emisiones gama de algunos radioisótopos como el  $^{24}\text{Na}$  y el  $^{82}\text{Br}$ , que tienen períodos de semidesintegración de 15 horas y 35.3 horas respectivamente, elevan el “fondo” del espectro impidiendo la determinación del rayo gama de 265 KeV de  $^{75}\text{Se}$ . En el espectro gama de la figura 2 se observa que estos radioisótopos interferentes ya han decaído y se puede determinar en buena forma las emisiones gamas de los elementos de interés.



**Figura 1. Espectro gama de una muestra de plasma medida 7 días después de irradiada.**



**Figura 2. Espectro gama de una muestra de plasma medida 20 días después de irradiada**





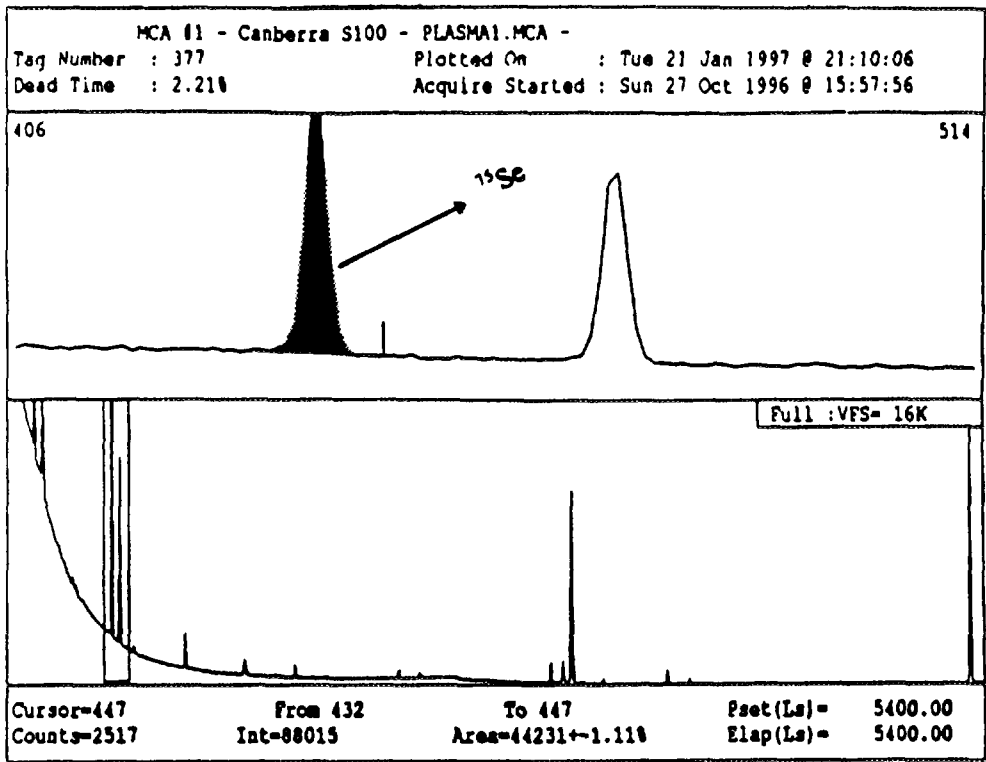


Fig. 4. Espectro gama de una muestra medida 5400 segundos

**Validación del método analítico**

Un método analítico se caracteriza por cuatro cualidades básicas: exactitud, precisión, sensibilidad y selectividad. De ellas, como han reconocido diversos autores (Griepink B., 1989; Maier E., 1990), una buena exactitud es una premisa de todo análisis. No es suficiente, como implícitamente consideran algunos científicos, una buena reproducibilidad. La exactitud es definida por la International Organization for Standardization (ISO) como el grado de concordancia entre el resultado de una medida y el valor verdadero de la cantidad que se ha medido. El problema, evidentemente está en conocer con fiabilidad el valor

verdadero. De acuerdo con B. Griepink (Griepink B., 1990), existen tres caminos para conseguir la exactitud de un método analítico:

- (a) Por comparación con otro método que se considera como referencia.
- (b) Por comparación con otros laboratorios (ejercicios de intercomparación).
- (c) Empleando materiales de referencia certificados.

Para un laboratorio, de estas tres posibilidades, la primera es relativamente arriesgada y costosa porque exige un personal preparado, trabajando con los medios apropiados y siguiendo estrictamente programas de calidad, sin que ello asegure la eliminación de fuentes de errores sistemáticos ya existentes. La segunda posibilidad es también costosa y lenta, necesitándose la participación de muchos laboratorios que hayan demostrado trabajar bajo normas de calidad. El empleo de materiales de referencia certificados constituye la opción más simple, para estimar la exactitud de un método analítico y detectar fácilmente fuentes de errores sistemáticos.

En proyectos relacionados con el análisis de trazas, resulta fundamental validar la metodología analítica que se está utilizando. En el presente trabajo se determinó la exactitud de los resultados obtenidos a través de la utilización de los materiales de referencia Animal Blood IAEA-A-13 del Organismo Internacional de Energía Atómica, Pig Kidney BCR-CRM-186 de la Commission of the European Communities y Oyster Tissue NIST-SRM-1566 del National Institute of Standards and Technology de los Estados Unidos.

Es necesario mencionar que debido a que el análisis por activación neutrónica es un método analítico instrumental, no requiere de tratamiento químico y por lo tanto los efectos de matriz no son importantes. Esto permite utilizar materiales de referencia de origen biológico con una matriz distinta a la de las muestras.

Los resultados de los análisis efectuados a los materiales de referencia utilizando la técnica de activación neutrónica se observan en la tabla 5 y 6.

**Tabla 5. Resultados de los análisis de Zn efectuados a tres materiales de referencia.**

<b>ANIMAL BLOOD IAEA-A-13</b>		<b>PIG KIDNEY BCR-186</b>		<b>OYSTER TISSUE NIST-1566-A</b>	
<b>Zn (µg/g) n = 4</b>		<b>Zn (µg/g) n = 4</b>		<b>Zn (µg/g) n = 4</b>	
Obtenido	Certificado	Obtenido	Certificado	Obtenido	Certificado
<b>14 ± 1</b>	<b>13 ± 1</b>	<b>120 ± 6</b>	<b>128 ± 3</b>	<b>810 ± 24</b>	<b>830 ± 57</b>

**Tabla 6. Resultados de los análisis de Se efectuados a tres materiales de referencia.**

<b>ANIMAL BLOOD IAEA-A-13</b>		<b>PIG KIDNEY BCR-186</b>		<b>OYSTER TISSUE NIST-1566-A</b>	
<b>Se (µg/g) n = 4</b>		<b>Se (µg/g) n = 4</b>		<b>Se (µg/g) n = 4</b>	
Obtenido	Certificado	Obtenido	Certificado	Obtenido	Certificado
<b>0.22 ± 0.04</b>	<b>0.24 ± 0.07</b>	<b>9.9 ± 1</b>	<b>10.3 ± 0.5</b>	<b>2.26 ± 0.27</b>	<b>2.21 ± 0.24</b>

A los resultados obtenidos se aplicó el test t de Student y se determinó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos y los valores certificados. Un resumen de esta aplicación se observa en la tabla 7.

**Tabla 7. Test estadístico t de Student aplicado a los resultados obtenidos con la técnica de activación neutrónica en el análisis de materiales de referencia certificados.**

Elemento	Material de referencia	t calculado	t tabulado (3 grados de libertad y $\alpha = 0.05$ )	¿ Existen diferencias significativas entre los valores ?
Se	Animal Blood	1.0	3.18	NO
Zn	Animal Blood	2.0	3.18	NO
Se	Pig Kidney	0.8	3.18	NO
Zn	Pig Kidney	2.7	3.18	NO
Se	Oyster	0.37	3.18	NO
Zn	Oyster	1.7	3.18	NO

Las condiciones experimentales del análisis de estos materiales fueron las mismas que las de las muestras, es decir 24 horas de irradiación, 20 días de decaimiento y dos horas de medida por cada muestra. Como se mencionó anteriormente, estas condiciones fueron determinadas experimentalmente seleccionándose aquellas en que se obtuvo una mayor sensibilidad, reproducibilidad y exactitud.

En la tabla 8 se observan los resultados de los análisis efectuados a las distintas dietas entregadas por el fabricante y se comparan los valores informados con los determinados.

En la tabla 9 se entrega el detalle de los análisis de todas las mezclas de dietas utilizadas para alimentar los distintos grupos de ratas.

En la tabla 10 se informan los resultados promedio de las muestras de plasma tomadas a los distintos grupos de ratas de experimentación.

**Tabla 8. Concentraciones de Se y Zn en dietas. Valores informados por el fabricante y los determinados por activación neutrónica**

ELEMENTO	DIETAS CON CONTENIDO ADECUADO (mg / kg)		DIETAS DEFICIENTES (mg / kg)	
	Fabricante	Determinado	Fabricante	Determinado
Zn	38	36	< 1	0.65
Se	0.18	0.16	< 0.05	< 0.07

**Tabla 9. Análisis de las dietas que sirvieron de alimentación a los distintos grupos experimentales de ratas.**

DIETAS	Se (ppm)	Desv Std (%)	Zn (ppm)	Desv Std (%)
Dieta A	< 0.08		37	1.7
Dieta B	0.14	15	34	1.8
Dieta C	0.13	15	0.55	14
Dieta D	< 0.09		36	1.6
Dieta E	< 0.07		0.68	10
Dieta F	0.14	15	0.53	13
Dieta G	< 0.069		0.86	9.8
Dieta H	0.16	15	38	1.4

**Tabla 10. Resultados promedio de Se y Zn en muestras de plasma de los distintos grupos experimentales de ratas.**

Grupo Experimental	Se (ppm)	Desv Std (ppm)	Zn (ppm)	Desv Std (ppm)
A	0.0497	0.030	1.7	0.56
B	0.449	0.071	1.6	0.41
C	0.421	0.11	0.48	0.62
D	0.0354	0.020	1.6	0.67
E	0.0784	0.043	0.54	0.41
F	0.372	0.10	0.70	0.76
G	0.0475	0.031	0.501	0.29
H	0.411	0.09	1.5	0.49
Z	0.409	0.11	1.3	0.43

### **VI.3 DISCUSION DE RESULTADOS**

La Comisión Chilena de Energía Nuclear cuenta con una sala limpia clase 100, la que es utilizada principalmente en la preparación y manipulación de muestras biológicas. La sala limpia fue construida de acuerdo a rigurosas normas y cuenta con filtros HEPA de muy buena calidad. En el trabajo en salas limpias, las dos características anteriormente mencionadas no son suficientes ya que la mantención de la calidad de la sala depende del personal que la utiliza, los que deben ser entrenados no sólo acerca de cómo evitar el ingreso de contaminación en la sala sino de limitar la generación de ésta dentro de la sala.

Para un trabajo de buena calidad en una sala limpia se deben definir protocolos acerca de su utilización. Durante el desarrollo del presente trabajo, se definieron algunos procedimientos básicos que fueron respetados estrictamente mientras se manipularon las

muestra de plasma y de dietas. Los procedimientos y especificaciones más importantes fueron los siguientes:

- a) La sala limpia fue considerada un área restringida. Sólo se permitió la entrada a personal autorizado. La entrada de visitas fue sólo autorizada por el supervisor de la sala limpia.
- b) La vestimenta de sala limpia fue usada por todo el personal y visitantes.
- c) La vestimenta de la sala limpia fue desechada cuando se dejó de trabajar al final de una jornada o período. Al retornar al trabajo se debió utilizar ropa de sala limpia lavada.
- d) Quedó estrictamente prohibido fumar dentro de la sala limpia y las salas adyacentes.
- e) No se permitió el uso de productos de papel dentro de la sala limpia al menos que estuvieran forrados con plástico. Esto incluyó cajas, manuales, toallas, etc.
- f) Toda escritura fue realizada con bolígrafo. No se permitió el uso de lápices de grafito o de gomas.
- g) En la sala no se permitió el uso de herramientas.
- h) Se evitó el uso de ropa que produce hilachas, aunque estuviera cubierta con la ropa de sala limpia.
- i) Se prohibió la realización de operaciones que contaminaran la sala limpia, tales como, molienda, tamizado, etc., a menos que se realizaran bajo un sistema de extracción adecuado.



- j) Los usuarios de la sala limpia debieron utilizar mascarilla y cubrecabello en todas las operaciones.
- k) No se permitió el uso de cosméticos.
- l) Los basureros debieron estar cubiertos todo el tiempo. Debieron ser vaciados y lavados diariamente.
- m) Todos los materiales utilizados en la manipulación de las muestras fueron limpiados o lavados antes de ingresarlos a la sala limpia.
- n) Todos los usuarios debieron tener limpias las manos y uñas.
- o) Se utilizó material de laboratorio de teflón, cuarzo, titanio u otro material que impide la contaminación de las muestras.
- p) Se utilizaron reactivos de alta pureza.
- q) Se lavó todo el material en forma exhaustiva de acuerdo a protocolos establecidos.
- r) Se monitoreó la sala limpia en forma periódica con un contador de partículas.
- s) Otros procedimientos menores

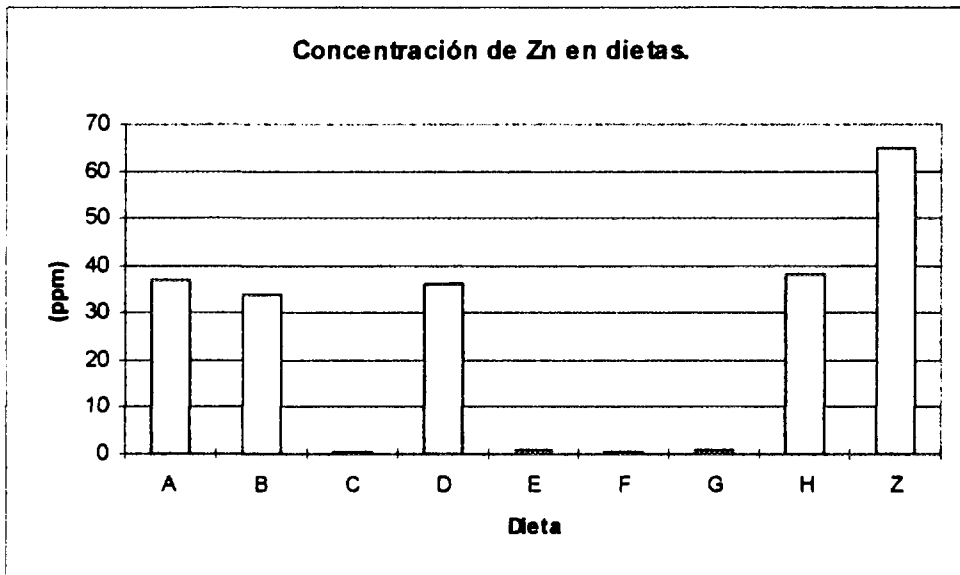
Uno de los objetivos del proyecto original, del cual forma parte este seminario, fue desarrollar un modelo de deficiencia simple y múltiple de Zn, Se y I. Esto comprendió el estudio exhaustivo de los componentes dietéticos a emplear, ya que las fuentes proteicas habitualmente utilizadas poseen cantidades nativas de algunos elementos que hacen posible obtener bajos contenidos de uno, tal vez de dos de estos nutrientes pero no de los tres en forma simultánea. Por esto, se determinó que la única forma de alcanzar este objetivo era a través de la utilización de una mezcla de aminoácidos como fuente de nitrógeno, además de

una mezcla mineral carente de Zn, Se y I., agregándose éstos en forma individual de acuerdo al esquema de conformación de los grupos experimentales.

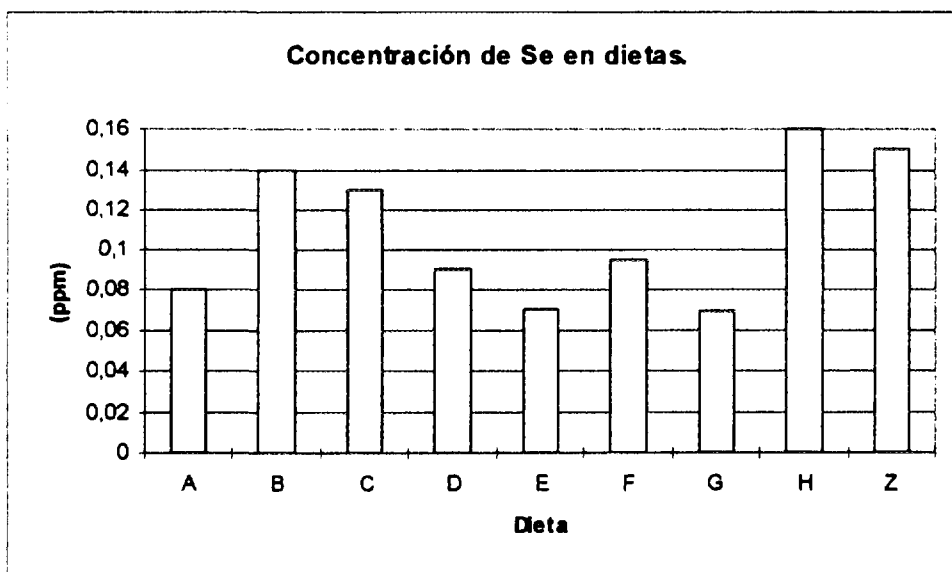
Los análisis efectuados a todas las dietas que sirvieron de alimento a los distintos grupos de experimentación estuvieron completamente de acuerdo con el diseño original y con lo solicitado al fabricante de la dieta base.

Las concentraciones más altas de Zn en las dietas se encontraron en las muestras A, B D H y Z. Las concentraciones bajas en Zn se encontraron en las muestras C, E, F y G. Estos resultados se grafican en la figura 5. En cuanto a Se, los resultados altos se encontraron en las muestras B, C, F, H y Z y los resultados bajo en las muestras A, D, E y G. Estos resultados se grafican en la figura 6.

Los resultados de los análisis de plasmas presentan, en algunos casos, una dispersión de más de un 50% entre los valores de Zn o de Se dentro de un mismo grupo. Esta variabilidad puede parecer alta, pero en este tipo de estudio, donde se privilegian las tendencias, resulta aceptable (Tabla 10).



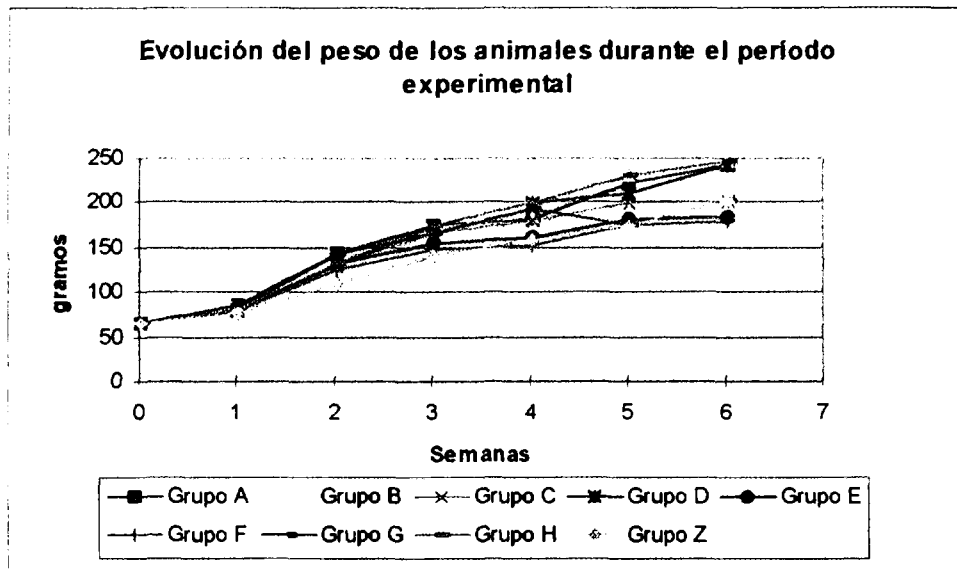
*Figura 5*



Grupos A, D, E y G, expresados como limite de detección.

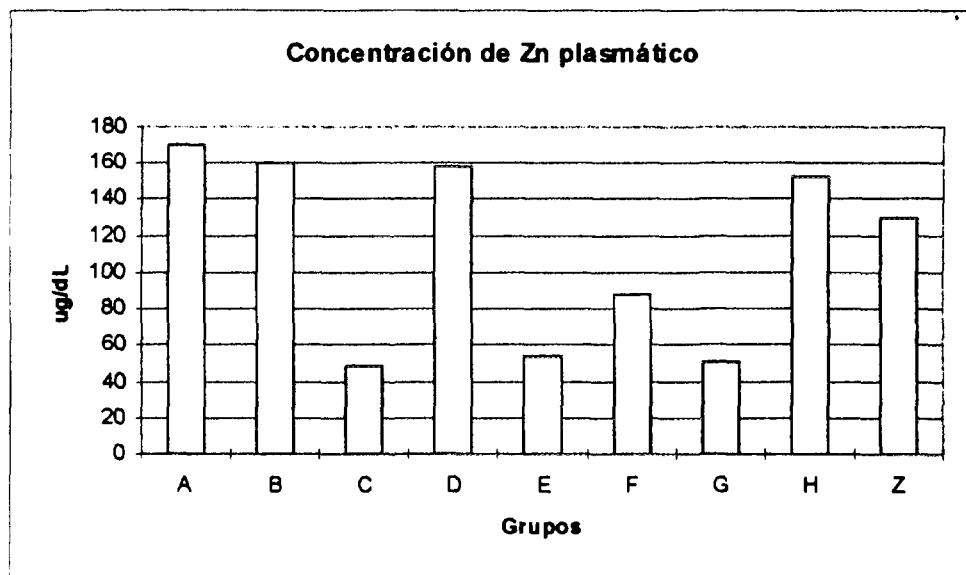
*Figura 6*

El análisis de los resultados mencionados y de otros realizados en forma paralela al presente trabajo, nos permiten apreciar en la figura 7 las curvas de peso de los grupos experimentales ya señalados. Los grupos con deficiencia de Se y/o I, pero no de Zn, crecieron sólo ligeramente menos que el grupo de control alimentado *ad libitum*, situación que contrasta fuertemente con lo observado en los grupos donde el Zn era limitante.

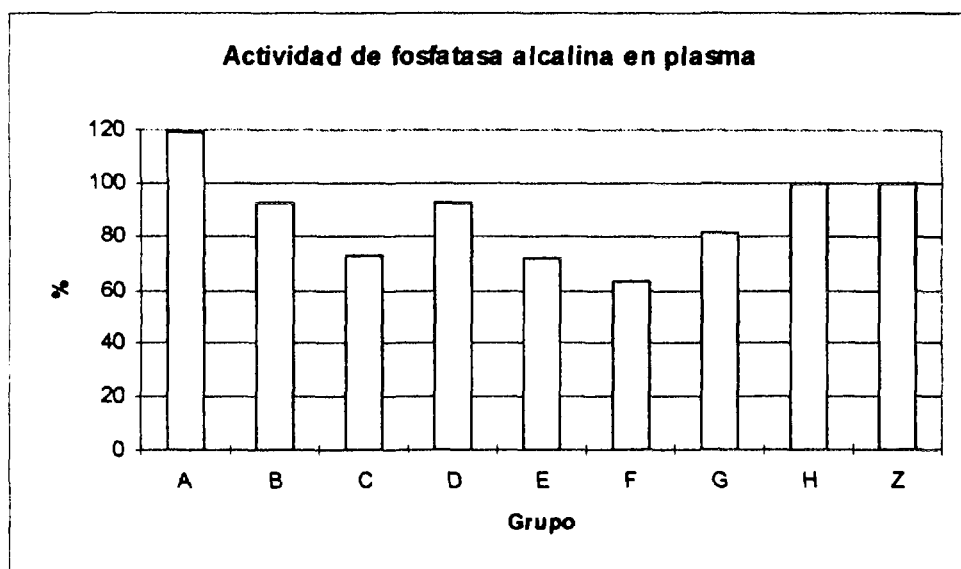


**Figura 7**

Como parámetro de la situación nutricional de zinc, se analizó el contenido de zinc plasmático (figura 8) y la actividad de fosfatasa alcalina (figura 9). En relación a ambos indicadores, los grupos deficientes en Zn (C, E, F, G) mostraron valores notablemente menores que el resto de los grupos, siendo esto mucho más evidente en el caso del zinc plasmático.



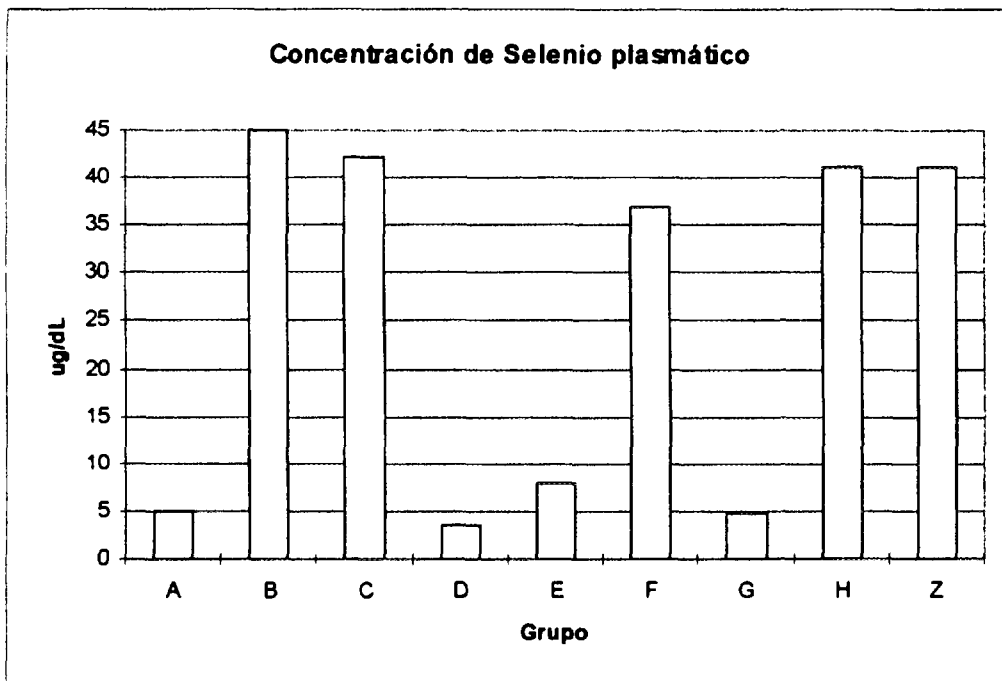
**Figura 8**



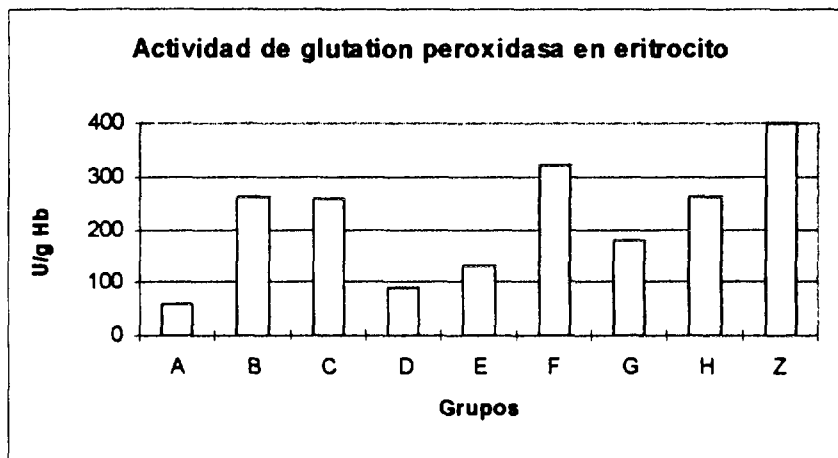
Expresado como % respecto al grupo H (control ad-libitum)

**Figura 9**

En forma similar, los parámetros de situación nutricional de selenio, concentración de selenio plasmático, (figura 10) y actividad de glutatión peroxida en eritrocitos (figura 11) mostraron que los menores valores estaban en los grupos A, D, E y G. En cuanto a los niveles de hormonas tiroideas, estos, al momento del desarrollo de la presente investigación, no se han podido determinar por un retraso en el envío de los anticuerpos específicos desde los Estados Unidos.

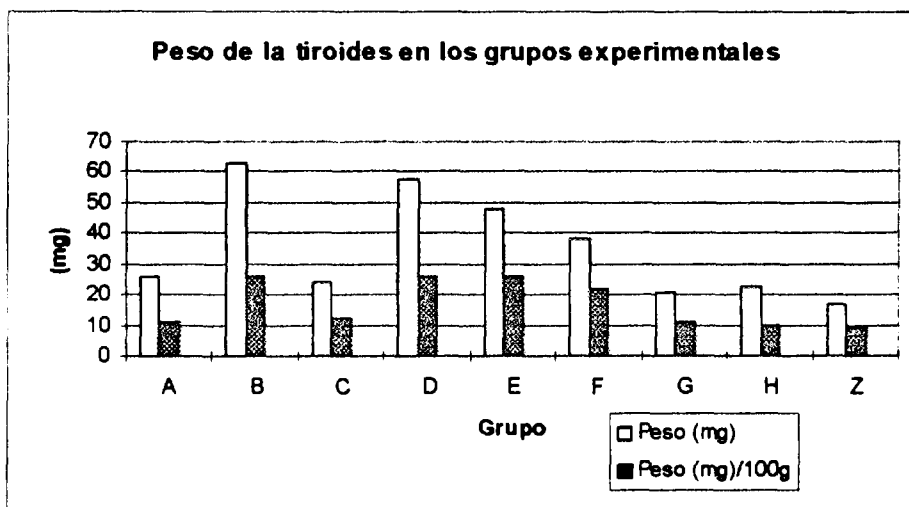


*Figura 10*



*Figura 11*

En la figura 12 se muestran los pesos promedio de la glándula tiroides en los distintos grupos. Como era de esperar, la tiroides es marcadamente mayor en los grupos deficientes en I (B,D,E,F), sin embargo, la magnitud del crecimiento de esta glándula parece estar en alguna medida condicionada por la presencia o no de deficiencia de Zn y Se.



*Figura 12*

## VII. CONCLUSIONES

La metodología empleada resultó adecuada para las necesidades del proyecto. La determinación experimental de los parámetros óptimos de irradiación, decaimiento y conteo permitieron alcanzar excelentes resultados en la sensibilidad, precisión y exactitud en la metodología empleada, lo que fue de gran beneficio para las actividades futuras del laboratorio de Activación Neutrónica de la Comisión Chilena de Energía Nuclear, ya que estos pasaron a formar parte de sus protocolos rutinarios.

El contar con una sala limpia con las características de la utilizada en la presente tesis, acompañada de procedimientos de trabajo adecuados, garantiza la eliminación de cualquier riesgo de contaminación durante la manipulación de las muestras. Este tipo de salas o al menos de campanas de flujo laminar es imprescindible en el análisis de trazas.

Los procedimientos adoptados para el trabajo en una sala limpia resultaron efectivos para reducir los riesgos de contaminación, por lo que tales procedimientos han sido adoptados como parte de los protocolos de rutina del laboratorio.

La utilización de materiales de referencia certificados para la validación de la metodologías analíticas se presenta como la opción más atractiva dentro de las existentes, ya que garantizan la exactitud y se ajustan a un sistema válido de medidas, situación que fue



aprovechada en la presente tesis. El empleo de estos materiales constituye un factor básico en el que se sustenta la calidad de los resultados generados por un laboratorio.

El diseño experimental del proyecto, contemplaba la generación de cuadros de deficiencia simple y combinada de Iodo, Zinc y Selenio, lo cual se alcanzó a juzgar por los resultados obtenidos de selenio y zinc en plasma , selenio y zinc en dietas, actividad de la enzima glutatión peroxidasa, actividad de la enzima fosfatasa alcalina y peso de la glándula tiroides.

El grado de deterioro de la función tiroidea no puede ser evaluado, solo se pesaron las glándulas tiroides en los distintos grupos y se determinó la condicionalidad del crecimiento de esta glándula por la presencia o ausencia de los elementos estudiados.

## **VIII. REFERENCIAS**

Aihara K, Nishi Y, Hatano S, et al. Zinc, copper, manganese and selenium metabolism in thyroid disease. *Am J Clin Nutr* 1984; 40. p 26-35.

AIN. Report of the American Institute of Nutrition ad hoc Committee on Standards for Nutritional Studies. *J Nutr* 1977; 107. p 1340-1348.

AOAC. Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist. AOAC 1980. p 114-115.

Beckett GJ, Beddows SE, Morrice PC, Nicol F and Arthur JR. Inhibition of hepatic deiodination of thyroxine is caused by selenium deficiency in rats. *Biochem J* 1987; 248. p 443-447.

Bode P. Instrumental and Organizational Aspects of a Neutron Activation Analysis Laboratory, Delft University of Technology, 1996.

Boyd G. *Anal Chem.*, 1949; 21. p 335.

Bruhn C, Berndt H. Low temperature hydride furnace modified for the atomic absorption spectrometric determination of metals with low appearance temperatures. *Anal Chim Acta*, 1987; 193. p 361-365.

Bunce GE. Zinc in endocrine function. Mills CF, ed. *Zinc in human Biology*. Springer-Verlag, London, 1989. p 249-258.

Burk RF. Recent developments in trace element metabolism and function: newer roles of selenium in nutrition. *J Nutr* 1989; 119. p 1051-1054.

Cleggs MS, Keen CL, Hurley LS. Biochemical pathologies of zinc deficiency. Mills CF, de. *Zinc in human biology*. Springer-Verlag, London, 1989. p 129-146.

Corvilain B, Contempré B, Longombé AO, Goyens P, Decoster CG, Lamy F, Vanderpas JB and Dupont JE. Selenium and the thyroid: how the relationship was established. *Am J Clin Nutr* 1993; 57. p 244-248.

Diplock AT. Trace elements in human health with special reference to selenium. *AmJ Clin Nutr* 1987; 45. p 1313-1322.

Friedlander G., Kennedy J., Macias E. y Malcolm J., *Nuclear and Radiochemistry*, John Wiley and sons, Inc., New York, 1980.

Gibson RS. Assessment of trace element status. Gibson RS de. Principles of Nutrition Assessment, Oxford University Press, 1989. p 511-576.

Gissel-Nielsen G, Gupta UC, Lamand M, Westermarck T. Selenium in soils and plants and its importance in livestock and human nutrition. Adv Agronom 1984; 37. p 397-460.

Goyens P, Golstein J, Nsombola B, Vis H and Dumont JE. Selenium deficiency as possible factor in the pathogenesis of myxoedematous endemic cretinism. Acta Endocrinol 1987; 114. p 497-502.

Gras N, Muñoz L, Cassorla V. Preliminary Homogeneity study of an in-house reference material using neutron activation analysis and X-ray fluorescence. Fresenius J Anal Chem 1993; 193. p 361-365.

Griepkin B., Fresenius J. Anal. Chem., 1990; 337. p 812.

Griepkin B., Quim Anal., 1989; 1. p 8.

Hambidge KM. Mild zinc deficiency in human subjects. Mills CF, de. Zinc in human biology. Springer-Verlag, London, 1989. p 281-296.

International Council for Control of Iodine Deficiency Disorders. A practical guide to the correction of iodine deficiency. Wageningen, The Netherlands, 1990.

Keshan Disease Research Group. Epidemiological studies on the etiologic relationship of selenium and Keshan disease. *Chin Med J* 1979a; 92. p 477-482.

Keshan Disease Research Group. Observations on effect of sodium selenite in prevention of Keshan disease. *Chin Med J* 1979b; 92. p 471-476.

Klug A, Rhodes D. "Zinc Fingers": a novel protein motif for nucleic acid recognition. *Trends Biochem Sci* 1987; 12. p 464-469.

Levander OA. A global view of selenium nutrition. *Ann Rev Nutr* 1987; 7. p 227-250.

Levander OA. Considerations on the assessment of selenium status. *Fed Proc* 1985; 44. p 2579-2583.

Maier E., *Anal. Proc.*, 1990; 27. p 269.

Mason AC. Selenium. Smith KT ed. *Trace minerals in foods*. Marcel Dekker Inc, New York, NY, 1988. p 325-326.

Morley JE, Gordon J, Hershman JM. Zinc deficiency, chronic starvation and hypothalamic-pituitary-thyroid function. *Am J Clin Nutr* 1980; 33. p 1767-1770.

Muñoz L, Gras N, Thieck M, Vanska L. *J Radioanal Nuc Chem Articles*, 1993; 169. p 247-253.

Muzzo S, Aguirre R, Téllez A, Valdivieso S, Leiva L. Bocio Endémico en Pirque. *Rev Chil Pediatr* 1984; 55. p 331-334.

Nappi John. *Clean Room Primer*, Published by Liberty Industries Incorporated, 1985.

Pozzo M, Rodewald A, Biolley E, Zvaighaft A, Leiva L, Muzzo S. Prevalencia de bocio endémico en escolares del centro y sur de Chile. *Rev Chil Pediatr* 1989; 60. p 359-362.

Prasad AS, Halsdted JA, Nadimi M. Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagia. *Am J Med* 1961;31. p 532-546.

Prasad AS, Miale A, Farid Z, Schulert A, Sandstead HH. Zinc metabolism in patients with the syndrome of iron deficiency anemia, hypogonadism and dwarfsim. *J Lab Clin Med* 1963; 61. p 537-549.

Robinson MF. Clinical effects of selenium deficiency and excess. Prasa AS, ed. *Clinical, biochemical and nutritional aspects of trace elements*. Alan R Liss Inc, New York, NY, 1982. p 323-342.

Ruz M, Cavan KR, Bettger WJ, Gibson RS. Erythrocytes, erythrocytes membranes, neutrophils, and platelets as biopsy materials for the assessment of zinc status in humans. *Brit J Nutr* 1992; 68. p 515-527.

Ruz M, Vera G, Araya H. Calidad nutricional de la dieta con respecto a zinc y su relación con la ingesta diaria de preescolares chilenos. *Rev Chil Nutr* 1985; 13. p 13-18.

Ruz M. Efectos de la suplementación con zinc en niños. *Rev Chil Nutr* 1992; 20. p 199-206.

Sandstead HH, Prasad AS, Schulert AR, et al. Human zinc deficiency, endocrine manifestations and response to treatment. *Am J Clin Nutr* 1967; 20. p 422-442.

Solomons NW. Zinc and copper. ShilsME, Young VR, eds. *Modern nutrition in health and disease*. 7<sup>th</sup> de. Lea & Febiger 1988. p 238-262.

Spallholz JE, Boylan LM, Larsen HS. Advances in understanding selenium's role in the immune system. *Ann NY Acad Sci* 1990; 587. p 123-139.

Stegen S, Marin C. *Anales de Química*, 1992. p 239-245.

Stoeppler M. *Pollutans and their ecotoxicological significance*. Edited by H.W. Nurnberg, John Wiley and Sons Ltda. 1985; 2. p 317.

Travesí A. *Análisis por Activación Neutrónica*, Publicaciones Científicas de la JEN, 1975.

Valle BL. Zinc coordination, function, and structures of zinc enzymes and other proteins. *Biochem* 1990; 29. p 5647-5659.



## ANEXO

### *Anexo 1. Composición de dieta experimental en base a aminoácidos.*

INGREDIENTE	DIETA CONTROL (g/kg)
L-Arginina	6.3
L- Histidina	4.5
L-Lisina HCl	16.1
L-Tirosina	9.2
L-Triptofano	2.1
L-Fenilalanina	8.7
L-Metionina	4.5
L-Cistina	3.7
L-Treonina	6.6
L-Leucina	15.3
L-Isoleucina	8.4
L-Valina	9.9
Glicina	3.1
L-Prolina	20.4
L-Acido Glutámico	36.2
L-Alanina	4.5
L-Acido Aspártico	11.3
L-Serina	9.4
Total L-Aminoácidos	180.2
Maicena	399.886
Deytrosa	145
Sacarosa	92.02
Celulosa microcristalina	50
Aceite de Soya	70
TBHQ	0.014
Mezcla mineral *	35
Premezcla Se / Sacarosa (1 mg/g) **	0.18
Premezcla I / Sacarosa (1 mg/g) **	0.2
Premezcla Zn / Sacarosa (5 mg/g) **	7.6
Bicarbonato de Sodio	7.4
Mezcla de vitaminas	10
Bitartrato de Colina	2.5

\* La mezcla mineral no contiene Zn, I, Se.

\*\* 1mg/g de Se a partir de selenato de sodio, 1 mg/g de I a partir de yodato de potasio y 5mg/g de Zn a partir de carbonato de zinc.

**Anexo 2. Mezcla mineral modificada (no contiene Zn, Se, I)**

INGREDIENTE	g / Kg
Carbonato de Calcio	218.5
Fosfato de Calcio	188.2
Fosfato de Potasio	196
Citrato de Potasio	70.78
Cloruro de Sodio	74
Sulfato de Potasio	46.6
Oxido de Magnesio	24
Citrato Férrico	6.06
Carbonato de Zinc	----
Carbonato de Manganeso	0.63
Carbonato Cúprico	0.3
Iodato de Potasio	----
Selenato de Sodio	----
Paramolibdato de Amonio · 4H <sub>2</sub> O	0.00795
Metasilicato de Sodio · 9 H <sub>2</sub> O	1.45
Sulfato de Cromo y Potasio · 12H <sub>2</sub> O	0.275
Cloruro de Litio	0.0174
Acido Bórico	0.0815
Fluoruro de Sodio	0.0635
Carbonato de Niquel	0.0318
Vanadato de Amonio	0.0066
Sacarosa (polvo fino)	172.99625

*Anexo 3. Mezcla de Vitaminas*

INGREDIENTE	g / Kg
Niacina	3
Pantotenato de Calcio	1.6
Piridoxina HCl	0.7
Tiamina HCl	0.6
Riboflavina	0.6
Acido Fólico	0.2
Biotina	0.02
Vitamina E Acetato (500IU/g)	15
Vitamina B12 (0.1%)	2.5
Vitamina A Palmitato (500.000 IU/g)	0.8
Vitamina D3 (400 IU/g)	0.25
Vitamina K1/Dextrosa (10 mg/g)	7.5
Sacarosa	967.23