

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y**  
**BIOTECNOLOGICAS**  
**PROGRAMA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUIMICA**



**“DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE *Allium sativum L.* AJO  
SOBRE LOS NIVELES DE PLOMO EN SANGRE Y ÓRGANOS DE  
ANIMALES CON TOXICIDAD AGUDA EXPERIMENTAL.  
AREQUIPA 2012”**

Tesis presentada por os bachilleres:

*Choquenaira Quispe, Celia*

*Gonzales Condori, Ever Renzo*

Para optar el título profesional de:

**QUIMICO FARMACEUTICO**

Asesor: Dr. José A. Villanueva Salas, PhD.

**AREQUIPA – PERÚ**

**2013**

## AGRADECIMIENTOS

Dios tu eres el principal actor de esta obra tan maravillosa todo te lo debemos a ti.

El presente trabajo de tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndonos paciencia, dándonos ánimos, acompañándonos en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad.

A la Universidad Católica de Santa María porque nos dio la oportunidad de formarnos como profesionales de la salud.

A nuestros padres que a pesar de la distancia siempre nos han apoyado en nuestras decisiones y estuvieron atentos al desarrollo del presente trabajo.

Agradecemos al Doctor PhD. José Antonio Villanueva Salas por haber confiados en nosotros, por la paciencia y por el asesoramiento.

A los Mgter. Julitza L. Paredes Fuentes y Stanber Revilla Ramirez por formar parte del desarrollo del proceso de esta investigación.

A nuestros hermanos Abel, Elvis, Katy y Bianca porque siempre nos han apoyado incondicionalmente demostrándonos que nos quieren.

Gracias también a nuestros amigos quienes nos apoyaron y nos permitieron entrar en sus vidas y sobre todo por brindarnos su amistad. Daniela, Karla, Idris, Alejandro, Eleana con E, Paola, Melody y al señor Justito.

## INDICE

	Pág.
<b>CONTENIDO</b>	
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>SUMMARY</b> .....	3
<b>CAPITULO I</b>	
	Pág.
<b>INTRODUCCION</b> .....	5
<b>OBJETIVOS</b> .....	7
<b>HIPOTESIS</b> .....	8
<b>MARCO TEORICO</b> .....	9
<b>1. AJO (<i>Allium sativum</i> L.)</b> .....	9
1.1. Características botánicas .....	9
1.1.1. Descripción morfológica de la especie .....	9
1.2. Hábitat .....	10
1.3. Clasificación taxonómica de la especie .....	10

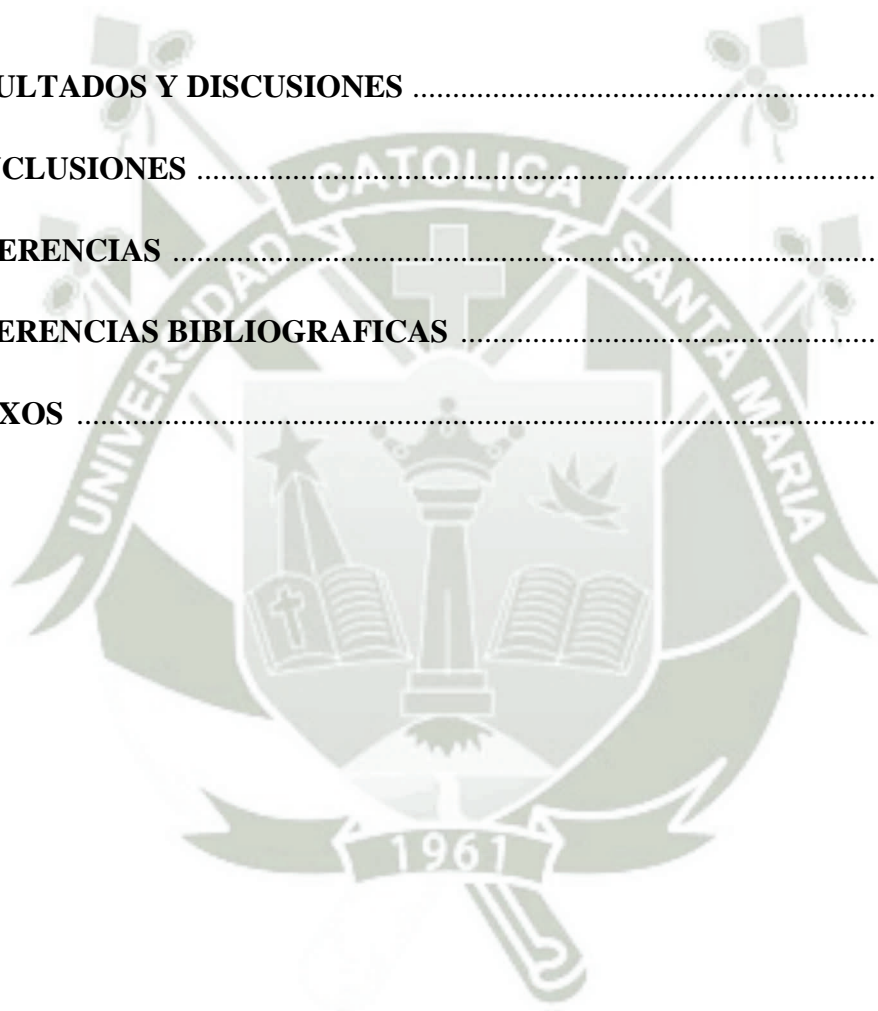
1.4. Composición química .....	10
1.5. Principales constituyentes activos del ajo .....	12
a) Aliina .....	12
b) 2- propentiolsulfonato de alilo .....	14
c) Ajoeno .....	17
d) Disulfuro de dialilo (DADS) .....	19
1.6. Propiedades medicinales del <i>Allium sativum L.</i> (Ajo) .....	21
<b>2. LIOFILIZACION</b> .....	24
2.1. Principios físicos de la liofilización .....	25
2.2. Ventajas de la liofilización .....	26
2.3. Desventajas de la liofilización .....	26
<b>3. METALES PESADOS</b> .....	27
<b>4. PLOMO</b> .....	28
4.1. Etiología .....	28
4.2. Fuentes de intoxicación .....	29
4.3. Formas etiológicas .....	30
4.4. Intoxicación profesional .....	30
4.5. Intoxicación extra profesional .....	32
4.6. Dosis tóxica .....	34
4.7. Fisiopatología .....	35
4.7.1. Toxicocinética .....	35
4.7.2. Mecanismo de acción .....	39
4.7.3. Efectos biológicos del plomo .....	40
4.7.4. Cuadro clínico .....	46

4.7.5. Diagnóstico .....	47
4.7.6. Tratamiento .....	48
4.8. Problemática del plomo en el Perú .....	50
<b>5. ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA – VISIBLE.....</b>	<b>50</b>
5.1. Instrumentación .....	50
5.2. Absorción de luz: ley de Beer – Lambert.....	52
5.3. Desviación de la ley de Beer .....	52
<b>6. VOLTAMPEROMETRIA Y POLAROGRAFIA .....</b>	<b>53</b>
6.1. Introducción .....	53
6.2. Instrumentación .....	54
6.3. Principio de la voltamperometría .....	55
6.4. Métodos voltamétricos .....	56
6.5. Preparación de muestras para análisis de metales .....	60
6.6. Métodos de digestión .....	61
<b>CAPITULO II</b>	
	<b>Pág.</b>
<b>1. MUESTRA .....</b>	<b>66</b>
<b>2. LUGAR DE EXPERIMENTACIÓN .....</b>	<b>67</b>
<b>3. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS .....</b>	<b>67</b>
<b>4. METODOS .....</b>	<b>70</b>

4.1. Métodos analíticos .....	70
4.2. Métodos estadísticos .....	88

### CAPITULO III

	<b>Pág.</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES</b> .....	92
<b>CONCLUSIONES</b> .....	128
<b>SUGERENCIAS</b> .....	129
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b> .....	130
<b>ANEXOS</b> .....	146



## RESUMEN

El objetivo de este estudio fue investigar el efecto de la solución acuosa de ajo en *Rattus norvegicus* inducidas experimentalmente a un cuadro de toxicidad aguda con 100 ppm de acetato de plomo en solución acuosa vía oral, el trabajo se llevó a cabo en el laboratorio H-202 y el Bioterio de la Universidad Católica de Santa María, durante los meses de setiembre a noviembre del año 2012.

El tratamiento de las ratas intoxicadas se hizo mediante la administración de solución acuosa de ajo liofilizado vía oral para la cual, se determinó en forma indirecta la concentración de alicina (2-propentiosulfonato de alilo) del ajo (procedente de la empresa ONMIAGRO S.A.), adquirido del laboratorio "LPM" de la UCSM, por espectrofotometría empleando el método de Schimmer con la finalidad de establecer la cantidad de ajo liofilizado equivalente a 1000 µg de alicina correspondiente a la dosis. Una vez hallada la concentración de alicina por gramo de ajo, los 24 animales de experimentación, *Rattus norvegicus* variedad Wistar, fueron sometidos a un proceso de adaptación que consistió en estandarizar las condiciones ambientales y alimenticias (quince días). Posteriormente todos los animales fueron distribuidas al azar en cuatro grupos de 6 ratas cada uno y se les determinó la concentración basal de plomo en sangre antes de cualquier tratamiento: al grupo 1 (Control Negativo) se le administró 1 ml agua destilada, al grupo 2 (Control Positivo) se le administró 100 ppm de acetato de plomo, al grupo experimental 3 (Pre-post tratamiento) se le administró 1000 µg/kg/día de alicina en solución acuosa de ajo liofilizado 7 días antes y durante cinco semanas después del día de la intoxicación, al grupo experimental 4 (Post tratamiento) se le administró 1000 µg/kg/día de alicina en solución acuosa de ajo liofilizado durante 5 semanas después del día de la intoxicación. La intoxicación y el tratamiento fueron administrados en ayunas en soluciones acuosas vía oral. Culminada las 6 semanas de experimentación se sacrificó a todos los animales por contusión cervical y se les extrajeron el hígado, bazo y riñón para su posterior análisis. La concentración de plomo tanto en sangre como en órganos fueron determinados por Voltamperometría de redisolución anódica, es así que para los análisis de sangre se tomaron 0.5 ml de muestra del plexo venoso retro orbital de todos los animales de experimentación cada 5 días durante todo el periodo de tratamiento y fueron sometidos a un proceso de digestión UV con

100  $\mu$ L ácido nítrico, 20  $\mu$ L peróxido de hidrógeno y 5 mL de agua ultrapura por una hora. Para el análisis de los órganos (hígado, bazo y riñón), se trituraron y pesaron por separado 100 mg de muestra y fueron sometidos a un proceso de digestión en dos etapas, una primera fase de pre-digestión con 1.5 mL de ácido nítrico por 3 horas y una segunda fase de digestión a presión en el horno microondas en dos ciclos. Los resultados de las concentraciones de plomo en sangre muestran que el ajo disminuye las concentraciones de plomo en dicho fluido biológico en un 85 % para el caso del grupo 3 y en un 78 % para el caso del grupo 4, además, los análisis estadísticos al 95 % ( $p > 0.005$ ) sugieren que no existe diferencia significativa entre los tratamientos del grupo 3 (Pre-post tratamiento) y el grupo 4 (Post tratamiento). Así mismo los resultados de las concentraciones de plomo en los diferentes órganos muestran que el ajo disminuye en un 83 % la concentración de plomo en hígado y en un 50 % la concentración de plomo en bazo. Además se puede afirmar que el ajo no disminuye la concentración de plomo en el riñón. Se concluye que el ajo podría ser recomendado como tratamiento para reducir los niveles de plomo en sangre y algunos órganos.

## SUMMARY

The aim of this study was to investigate the effect of the watery solution of garlic in *Rattus norvegicus* induced experimentally to acute intoxication with 100 ppm of lead acetate in watery solution by oral administration, the work was carried out in the laboratory H-202 and the Bioterio of the Catholic University of Santa María, during the months of September to November of 2012.

The treatment of rats was made by the administration of watery solution of garlic liofilizado by oral administration for the one which, it was determined in form insinuation the allicin concentration (2-propentiosulfinato of alilo) of the garlic (coming from the company ONMIAGRO CORP.), acquired of the laboratory "LPM" of the UCSM, for espectrofotometry using the method of Schwimmer with the purpose of establishing the quantity from garlic equivalent liofilizado to 1000  $\mu\text{g}$  of allicin corresponding to the dose. Once pick up the allicin concentration for gram of garlic, the 24 experimentation animals, *Rattus norvegicus* variety Wistar, was subjected to a process of adaptation that consisted on standardizing the environmental and nutritious conditions (fifteen days). Later on all the animals were distributed at random in four groups of six rats each one and they were determined the basal concentration of lead in blood before any treatment: to the group 1 (Negative Control) it was administered 1 ml of distilled water, to the group 2 (Positive Control) it was administered 100 ppm of lead acetate, to the experimental group 3 (Pre-post treatment) it was administered 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  of allicin in watery solution of garlic liofilizado seven days before and five weeks after the day of the intoxication, to the experimental group 4 (Post treatment) it was administered 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  of allicin in watery solution of garlic liofilizado 5 weeks after the intoxication. The intoxication and the treatment were administered in in watery solutions by oral administration. Culminated the six weeks of experimentation it was sacrificed all the animals by cervical bruise and they were extracted the liver, spleen and kidney for their later analysis. The lead concentration as much in blood as in organs was determined by anodic stripping voltammetry, it is so for the analyses of blood they took 0.5 ml of sample of the plexus veined orbital retro of all the experimentation animals every 5 days during the whole period of treatment and they

were subjected to a digestion process UV with 100  $\mu$ L nitric acid, 20  $\mu$ L peroxide of hydrogen and 5 mL of water ultrapure for one hour. For the analysis of the organs (liver, spleen and kidney), they were crushed and they weighed for separate 100 sample mg and they were subjected to a digestion process in two stages, a first pre-digestion phase with 1.5 mL of nitric acid for 3 hours and a second digestion phase to pressure in the oven microwaves in two cycles. The results of the lead concentrations in blood show that the garlic diminishes the lead concentrations in this biological fluid in 85% for the case of the group 3 and in 78% for the case of the group 4, also, the statistical analyses to 95% ( $p < 0.005$ ) they suggest that significant difference doesn't exist among the treatments of the group 3 (Pre-post treatment) and the group 4 (Post treatment). Likewise the results of the lead concentrations in the different organs show that the garlic diminishes in 83% the lead concentration in liver and in 50% the lead concentration in spleen. One can also affirm that the garlic doesn't diminish the lead concentration in the kidney.

Consequently, the garlic could be recommended as treatment to reduces the lead levels in blood and some organs.

## INTRODUCCIÓN

El uso de plantas medicinales ha sido siempre parte de la cultura humana. La Organización Mundial de la Salud estima que el 80 % de la población mundial confía en el sistema de medicina tradicional para algún aspecto de cuidado de salud primario. <sup>(30,81,109)</sup>

El interés en la planta medicinal como alternativa para el cuidado de la salud ha ido resurgiendo y junto con ella el interés de investigar nuevas propiedades medicinales, entre estos estudios llevados a cabo se encuentra el ajo "*Allium sativum L.*"; del cual se ha informado la presencia de compuestos antioxidantes (flavonoides) y el contenido de compuestos azufrados <sup>(23,109)</sup> (disulfuro de dialilo, 2-propentiosulfonato de alilo, etc.). Es probable que estos compuestos jueguen un papel importante en los efectos biológicos ampliamente demostrados del ajo que le atribuyen propiedades como: hipoglicemiante, <sup>(72)</sup> antihipertensivo <sup>(2,120)</sup> hipocolesterolémico, <sup>(72,120)</sup> hipolipémico, <sup>(1,4,7,18,42,43,51,59,65,67,74,101,120)</sup> antiagregante plaquetario, antitrombogénico, <sup>(16,43,44,80,103,119)</sup> antiinflamatorio, <sup>(72)</sup> antitumoral, <sup>(9,12,31,45,46,96)</sup> antiviral <sup>(49,70)</sup> antifúngico <sup>(7,13,62,107)</sup> y antibacteriano <sup>(7,25,45,46,69,85,106,107,113)</sup>. Además algunas páginas de fitoterapia indican que el ajo podría reducir los niveles de plomo en sangre <sup>(8,37,76,82,100,8,38,73,98)</sup> sin especificar o mencionar el mecanismo por el cual actúa.

Durante décadas, la intoxicación con plomo ha sido conocida como un desorden importante que afecta a los individuos ya sea a través de una exposición aguda, subaguda o crónica debido a que en el medio ambiente y escenas ocupacionales se encuentran fuentes comunes de intoxicación para plomo como lo son las industrias de fabricación de baterías para automóviles, la fabricación de cerámica, la fabricación de plástico y cristalería, etc. <sup>(73,82,100)</sup>. Exposiciones a concentraciones bajas de plomo pueden dar lugar a problemas en la salud relacionadas al sistema nervioso, hematopoyético, reproductor, etc.; <sup>(100)</sup> es más, las concentraciones para la producción de manifestaciones clínicas difieren extensamente ya que depende en gran medida de la ubicación geográfica y sobre todo de variaciones individuales.

La prevención a una re exposición es crítica durante el tratamiento de intoxicación por plomo. Antídotos, como el Edetato disodico cálcico (EDTA), 2,3 Dimercaptopropanol (BAL), ácido 2,3-Dimercaptosuccinico (DMSA) también llamado Succímero, <sup>(50,100,121)</sup> han sido usados ampliamente para tratar la intoxicación por plomo durante las últimas seis décadas, estos agentes pueden acomplejar y facilitar la excreción de plomo del cuerpo. Sin embargo, los efectos colaterales, altos costos y algunas desventajas en el uso de estos antídotos indican que deben buscarse otras alternativas para el tratamiento de la intoxicación. <sup>(121)</sup>

Es así que el presente trabajo de investigación se llevó a cabo para determinar el efecto de la solución acuosa de ajos liofilizados sobre los niveles de plomo en sangre y órganos de animales de experimentación sometidos a un cuadro de toxicidad aguda con acetato de plomo vía oral.



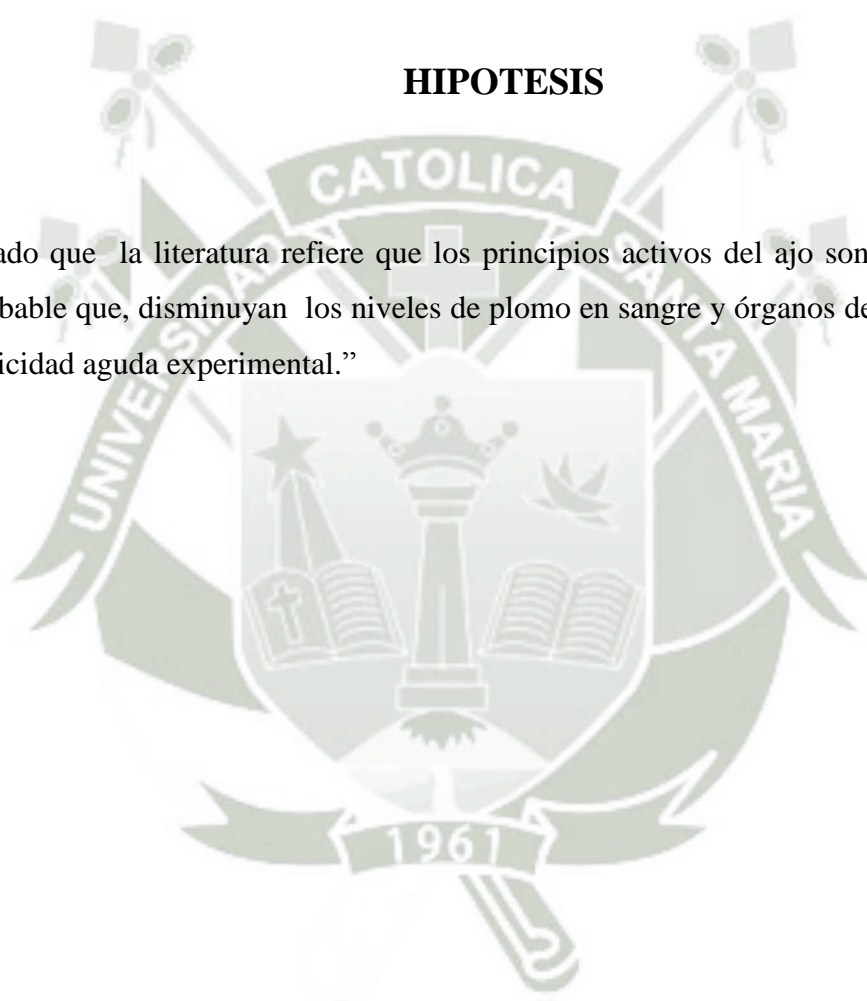
## OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo son los siguientes:

1. Determinar cuantitativamente el contenido de alicina en ajo liofilizado mediante espectrofotometría.
2. Optimizar el método para la determinación de plomo en sangre y órganos por Voltamperometría de redisolución anódica.
3. Determinar experimentalmente el efecto de la solución acuosa de ajo *Allium sativum L.* sobre los niveles de plomo en sangre de animales con toxicidad aguda experimental.
4. Determinar experimentalmente el efecto de la solución acuosa de ajo *Allium sativum L.* sobre los niveles de plomo en hígado, bazo y riñón.

## HIPOTESIS

“Dado que la literatura refiere que los principios activos del ajo son azufrados, es probable que, disminuyan los niveles de plomo en sangre y órganos de animales con toxicidad aguda experimental.”



## CAPITULO I

### MARCO TEORICO

1. **AJO *Allium sativum* L.**
- 1.1. **Características botánicas**
- 1.1.1. **Descripción morfológica de la especie**

El ajo pertenece a la familia de las liliaceas y su nombre sistemático es *Allium sativum* L. siendo el término “*allium*” probablemente procedente del céltico “*all*” que significa picante.<sup>(37)</sup> Es una planta común y ampliamente distribuida, usada en muchas partes del mundo como condimento y alimento; se cultiva en la mayoría de países, siendo Arequipa una de las regiones en las que más se cultiva en el Perú.<sup>(117)</sup>

El ajo presenta un bulbo redondo, ligeramente piriforme, constituido por numerosos gajos llamados dientes o bulbillos dispuestos en torno. Cada bulbillo presenta dos caras laterales planas, el dorso es convexo y los extremos puntiagudos, cubiertos por una membrana transparente generalmente de color rojizo.

El conjunto de dientes está envuelto por varias túnicas delgadas, blanquizas y quebradizas, cuando se secan.

Su tallo es herbáceo, formado por una parte aérea y una parte subterránea que forma los bulbos.

Sus hojas son simples, ensiformes, estrechas y enteras, se envuelven unas a otras formando lo que se llama inapropiadamente tallo.

Su inflorescencia es bulbífera en umbela y presenta muchas flores hermafroditas trímeras.

Su raíz es fibrosa y/o fasciculada.<sup>(10)</sup>

## 1.2. Hábitat

El ajo es originario de Kirgiz, Siberia y domesticado en Asia Central a partir de *A. lingicupis* Regel. Diseminado por las tribus nómadas al este y oeste de donde se ha cultivado y usado ampliamente en casi todas las culturas (Roma, Grecia, Egipto, China, India) desde hace más de 5000 años. Llegó a América a través de Europa en el s. XV. Es cultivado en varias regiones del mundo.

En el Perú es cultivado en la mayor parte del país, particularmente Arequipa es la zona de mayor cultivo.<sup>(10)</sup>

## 1.3. Clasificación taxonómica de la especie

El ajo tiene la siguiente clasificación taxonómica:<sup>(21)</sup>

- Reino : Vegetal
- Subreino : Embriofitas
- División : Espermatofitas
- Subdivisión : Angiosperma
- Clase : Monocotiledóneas
- Orden : Liliifloras
- Familia : Liliáceae
- Subfamilia : Lilioidea
- Género : Allium
- Especie : Allium sativum

#### 1.4. Composición química

En cuanto a la composición química del ajo, esta puede variar de acuerdo a la variedad y características ecológicas. Estudios en este sentido han sido ecos en muchas variedades, incluyendo la variedad *Allium sativum* “Napurí”, propia de nuestra región y que es la que utilizaremos en el presente estudio. En 1951, flores analizó varias especies de *Allium* <sup>(117)</sup> dando la siguiente composición para el ajo “Napurí”.

**Tabla N°1:** *Composición del ajo según flores.*<sup>(117)</sup>

Proteínas	3.14 - 3.17 %
Grasas	0.95 - 1.25 %
Azúcares totales	3.94 - 4.26 %
Cenizas	0.722 - 0.782 %
Cenizas ácidos – sensibles	0.476 - 0.518 %
Agua	78.79 - 79.04 %
Minerales	
Sodio y potasio	0.1008 - 1.1565 %
Hierro	0.00033 - 0.00047 %
Calcio	0.02235 - 0.4800 %
Fosforo	0.0592 - 0.0616 %
Azufre	0.0560 - 0.615 %
Zinc	0.0001 - 0.0032 %
Vitaminas: por 100 g. de ajo fresco	
Tiamina y riboflavina	32 µg.
Niacina	395 mg.
Biotina	2.2 mg.
A	284 UI.
C	0.0291 - 0.4810 mg.

Según el instituto de Nutrición y Servicio Cooperativo Peruano – Norteamericano de Salud Pública. La composición de 100 g. de ajo Napurí es la siguiente.

**Tabla N°2:** *Composición del ajo según el instituto de Nutrición y Servicio Cooperativo Peruano – Norteamericano de Salud Pública.*<sup>(117)</sup>

Proteínas	5.60 g.
Grasas	0.80 g.
Carbohidratos	30.30 g.
Fibra	0.90 g.
Agua	61.40 g.
Minerales	
Calcio	94.0 mg.
Fosforo	180.0 mg.
Hierro	1.7 mg.
Vitaminas	
Tiamina	0.14 mg.
Riboflavina	0.07 mg.
Niacina	0.42 mg.
C	9.10 mg.

Además, Bolton y col. Reportan trazas de cobre, aluminio, germanio y selenio; a estos 2 últimos elementos los consideran coadyuvantes de la alicina, en las propiedades antitumorales del ajo.

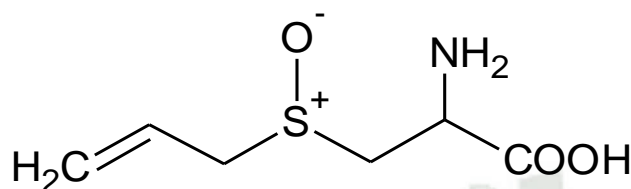
## 1.5. Principales constituyentes activos del Ajo

### a) Aliina

Este aminoácido conocido también como (+)-S-alil-L-cisteinil-sulfóxido. Se encuentra en el citoplasma de las células del bulbo de ajo y está constituyendo el “pool” de aminoácidos no proteicos, representa aproximadamente el 0.24% en peso de un bulbo típico de ajo.<sup>(117)</sup>

### Propiedades físicas y químicas

Tiene un P.M. de 167.26, una fórmula global como  $C_6H_{11}O_3NS$  y su fórmula estructural es la siguiente:



**Esquema N°1:** *Fórmula desarrollada de la aliina.*<sup>(21)</sup>

Funde con descomposición y burbujeo entre 163° y 165 °C, es ópticamente activa. Es bastante soluble en agua pero su solubilidad decrece con el incremento de la concentración de alcohol siendo completamente insoluble en alcohol absoluto, siendo también insoluble en cloroformo, acetona, éter etílico y benceno.

La solución acuosa de aliina es estable aun en altas temperaturas, y tiene reacción ácida a un pH 4.9.

La aliina por la acción de la aliinasa produce alicina, ácido pirúvico y amoniaco, estos dos últimos componentes están presentes en cantidades equimoleculares como se puede observar en la **Figura N°2.**<sup>(17)</sup>

### Aliinasa

La enzima aliinasa es una glicoproteína homodimérica que pertenece a la familia de enzimas dependientes de piridoxal 5-fosfato, contiene un factor de crecimiento dérmico desconocido que la hace única entre todas estas enzimas.

(59)

### Propiedades

Es capaz de destruir los enlaces carbono – azufre; puede ser extraída con agua de bulbos de ajo finamente cortados constituyendo el mayor componente de dichos bulbos. <sup>(59)</sup>

Tiene un punto isoeléctrico de 4.0, es además muy inestable, aún a 3°C pierde su actividad antes de los 14 días, también se inactiva por contacto con solventes orgánicos, tales como el etanol y el éter etílico. <sup>(59)</sup>

La actividad de la aliinasa y la concentración de la alicina pueden ser determinados por la cantidad de amoníaco o ácido pirúvico producidos enzimáticamente (**Esquema N°3**).

Se ha demostrado que la reacción con la aliina tiene lugar exactamente rápido hecho que está de acuerdo con la aparición instantánea del olor típico en los ajos cortados. <sup>(59)</sup>

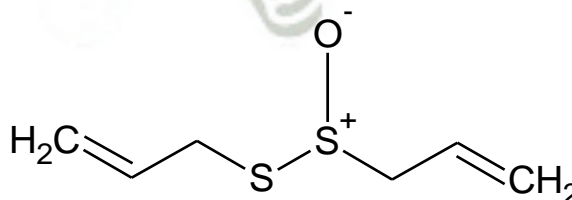
#### b) 2-propentiolsulfonato de alilo

Alicina o tiol sulfonato de dialilo es el principio activo del extracto acuoso de ajo recientemente preparado y mantenido a temperaturas bajas. <sup>(117)</sup>

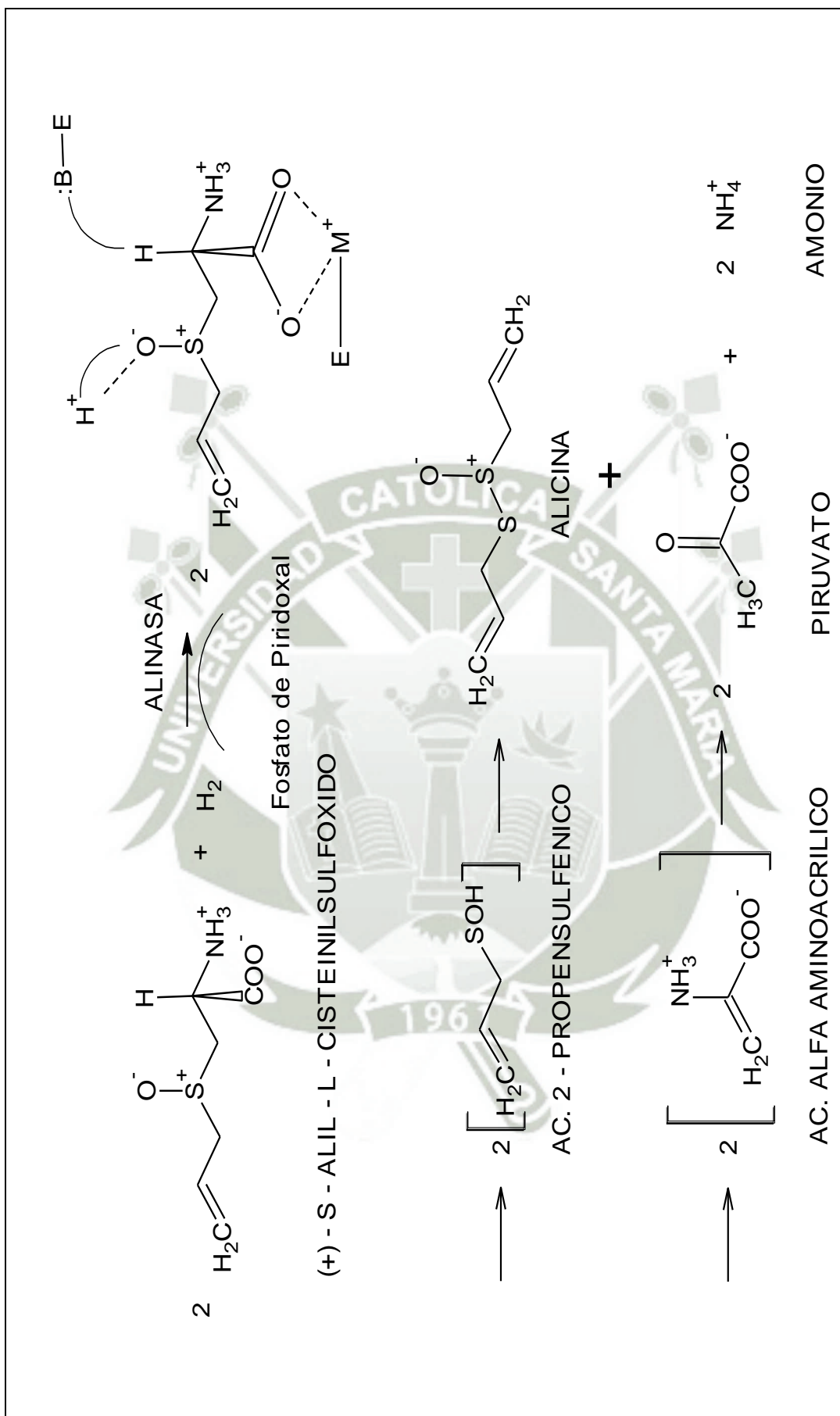
#### Propiedades físicas y químicas

Es un líquido incoloro, químicamente inestable al que se le debe el olor del ajo, mucho más que el disulfuro de dialilo.

Tiene un P.M. de 162.27, su fórmula global es  $C_6H_{10}S_2O$  y su fórmula desarrollada es:

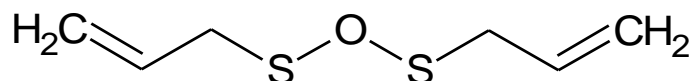


**Esquema N°2:** Fórmula desarrollada de la alicina. <sup>(21)</sup>

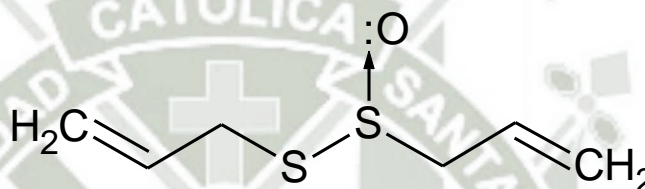


Esquema N°3: Reacción de formación de la alicina. (21)

En base a sus investigaciones químicas Cavallito y col. Propusieron dos fórmulas desarrolladas para la alicina:



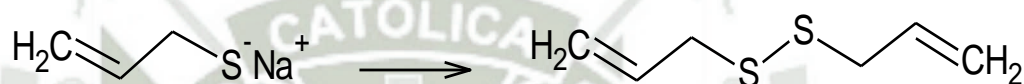
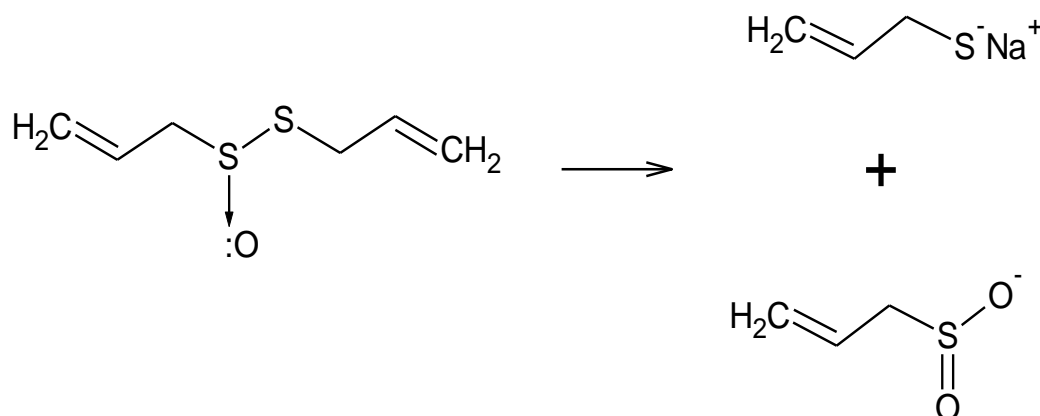
**Esquema N°4:** *Fórmula desarrollada de la alicina A.*<sup>(117)</sup>



**Esquema N°5:** *Fórmula desarrollada de la alicina B.*<sup>(21)</sup>

Su solubilidad en agua es de 2.5 g en 100 ml de agua según Buck y Suter y el propio Cavallito. La alicina es inestable con las variaciones de temperatura y pH, confirmado por Barone y Tansey en 1977, trabajando con el extracto acuoso de ajo encontraron que su actividad disminuía en un 95 % a las 72 horas de haber sido colocado en una incubadora a 37 °C.

Además comprobaron que la alicina es inestable en medios básicos.



**Esquema N°6:** *Reacción de la formación del disulfuro de dialilo.*<sup>(21)</sup>

La alicina es convertida rápidamente a disulfuro de dialilo (DADS) debido a su inestabilidad (**Esquema N°6**).<sup>(117)</sup>

### Propiedades medicinales

Los estudios sugieren que la alicina es una sustancia importante para las propiedades medicinales del ajo.

Se le atribuyen propiedades antimicrobianas, antifúngicas,<sup>(10, 72, 101,117)</sup> antivirales,<sup>(52)</sup> hipolipemiantes,<sup>(70,123)</sup> antihipertensivas,<sup>(2)</sup> y como antiagregante plaquetario.<sup>(18)</sup>

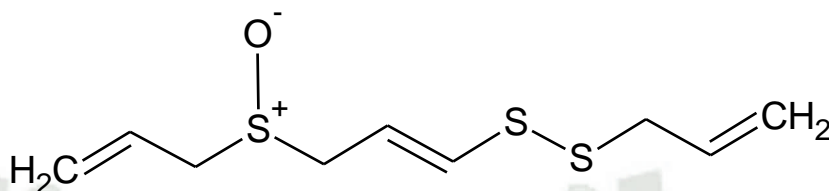
Presenta alta permeabilidad para atravesar membranas<sup>(81)</sup> y una respuesta vasodilatadora en isquemia pulmonar en ratas.<sup>(55,58)</sup>

### c) Ajoeno

Es un compuesto órgano-sulfurado denominado 9-óxido de 4, 5 ,9-tritiododeca-1, 6, 11-trieno.<sup>(117)</sup>

### Propiedades físicas y químicas

Tiene una fórmula global:  $C_9H_{14}S_3O$  y presenta dos isómeros **Esquema N°7** y **Esquema N°8**.



**Esquema N°7:** Configuración *trans*.<sup>(117)</sup>



**Esquema N°8:** Configuración *cis*.<sup>(117)</sup>

El ajoeno se obtiene a partir de la alicina (**Esquema N°9**), cuando se somete una solución de alicina en acetona o en metanol diluidos a temperaturas ambientales por 4 días.<sup>(117)</sup>

### Propiedades medicinales

Se le atribuyen propiedades antibacterianas,<sup>(83)</sup> antifúngicas,<sup>(64,83)</sup> antivirales,<sup>(86)</sup> antiprotozoarios<sup>(65,86)</sup>, potente antiagregante plaquetario<sup>(86)</sup> y hepatoprotector.<sup>(46)</sup>

Actualmente se le conoce como una droga experimental antileucémico con gran actividad antitumoral.<sup>(30,66)</sup>

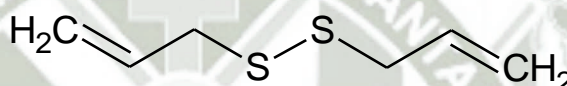
Es un agente químico preventivo en carcinomas gastrointestinales provocados por AINES <sup>(29)</sup> y un inhibidor del crecimiento de células cancerígenas in vivo e in vitro en ratones. <sup>(66)</sup>

#### d) Disulfuro de dialilo (DADS)

Es el principal componente del aceite esencial de ajo y se le conoce también como disulfuro de di (2-propenil). <sup>(117)</sup>

#### Propiedades físicas y químicas

Tiene un P.M. de 146.27 como fórmula global  $C_6H_{10}S_2$  y fórmula estructural en la Esquema N°10.



Esquema N°10: Disulfuro de dialilo. <sup>(21)</sup>

El disulfuro de dialilo en el ajo se forma a partir de la alicina en función del tiempo y de la temperatura, tal como lo reportaron Brodnitz y col. <sup>(112)</sup>

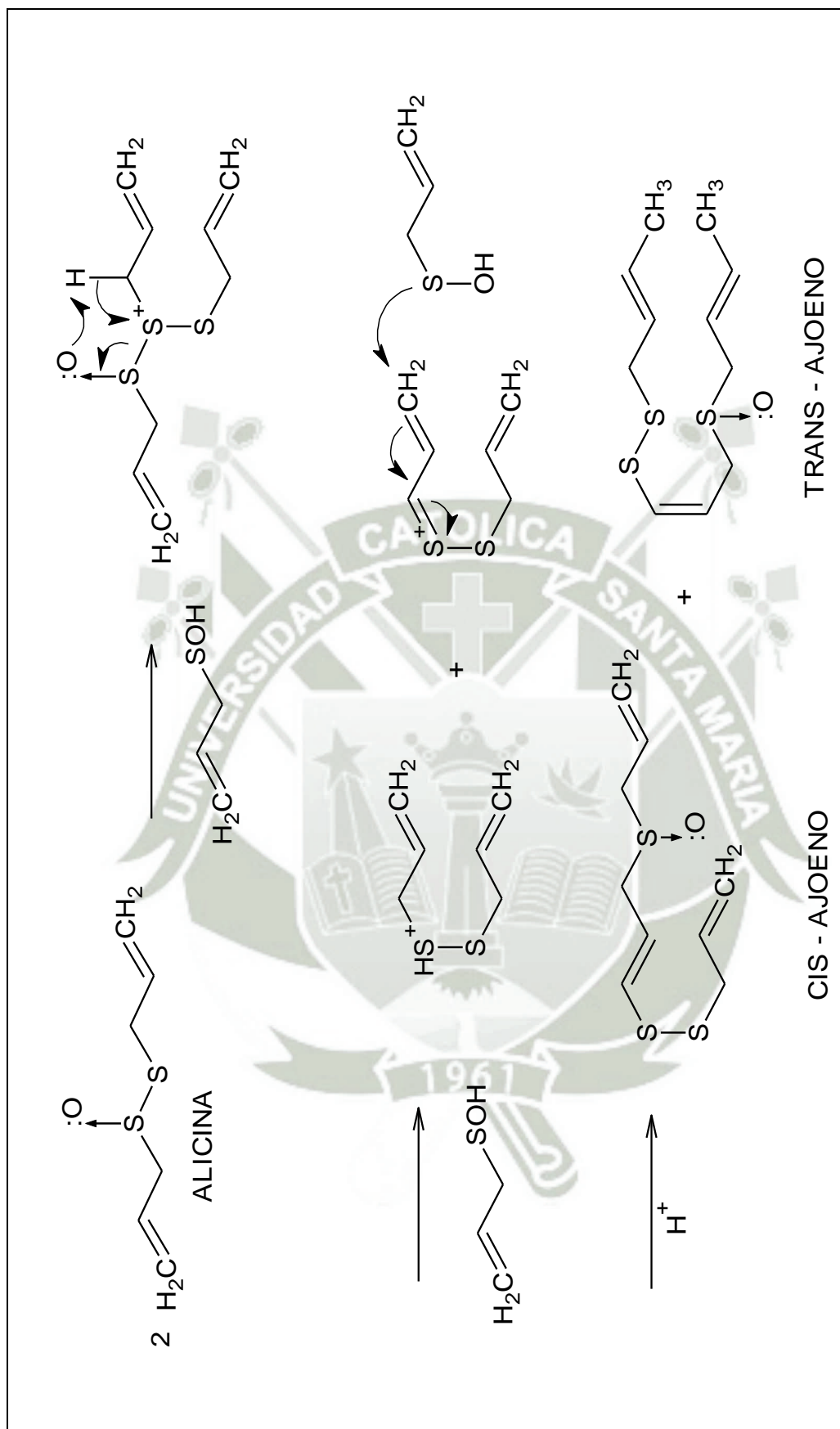
La alicina se descompone completamente a 20 °C en 20 horas rindiendo DADS (66 %), sulfuro de dialilo (DAS) (14 %), trisulfuro de dialilo (DASTS), además de cierta cantidad de dióxido de azufre. <sup>(117)</sup>

#### Propiedades medicinales

Se le atribuyen propiedades como: antimicrobiano, <sup>(112)</sup> antioxidante, <sup>(37)</sup> hepatoprotector, <sup>(25)</sup> antihipercolesterolemico. <sup>(68,69)</sup>

Ejerce una actividad quimiopreventiva potente contra el cáncer de colon, pulmón y piel en ratas, <sup>(62, 122)</sup>

Induce la actividad antitumorígena producida por AINES en animales de experimentación. <sup>(15)</sup>



**Esquema N°9:** Mecanismo de formación de los ajoenos a partir de alicina. <sup>(112)</sup>

El DADS y otros compuestos órgano-sulfurados del ajo como: dipropil disulfuro, sulfuro de dialilo, alil metil sulfuro, alil mercaptano, cisteína y cistina reducen la formación de aminas aromáticas heterocíclicas en frituras de alimentos en base de carne. <sup>(25)</sup>

Es un prometedor agente anticancerígeno en el cáncer de seno dependiente e interdependiente de hormonas <sup>(86)</sup> y un potente antimicótico contra lesiones neoplásicas de colon *in vivo* y crecimiento *in vitro* de células en cáncer de colon. <sup>(99)</sup>

### 1.6. Propiedades medicinales del *Allium sativum* L. (Ajo)

Actualmente son de interés y ampliamente estudiadas alrededor del mundo principalmente sus propiedades: antibacterianas, antifúngicas, antivirales, hipoglicemiantes, hipolipémicas, antihipertensivas, anticancerígenas, hepatoprotectores, antiinflamatorias y antiagregante plaquetario.

Algunas páginas de fitoterapia le atribuyen al ajo la propiedad de disminuir los niveles de plomo en sangre <sup>(8,40,79,85,104)</sup> sin especificar o mencionar el mecanismo por el cual actúa.

#### Propiedad antibacteriana

Estudios recientes confirman la actividad antibacterial “*in vitro*” del ajo contra *Streptococcus neumoniae* y *Klebsiella pneumoniae* causantes de la neumonía, <sup>(75,118)</sup> *Helicobacter pylori* <sup>(49, 88,107)</sup> reconocido actualmente como el agente causal de gastritis crónica, úlceras gástricas y duodenales.

También contra *Staphylococcus aureus* resistente a Metilcilina, <sup>(112)</sup> bacterias entéricas humanas, *Enterobacter aerogenes* dependiendo del tiempo y dosis del contenido de tiosulfinato.

Y además contra Bacterias G (+) : *S. aureus* y *B. subtilis* y Bacterias G (-) : *P. aeuriginosa* y *E. coli*. <sup>(7,111)</sup>

### **Propiedad antifúngica**

Contra cepas de *Aspergillus*, *Candida* y *B. capitatus* <sup>(7,112)</sup> es eficaz en el tratamiento de *Tinea pedis* comparado con Terbinafina. <sup>(65)</sup>

Se comprobó la sensibilidad in vitro contra los dermatofitos comunes como: *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *M. canis* y *E. floccosum* y en el tratamiento de pacientes con *Tinea crucis* y *corporis* causadas por estos hongos. <sup>(13)</sup>

### **Propiedad antiviral**

El principio activo alicina puede prevenir un ataque por el virus del resfrío común. <sup>(52)</sup>

El ajo fue más efectivo y menos tóxico comparado con dos drogas antivirales usadas contra enterovirus. <sup>(73)</sup>

### **Propiedad hipoglicemiante**

Estudios recientes revelaron que los niveles de glucosa y glucógeno decrecieron significativamente después de la alimentación con ajo y cebolla. <sup>(75)</sup>

### **Propiedad hipolipemiante**

Previene la hipercolesterolemia y las alteraciones vasculares inducidas por la dieta, así mismo, mejoran los factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares en animales de experimentación y humanos. <sup>(1,4,7,18,45,46,54,62,68,70,77,105,125)</sup>

Inhibición de la síntesis de triglicéridos y ácidos grasos. <sup>(69)</sup>

### **Propiedad antihipertensiva**

Reduce la presión diastólica sanguínea en hipertensión media y moderada, <sup>(2)</sup> tiene propiedad es antihipertensiva en nulíparas en el tercer trimestre de gestación, pero no previene la preeclampsia. <sup>(125)</sup>

### **Propiedad anticancerígena**

- ✓ Como preventivo en el cáncer de estómago, colorectal y de seno en animales de experimentación. <sup>(12,33)</sup>
- ✓ Antitumoral en el intestino delgado de ratas por daño inducido por drogas. <sup>(48)</sup>
- ✓ Reduce los riesgos de cáncer gástrico inducido por H. pylori. <sup>(49)</sup>
- ✓ Es un agente quimiopreventivo y quimioterápico en tumores implantados en la cavidad peritoneal en ratones. <sup>(100)</sup>
- ✓ Ejerce su efecto antitumoral por inducción de apoptosis en carcinoma de la cavidad bucal en animales. <sup>(9)</sup>
- ✓ En útil en la prevención de carcinoma gastrointestinal inducido por AINES. <sup>(29)</sup>
- ✓ Prometedor agente anticancerígeno del cáncer de seno. <sup>(86)</sup>

### **Propiedad hepatoprotectora**

El ajo exhibe un efecto hepatoprotector contra daños inducidos por acetaminofeno en ratones. <sup>(44,109)</sup>

Como profiláctico contra daños en los tejidos gástricos y hepáticos en ratas inyectadas con veneno de cobra. <sup>(95)</sup>

### **Propiedad antiinflamatoria y antiagregante plaquetario**

Modula la producción de leucocitos y la producción in vitro de citoquinas relacionadas con la enfermedad inflamatoria intestinal. <sup>(46,47)</sup>

Ejerce una actividad inhibitoria selectiva sobre la agregación y adhesión en las funciones plaquetarias en humanos. <sup>(16,83,108,124)</sup>

### **Otras**

- ✓ Inhibe la formación de aminas aromáticas heterocíclicas producidas en la fritura de preparados en base de carne. <sup>(25)</sup>

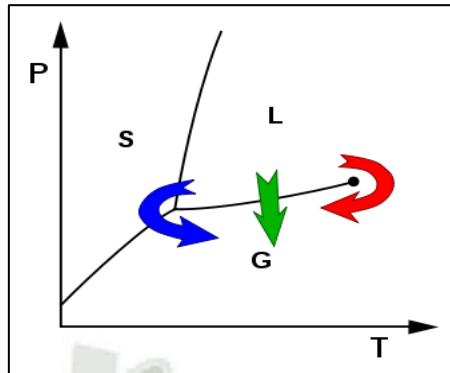
- ✓ Aumenta la circulación en la enfermedad isquémica coronaria y pulmonar. <sup>(11)</sup>
- ✓ Mejora la microcirculación y propiedades reológicas sanguíneas. <sup>(82)</sup>
- ✓ Efecto antioxidante, el ajo ha mostrado proteger al organismo contra enfermedades inducidas por oxidantes. <sup>(14,121)</sup>
- ✓ Podría reducir los niveles de plomo en sangre. <sup>(103)</sup>
- ✓ Efecto inhibitorio contra cuatro cepas de Leishmania. <sup>(64)</sup>
- ✓ Actividad moduladora inmunológica in vitro e in vivo. <sup>(23)</sup>
- ✓ Efecto protector contra la nefrotoxicidad producida por gentamicina. <sup>(92)</sup>

## 2. LIOFILIZACION

El procedimiento llamado criodeshidratación, criodesecación o liofilización, consiste en congelar el producto para luego deshidratarlo al vacío, aprovechando la propiedad de sublimación que posee el hielo, es decir, la propiedad que le permite pasar de una fase sólida a la fase gaseosa sin fundirse. Mediante este proceso se elimina a muy baja temperatura, el agua de un producto que se mantiene congelado y rígido mientras esta húmedo. En esas condiciones el producto no sufre el calor por la presencia de agua y se deshidrata conservando su forma y volumen original. <sup>(10)</sup>

### 2.1. Principios físicos de la liofilización

La liofilización es un proceso en el que se congela el producto y posteriormente se introduce en una cámara de vacío para realizar la separación del agua por sublimación. De esta manera se elimina el agua desde el estado sólido al gaseoso del ambiente sin pasar por el estado líquido. Para acelerar el proceso se utilizan ciclos de congelación-sublimación con los que se consigue eliminar prácticamente la totalidad del agua libre contenida en el producto original, pero preservando la estructura molecular de la sustancia liofilizada



En el diagrama de fases la frontera entre gas y líquido va desde el punto triple hasta el punto crítico. La liofilización (flecha azul) lleva el sistema alrededor del punto triple, evitando así la transición directa de líquido a gas de un secado tradicional (Flecha verde).

Para llevar a cabo el proceso de liofilización se necesita determinar los siguientes parámetros.

- ✓ Punto eutéctico del producto
- ✓ Presión
- ✓ Temperatura

En el caso del ajo la temperatura de congelación es de  $-30^{\circ}\text{C}$ . y la operación dura 45 minutos. El vacío utilizado en el túnel está dado por la temperatura del ajo congelado, correspondiéndole a  $-30^{\circ}\text{C}$ . un vacío de 0.4 torr.

La reducción de la presión existente en la cámara, con temperatura y presión por debajo de la correspondiente al punto triple, hace que inmediatamente se inicie la evaporación de la húmeda. La fase de sublimación concluye cuando ya no hay hielo para retirar del producto. <sup>(30,48,123)</sup>

El producto seco liofilizado tiene una estructura porosa, debido a que las moléculas de agua han abandonado sus sitios dejándolos así, por tanto estos poros tienden a llenarse con aire atmosférico, el cual es muy dañino por contener oxígeno que da lugar al oxidamiento y ranciamiento, es por esto que se busca un gas inerte o aire seco para evitar estos fenómenos, una vez secado el producto, va a un tambor de producto terminado, posteriormente se realiza la molienda y el tamizado. <sup>(123)</sup>

## 2.2. Ventajas de la liofilización

La liofilización ofrece múltiples ventajas: <sup>(10)</sup>

- a) Calidad superior del producto final.
- b) Longevidad del producto procesado, manteniendo sus propiedades.
- c) En efecto, la baja presión del proceso y la débil conductividad de los productos liofilizados (debido a la textura porosa) afectan de manera significativa y negativa la transferencia de calor y de masa y por consecuencia la duración de la operación de deshidratación.
- d) Se reduce considerablemente la desnaturalización proteica, de modo que los tejidos se conservan en estado viable. Debido en parte, a las bajas temperaturas empleadas y también a la ausencia de migración de sales y otros solutos, el producto final tiene exactamente el mismo grado de uniformidad que el material primitivo.
- e) La pérdida de constituyentes volátiles, tales como aceites esenciales, es generalmente menor que en otros métodos de desecación.
- f) La desecación es uniforme y rara vez observa un endurecimiento superficial.
- g) En las condiciones de baja temperatura en que se realiza la desecación no se produce ningún crecimiento bacteriológico, ni cambio enzimático.
- h) En virtud del elevado vacío empleado, en comparación con el empleado en la evaporación ordinaria, la cantidad de oxígeno presente es tan pequeña que resultan protegidos, incluso, los componentes fácilmente oxidables.
- i) Los productos liofilizados pueden almacenarse por largo tiempo completamente secos, bajo condiciones adecuadas de temperatura y humedad.

## 2.3. Desventajas de la liofilización

- a) Elevado costo debido a que el proceso es relativamente largo y complejo.
- b) El producto debe conservarse en condiciones adecuadas de temperatura y humedad ya que es fácilmente reconstituible.

- c) En el caso del polvo liofilizado, este es muy higroscópico si está expuesto al ambiente sin ningún tipo de cuidado. <sup>(10)</sup>

### 3. METALES PESADOS

Se considera metal pesado a aquel elemento que tiene una densidad igual o superior a  $5 \text{ g/cm}^3$  cuando está en forma elemental, o cuyo número atómico es superior a 20 (excluyendo a los metales alcalinos y alcalino - térreos). Su presencia en la corteza terrestre es inferior al 0.1 %. Junto a estos metales pesados hay otros elementos químicos que aunque son metales ligeros o no metales se suelen englobar con ellos por presentar orígenes y comportamientos asociados; es este caso del As, B, Ba, y Se. <sup>(50)</sup>

Dentro de los metales pesados hay dos grupos:

- a) Oligoelementos o micronutrientes, que son los requeridos en pequeñas cantidades traza por plantas y animales, y son necesarios para que los organismos completen su ciclo vital. Pasando cierto umbral se vuelven tóxicos. Dentro de este grupo están: As, B, Co, Cr, Mo, Mn, Ni, Se y Zn.
- b) Metales pesados sin función biológica conocida, cuya presencia en determinadas cantidades en seres vivos lleva a disfunciones en el normal funcionamiento de los organismos. Resultan altamente tóxicos y presentan la propiedad de acumularse en los organismos vivos. Son principalmente: Cd, Hg, Pb, Cu, Ni, Sb, Bi.

## 4. PLOMO

### 4.1. Etiología

El plomo (Pb) es un metal pesado de color grisáceo que presenta un aspecto de color brillante, pero que se oxida rápidamente y toma un aspecto mate. Es muy dúctil y maleable. Funde a 327 °C y hierve a 1.525 °C. Al fundir, emite humos que al oxidarse se transforman en polvos finos de óxidos de plomo. Se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, siendo el sulfuro de plomo *o galena* su forma más frecuente de presentación.

Es un metal resistente a la acción del ácido sulfúrico, pero se disuelve con facilidad en ácido nítrico y en ácidos orgánicos (cítrico, acético), dando lugar a sales solubles.

El empleo industrial del plomo, así como de sus aleaciones con el antimonio y estaño, se remonta a los tiempos más antiguos: <sup>(20)</sup> se calcula que la polución atmosférica era muy alta en el hemisferio norte entre la V centuria a.C. y la III d.C. como consecuencia del alto consumo de plomo en la metalurgia.

Cabe resaltar que el plomo es un metal pesado que no juega ningún papel en la fisiología humana, por lo que el nivel plasmático ideal debería ser cero. En la actualidad es prácticamente imposible encontrar alguna persona en la que no se detecte niveles de plomo en sangre. <sup>(50)</sup>

Hoy día, las intoxicaciones por el plomo son en su mayoría de origen profesional y tiene un evidente interés por las siguientes razones:

- a) La intoxicación se puede presentar en muy diversas circunstancias obedeciendo a una etiología oculta, de carácter profesional, alimenticio, hídrico o ambiental.
- b) El plomo es el primer agente responsable de enfermedad profesional de origen tóxico. Unos 15.000 obreros están expuestos a este compuesto, muchos de ellos en pequeñas empresas no sometidas a controles de higiene industrial.
- c) El plomo es un contaminante de las drogas de abuso. Tanto en la heroína como

en la cocaína (en mayor proporción) se detectan cantidades significativas de plomo.

- d) El plomo es un contaminante ambiental importante que por diversos mecanismos, llega a contaminar el aire, el agua y la cadena alimenticia, hasta llegar al hombre. Los 4 millones de toneladas de plomo que anualmente se manejan en el mundo lo hace muy peligroso, ya que este metal se recicla íntegramente y no sufre proceso alguno de biodegradación.

#### 4.2. Fuentes de intoxicación

Se distinguen tres posibles fuentes de intoxicación:

##### **Plomo metal**

Sólo es tóxico cuando se funde a temperaturas próximas a los 500 °C. Los vapores que emite son tóxicos, y si penetran en las vías respiratorias alcanzan fácilmente los alveolos. Los vapores se oxidan rápidamente, haciéndose poco solubles. Según su peso y contenido en agua, quedarán más o menos tiempo en suspensión en el aire para, finalmente, caer al suelo. Ésta es la forma fundamental de contaminación ambiental.

##### **Derivados inorgánicos**

Constituyen un grupo muy numeroso y por lo general son poco solubles, de lo que se deriva una toxicidad relativamente escasa. Entre ellos destacan:

- ✓ *Óxidos: minio* ( $Pb_2O_4$ ) u óxido de plomo rojo, base de las pinturas anticorrosivas; el *litargirio* ( $PbO$ ) o protóxido de plomo, y el bióxido de plomo ( $PbO_2$ ).
- ✓ *Cromato de plomo*, que es un magnífico colorante amarillo.
- ✓ *Arstmiato de plomo*, base de numerosos insecticidas.
- ✓ *Carbonato de plomo* o cerusita, pigmento blanco tóxico.
- ✓ Otras sales: *sulfato de plomo*, o blanco de Mulhouse, y *antimoniato de*

*plomo, o amarillo do Nápoles.*

### **Derivados orgánicos**

Son muy empleados en la industria y destacan entre ellos:

- ✓ *Acetato de plomo* o sal de Saturno: es muy soluble y es el único que produce intoxicaciones agudas por vía digestiva. Se ha empleado como abortivo.
- ✓ *Tetraetilo de plomo*: antidetonante que se ha venido adicionando a la gasolina para aumentar su capacidad de compresión, elevando así su rendimiento. Por razones ecológicas, hoy día está muy generalizado el uso de la gasolina «sin plomo».
- ✓ *Estearato de plomo*: se usa para dar estabilidad y consistencia al plástico.
- ✓ *Naftenato de plomo*: es componente de numerosas grasas y aceites de uso industrial.

### **4.3. Formas etiológicas**

Pueden distinguirse dos formas de desigual importancia:

- ✓ *Intoxicaciones voluntarias*. Tanto la intoxicación criminal como la suicida son hoy excepcionales. En otra época se utilizó el acetato de plomo con fines abortivos.
- ✓ *Intoxicaciones accidentales*. Son las más frecuentes. Dan lugar tanto a accidentes agudos como a la intoxicación crónica, denominada clásicamente *saturnismo*.

### **4.4. Intoxicación profesional**

- ✓ Fundición de plomo y zinc.
- ✓ Fabricación y manipulación de arseniato de plomo para pulverizaciones.
- ✓ Fabricación de óxidos de plomo.
- ✓ Producción de compuestos de plomo (incluyendo la producción de

compuestos alquímicos que conlleve una exposición al plomo metálico y sus compuestos iónicos).

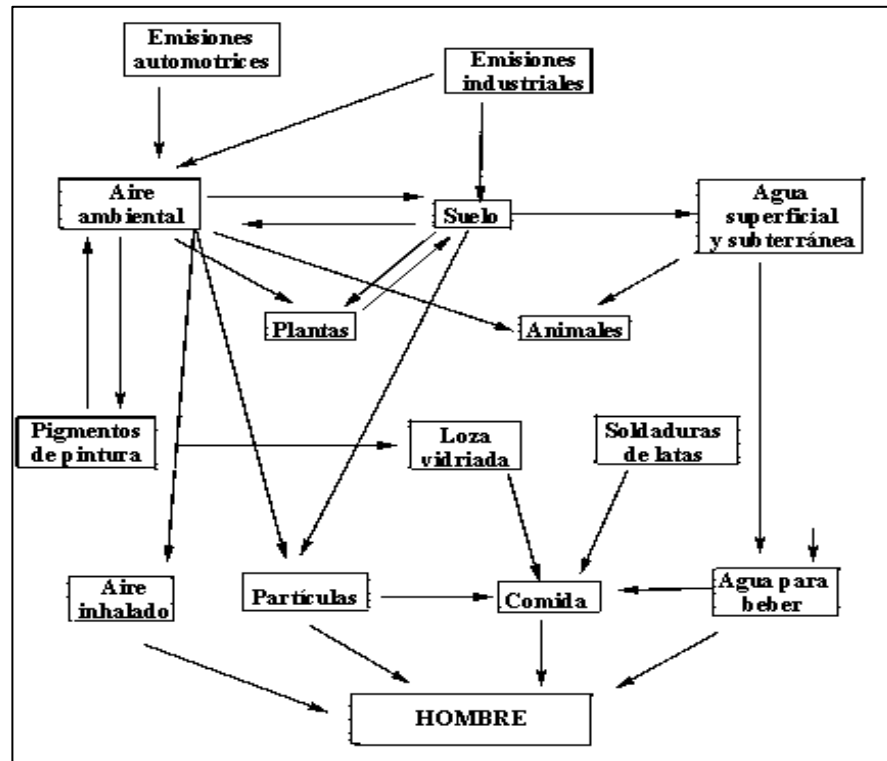
- ✓ Fabricación y utilización de pinturas, esmaltes, masillas y colorantes que contienen plomo.
- ✓ Artesanía de estaño y plomo.
- ✓ Fabricación de plomo para soldaduras.
- ✓ Fabricación de munición de plomo.
- ✓ Utilización de municiones de plomo en locales cerrados.
- ✓ Industrias de cristalería, cerámica y alfarería artesanal.
- ✓ Industria de plástico que utilice aditivos a base de plomo.
- ✓ Trabajos de imprenta en las que se utilice plomo.
- ✓ Trabajos de demolición, especialmente raspado, quemado y oxicorte de materiales recubiertos con pinturas de plomo, así como demolición de instalaciones en los que de alguna manera, esté presente el plomo.
- ✓ Soldadura con plomo en locales cerrados.
- ✓ Construcción y reparación de automóviles que impliquen utilización o presencia de plomo.
- ✓ Fabricación y templado de aceros con plomo.
- ✓ Revestimiento con plomo.
- ✓ Recuperación de plomo y de residuos metálicos que lo contengan.

En España, la máxima siniestralidad está en las industrias del vidrio, cerámica y arcilla, donde se producen el 50 % de las enfermedades profesionales por el plomo, con una tendencia alcista. Habrá que prestar una especial atención a todas aquellas empresas en las que se funde plomo, como las fábricas de perdigones, o en las que el riesgo queda oculto: recuperación de chatarras, obtención y fundiciones de estaño, zinc, etc. <sup>(126)</sup>

#### 4.5. Intoxicación extra profesional

- a) *De origen hídrico.* La concentración máxima de plomo admitida por la OMS en el agua de bebida es de **50 µg/L**. A veces se producen contaminaciones de las aguas de bebida por diversas razones: tuberías de plomo, vasijas de barro esmaltadas o pintadas con compuestos de plomo, etc.
- b) *De origen alimenticia.* Se estima que la cantidad de plomo que ingresa en el organismo a causa de la contaminación de alimentos oscila entre 100 y 400 µg/día. El origen de este plomo es ambiental, siguiendo las vías del **Esquema N°11**. No obstante, hay cuadros de saturnismo que obedecen a causas muy concretas como:
- ✓ Consumo habitual de bebidas ácidas (jugos de frutas), envasadas en latas y cerradas con soldaduras que contienen plomo.
  - ✓ Vinos almacenados en vasijas de barro.
  - ✓ Harinas contaminadas por insecticidas que contienen plomo o por las ruedas del molino cuando han sido reparadas con plomo.
  - ✓ Siempre existirá riesgo si se almacenan productos que lleven en su composición ácidos (vinagre) en vasijas que se vitrifiquen con galena; el plomo puede irse solubilizando lentamente.





**Esquema N°11:** Vías de contaminación de los alimentos por el plomo. <sup>(126)</sup>

- c) *Infantiles.* Clásicamente se conocen las intoxicaciones infantiles por culpa de los juguetes fabricados con plomo o pintados con compuestos de plomo, pero fue la aparición de una encefalopatía grave en niños americanos entre 1 y 6 años lo que ha alertado sobre un nuevo problema ligado al plomo. Los primeros casos fueron señalados en Australia por GIBSON, en 1892; entonces no se aclaró la etiología, pero se estableció su carácter doméstico y estacional. En 1902 ya se demostró que el origen se encontraba en la habitación y que las manos-boca desempeñaban un papel importante. En 1924, RUDDOK llamó la atención sobre el papel de la «pica» en la intoxicación por el plomo en la infancia. A partir de esta época se publican muchos casos de encefalopatías infantiles ligadas al plomo lo que los lleva a decir a LEVISON Y HARRISON, en 1936, que ante toda encefalopatía infantil debería plantearse la posible etiología por el plomo. En 1971, el nivel tóxico se fijó en 40 µg/dl, en 1978 era reducido a 30 µg, en 1985 a 25 µg /dL y más recientemente, en 1991, a 10 µg %. En el 2000, el informe de

LANPHEAR y COX. <sup>(57)</sup> sugiere que el plomo puede ejercer efectos tóxicos sobre el cerebro en concentraciones inferiores a 5  $\mu\text{g} \%$ . Esta conclusión se basa en un análisis de más de 4.800 niños de 6 a 15 años que han participado en el tercer examen nacional de vigilancia de la salud.

d) *Contaminación ambiental.* El interés creciente por la toxicología del plomo se debe a que la sociedad mundial ha tomado conciencia del papel que este metal desempeña como contaminante ambiental. Dos son las fuentes de contaminación: las empresas que funden plomo y vierten sus humos a la atmósfera, y los automóviles que consumen gasolina con plomo. BERNKERT estima que un vehículo que utilice este tipo de gasolina vierte a la atmósfera alrededor de 2,5 kg de Pb/año.

e) *Drogadicción.* Hasta ahora, era conocido que una de las causas frecuentes de la encefalopatía por el plomo era la ingestión de whisky ilícito llamado *moon-shíne*, pero hoy se añaden nuevos aspectos al problema. La heroína contiene plomo como contaminante en cantidades no despreciables; para un drogadicto que se inyecte diariamente representa el paso directo a la sangre de importantes cantidades de plomo. Pero recientemente se ha publicado que la cocaína está igualmente adulterada por plomo. Su origen se encuentra en la gasolina con plomo que se utiliza para la preparación de la droga, en lugar de otros disolventes más caros y difíciles de obtener. <sup>(126)</sup>

#### 4.6. Dosis tóxica

Es difícil establecer una dosis tóxica única para el plomo. Al igual que sucede con otros tóxicos, son numerosos los factores que influyen en la toxicidad de este metal. Factores como características individuales, tipo de producto, vía de absorción, etc., van a tener una influencia decisiva. A mero título informativo, y como muestra de ello, se puede señalar que en el adulto 1 g de acetato de plomo

puede producir la muerte y 2-4 g de carbonato de plomo pueden dar lugar a una intoxicación grave. Para otras sales pueden ser necesarias dosis de 20-40 g a fin de producir un cuadro tóxico grave. <sup>(126)</sup>

**Tabla N°3:** Interpretación de la dosificación del plomo. <sup>(126)</sup>

Matriz biológica	Valor normal	Valor patológico
Sangre	≤ 10 ug/dl	> 20-45 ug/dl
Orina	< 50 ug/dl de creatinina	Superior a 150 ug/dl

## 4.7. Fisiopatología

### 4.7.1. Toxicocinética

#### a) Absorción

El plomo puede penetrar en el organismo por tres vías: respiratoria, digestiva y cutánea.

**Vía respiratoria.** Es la más importante en el medio laboral; por ella se inhalan humos, vapores y polvos. Las partículas inhaladas suelen ser microscópicas, de ahí que penetren fácilmente hasta el alveolo y sean retenidas. Se calcula que el 50 % de las partículas inhaladas son retenidas y de éstas se absorberá el 90 %. <sup>(56)</sup>

**Vía digestiva.** Por esta vía se producen las intoxicaciones agudas en casos de suicidio, contaminaciones alimenticias, etc., aunque ello resulta excepcional en nuestros días. La ingestión de plomo tiene dos orígenes:

- ✓ La ingestión de alimentos contaminados en la cadena de polución por comer o fumar con las manos sucias como resultado de una mala higiene personal, o por el caso ya referido de la «pica» en niños que chupan paredes u objetos pintados con colorantes plúmbicos.

- ✓ La deglución del plomo inhalado y que quedó retenido en el moco de la nasofaringe y bronquios. Este plomo que penetra por vía digestiva (a excepción del acetato de plomo) es insoluble, de ahí que la absorción sea muy escasa, se estima que puede oscilar entre un 5 y 10 % del ingerido. En casos especiales (niños enfermos del aparato digestivo o dietas especiales que alteran la solubilidad del plomo) podría aumentar la absorción hasta el 25 %.

En sujetos normales la cantidad de plomo eliminado por las heces y orina puede alcanzar hasta el 95 % del total ingerido, lo que representa un 200-500 ug/día. Cifras superiores a 500 ug/día supondrían una ingesta excesiva de plomo.

**Vía cutánea.** Los derivados inorgánicos de plomo no se absorben por la piel íntegra. Sin embargo los derivados orgánicos, que son muy liposolubles, pueden absorberse esta vía, sobre todo el tetraetilo y el tetrametilo de plomo. El naftenato presente en ciertas grasas y aceites industriales puede absorberse por esta vía.

#### b) **Distribución y metabolismo**

De todos los esquemas propuestos para explicar la distribución del plomo en el organismo, quizá sea el de RABINOWITZ <sup>(94)</sup> el más exacto y didáctico (**Esquema N°12**). Para este autor la distribución se hace siguiendo tres compartimentos: sangre, tejidos blandos y esqueleto.

Una vez absorbido, el plomo pasa a la sangre. El 90 % del plomo circulante está ligado a los hematíes. Su vida media es de unos 35 días. Este compartimento central está en contacto directo con las vías de absorción y excreción renales, y con los otros compartimentos, con los que mantiene una situación de equilibrio. Además de este plomo ligado al hematíe, <sup>(57)</sup> hay otra fracción sérica ligada a las proteínas ricas en azufre.

El segundo compartimento lo forman los tejidos blandos, principalmente el riñón y el hígado; <sup>(71,80)</sup> en él se contienen 0,3 a 0,9 mg de plomo. Su vida media biológica es de 40 días.

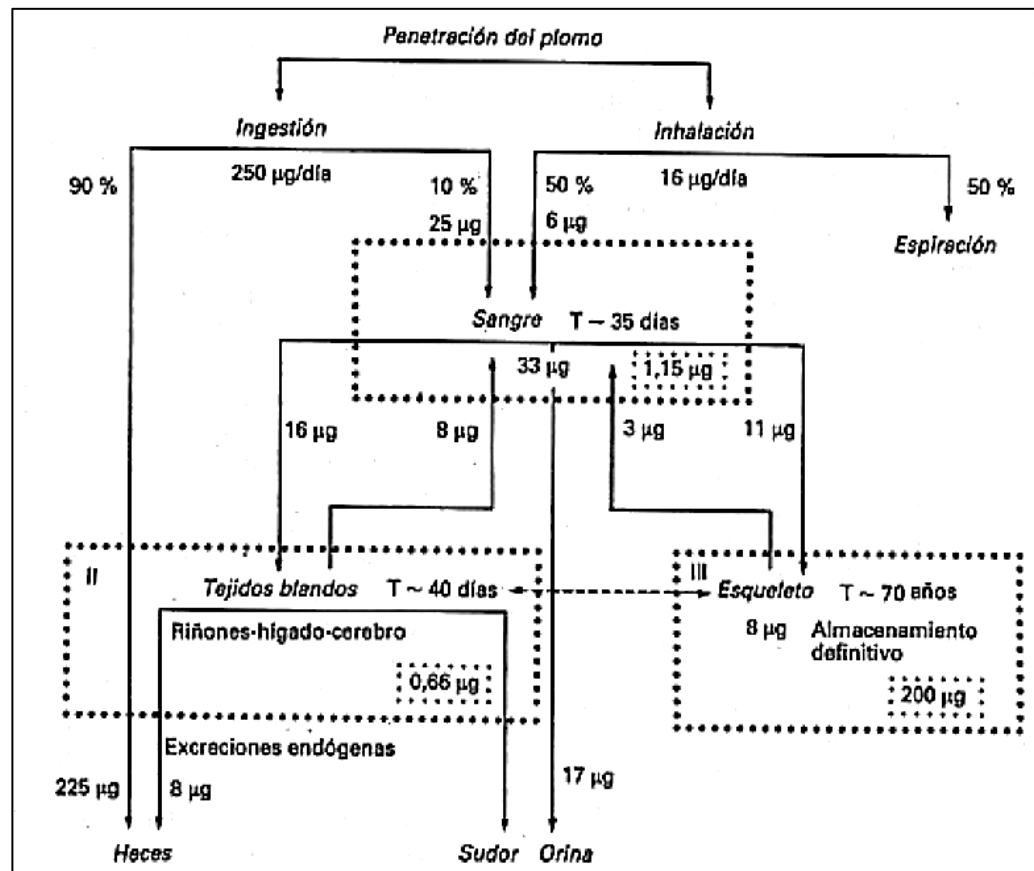
El tercer compartimento lo constituye el hueso, que contiene el 90 % del plomo almacenado en el organismo.

El plomo sigue los movimientos del calcio en lo que a su depósito y movilización se refieren. Se fija en el hueso y resulta muy difícil su movilización al formar compuestos muy estables. Las zonas óseas donde el plomo se deposita con preferencia son las más activas metabólicamente, como las metáfisis y las epífisis. Estudios más recientes, llevados a cabo determinaron la concentración de plomo en diferentes tipos de huesos (tibia y calcáneo) usando fluorescencia de rayos X (109 cd KXRF), demuestran que el esquema no es tan simple y que influye el tipo de hueso, la edad de la persona - mayor o menor de 40 años - y el nivel de exposición.

Este almacenamiento óseo es importante porque, en situaciones patológicas de acidosis, descalcificación, dieta, etc., puede movilizarse calcio del hueso, y entonces el plomo se movilizará con él produciéndose cuadros agudos de intoxicación. Este proceso puede ser particularmente importante en la mujer gestante que contenga una gran cantidad de plomo almacenado en el hueso, ya que se estima que el hueso puede aportar hasta un 50 % de la concentración de plomo circulante, que atravesaría la placenta y podría lesionar el cerebro del feto en formación.

Tras ser absorbido, el plomo en el organismo sigue un modelo tricompartmental:

- a) El sanguíneo (el 2 % del contenido total, cuya vida media es de  $36 \pm 5$  días)
- b) El de los tejidos blandos (cuya vida media es algo más prolongada,  $40 \pm 5$  días)
- c) El óseo (que representa el 90 % del contenido total con una vida media entre 10 y 28 años) <sup>(50)</sup>



Esquema N°12: Distribución del plomo en el organismo. <sup>(94)</sup>

### c) Excreción

El plomo se excreta fundamentalmente por orina (80 %) y de forma secundaria por heces, sudor, saliva y faneras. En una persona no expuesta profesionalmente, el balance - absorción/excreción - debe ser «cero» o ligeramente positivo (alrededor de 10 µg /día). En personas expuestas al plomo se irá acumulando en el hueso de modo progresivo; ello tendrá una repercusión directa sobre la plumbemia y la plumburia, que estarán aumentadas con relación a la población no expuesta. Estos hechos pueden sufrir modificaciones importantes, sobre todo por el plomo que penetra por vía digestiva, ya que del 5 al 10 %, que es la proporción que se absorbe normalmente, se puede pasar al 50 % en caso de niños cuando la dieta es baja en calcio, hierro o zinc.

La leche, que se venía administrando de forma empírica a los obreros para impedir la absorción de plomo, se ha comprobado que produce efectos contrarios y favorece la absorción.<sup>(126)</sup>

#### 4.7.2. Mecanismo de acción

El plomo tiene gran afinidad por los grupos sulfhidrilo, en especial por las enzimas dependientes de zinc. El mecanismo de acción es complejo; en primer lugar parece ser que el plomo interfiere con el metabolismo del calcio.

El plomo altera el calcio de las siguientes formas:

- ✓ Reemplaza al calcio y se comporta como un segundo mensajero intracelular, alterando la distribución del calcio en los compartimentos dentro de la célula.
- ✓ Activa la proteinkinasa C, una enzima que depende del calcio y que interviene en múltiples procesos intracelulares.
- ✓ Se une a la calmodulina más ávidamente que el calcio, ésta es una proteína reguladora importante.
- ✓ Inhibe la bomba de Na-K-ATPasa, lo que aumenta el calcio intracelular.

Finalmente esta alteración a nivel del calcio traería consecuencias en la neurotransmisión y en el tono vascular lo que explicaría en parte la hipertensión y la neurotoxicidad. Por otro lado, el plomo es tóxico para las enzimas dependientes del zinc, los órganos más sensibles a la toxicidad son el sistema hematopoyético, el sistema nervioso central y el riñón. Interfiere con la síntesis del hem, ya que se une a los grupos sulfhidrilos de las metaloenzimas como son la d- aminolevulínico deshidratasa, coproporfirinógeno oxidasa y la ferroquelatasa, siendo el resultado final, el aumento de las protoporfirinas como la zinc-protoporfirina (ZPP) y la anemia.

A nivel renal interfiere en la conversión de la vitamina D a su forma activa, produce una tubulopatía, que en estadios más avanzados llega a atrofia tubular y

fibrosis sin compromiso glomerular, caracterizándose por una proteinuria selectiva. En niños se puede ver un síndrome semejante al de Fanconi, con aminoaciduria, glucosuria, e hipofosfatemia, sobre todo en aquellos con plumbemias altas. Varias funciones del sistema nervioso central están comprometidas, principalmente porque el plomo altera en muchos pasos el metabolismo y función del calcio como explicamos previamente. El plomo se acumula en el espacio endoneural de los nervios periféricos causando edema, aumento de la presión en dicho espacio y finalmente daño axonal. El plomo depositado en el hueso es importante por tres razones:

- ✓ En el hueso se realiza la medición más significativa de exposición acumulada al plomo. Actualmente en E.E.U.U. y México se usa los rayos X fluorescentes que permiten la medición de plomo en el hueso (tibia), como un indicador de exposición y acumulación.
- ✓ El hueso es reservorio del plomo (95% del plomo corporal total está en el tejido óseo) y puede aumentar en sangre cuando existan procesos fisiológicos o patológicos que provoquen resorción ósea como embarazo, lactancia, hipertiroidismo, etc.
- ✓ También es órgano blanco, ya que el plomo altera el desarrollo óseo.

### 4.7.3. Efectos biológicos del plomo

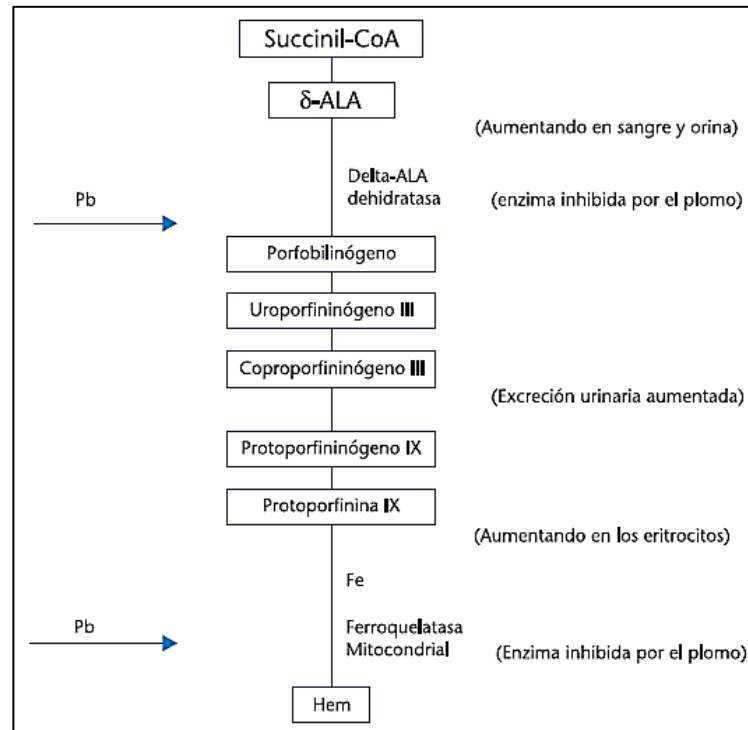
#### **Acción sobre el tejido hematopoyético**

El plomo se fija sobre la médula ósea en una concentración muy superior a la que existe en sangre circulante; de ahí se derivan las siguientes consecuencias:

#### **Alteraciones en la síntesis de la hemoglobina**

El plomo inhibe en el eritroblasto tres enzimas clave que intervienen en la síntesis del hem. <sup>(97)</sup>

- ✓  $\delta$ -ALA-deshidratasa.
- ✓ coproporfirínógiino III-d Descarboxilasa, o coproporfirínógeno III-oxidasa (coprogenasa).
- ✓ hem - sintetasa o ferroquelatasa.



**Esquema N°13:** Síntesis del hem y sus alteraciones debidas al plomo. <sup>(94)</sup>

Como se aprecia en la figura, la síntesis de la hemoglobina se realiza en la mitocondria de los eritroblastos donde se encuentran todas las enzimas necesarias. La acción del plomo está ligada, por tanto, a las alteraciones que produce en la mitocondria y en los ribosomas.

A la alteración de la síntesis del hem se añade un trastorno en la síntesis de la globina. Estudios in vitro han demostrado que el plomo inhibe la síntesis de la globina.

El descenso de los niveles de Hb es más precoz que el número de hematíes.  
(17,57,87,97)

### **Alteraciones de los precursores de los glóbulos rojos**

El plomo produce ciertas alteraciones morfológicas sobre los precursores de los glóbulos rojos que pueden ponerse en evidencia en el examen de punciones de médula esternal. Es frecuente encontrar megaloblastos, eritroblastos con punteados basófilos. La naturaleza de este punteado basófilo, conocido desde hace muchos años, no está aún esclarecido por completo. <sup>(126)</sup>

### **Acción sobre los hematíes circulantes**

Es clásica la anemia saturnina. Es una anemia moderada, normo o hipercroma que aparece cuando el sujeto se expone a niveles altos de plomo (superiores a 80  $\mu\text{g } \%$ ).

Esta anemia tiene diversos orígenes. De una parte, se origina una acción directa del plomo sobre los órganos eritropoyéticos, que produce un déficit en la producción de hematíes. En segundo lugar, se produce también una hemolisis.  
(17,126)

### **Acción sobre los riñones**

Según MORGAN (1977), aproximadamente el 20 % del plomo absorbido se localiza en el riñón: ello indica que en las intoxicaciones agudas se alcanzarán altas concentraciones de metal en este órgano. Dos tercios del plomo absorbido se excreta por el riñón, siguiendo una curva bifásica: en la primera semana se excreta el 50 % del plomo absorbido y el resto a continuación, de modo mucho más lento. La eliminación del plomo por el riñón se realiza por un mecanismo doble de filtración glomerular y excreción tubular; se produce así mismo una cierta reabsorción tubular. <sup>(3)</sup>

### **El hueso como tejido blando del plomo**

Las evidencias experimentales que permiten proponer algunos mecanismos fisiopatológicos probables para el establecimiento de una lesión ósea son: <sup>(30)</sup>

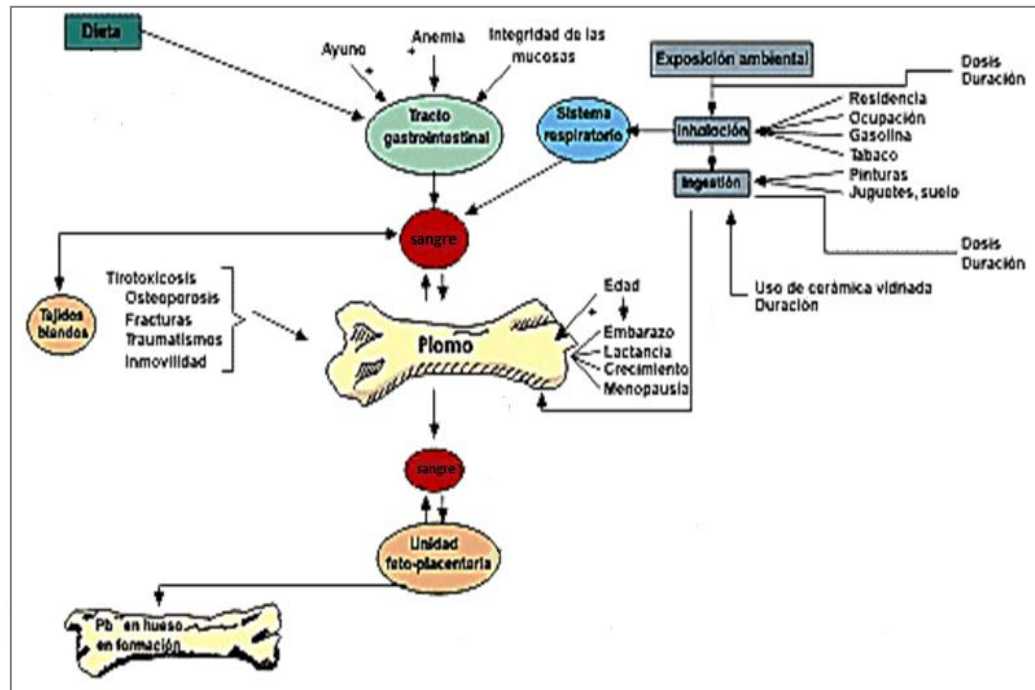
- a) Alteración del cristal de hidroxiapatita y, por consiguiente, alteración de la adhesión de la célula ósea a la matriz mineralizada.
- b) Competencia entre el plomo y el calcio en sus sitios de unión, con alteración de la homeostasis del calcio.
- c) Daño a la capacidad de las células óseas para sintetizar y/o excretar componentes de la matriz (colágeno, sialoproteínas).
- d) Inhibición de la producción de osteocalcina por parte de los osteoblastos.
- e) Alteración en el acople funcional de osteoblastos y osteoclastos. <sup>(30,50)</sup>

### **Plomo en huesos como fuente de exposición**

Aunque desde hace muchos años se ha reconocido que el plomo se acumula en el hueso, se tenía la idea de que se trataba de un secuestro, de un depósito con una sola vía, en el cual se iba acumulando el plomo removido de la circulación y de los tejidos blandos.

Se trata de un concepto totalmente incorrecto, ya que el depósito y la remoción del plomo en huesos sigue exactamente la activa fisiología del calcio, que está sometida a los efectos de factores generales, tales como la nutrición, el ejercicio, y los factores específicos como las influencias hormonales y metabólicas esquematizadas en la **Esquema N°14**, entre los elementos que modifican la fisiología del plomo están los factores de crecimiento, las proteínas derivadas del hueso y otras señales fisiológicas como el 1,2,5 – hidroxicalciferol, los estrógenos, la hormona paratiroidea, la calcitonina, la hormona del crecimiento, la prolactina, la tirotropina y nutrientes como el calcio, el zinc y el fosforo.

La fisiología del hueso, es compleja y por ello diferentes tipos de hueso tienen diferentes tasas de crecimiento y mineralización, así como diferente densidad final. <sup>(50)</sup>



**Esquema N°14:** Modelo biológico del plomo en huesos

*Fuente:* Sanin, Helena y cols. *Acumulación de plomo en huesos y sus efectos para la salud.* Salud Pública Mex 1998; 40:359-368).

Por otra parte hay evidencia de que el plomo óseo puede regresar a la sangre en proporciones sustanciales (45 a 70 % del total de plomo en sangre completa), después de disminuir la exposición exógena o en circunstancias patológicas o fisiológicas que implican mayor resorción ósea, los niveles sanguíneos pueden mantenerse altos o iguales a partir de los depósitos óseos, aun después de retirar la exposición aguda a plomo. <sup>(33)</sup>

El embarazo implica una mayor demanda de calcio, tanto de la dieta como de los almacenamientos fisiológicos en tejido óseo. Estas demandas surgen de los requerimientos fetales para osificación y crecimiento, los cuales tienen su acmé durante el tercer trimestre de embarazo.

El hueso materno sirve de fuente de calcio en esa etapa. Se observa cambios en la tasa de formación y resorción, especialmente en mujeres embarazadas con dietas

deficientes en calcio. Esta movilización ósea estimula en gran medida la liberación de plomo, el cual atraviesa libremente la barrera placentaria, de tal forma que el plomo de hueso se convierte no solo en fuente endógena para la madre sino también para el feto en desarrollo.

Datos experimentales confirman que tanto el plomo depositado en hueso materno como el proveniente de la dieta son transferidos al feto con avidez y el plomo en hueso puede ser removido particularmente durante la lactancia. <sup>(37)</sup> Thompson informo en 1985 acerca de la existencia de manifestaciones clínicas de intoxicación aguda por plomo en una mujer embarazada y su bebe, como consecuencia de la movilización del plomo almacenado en huesos. <sup>(50,126)</sup>

### **Acciones sobre el sistema nervioso**

No existe duda alguna de que, en el curso de intoxicaciones agudas con altas concentraciones de plomo en sangre ( $> 80 \mu\text{g} \%$ ), se produce una clara encefalopatía, demostrable tanto en la clínica como por el electroencefalograma. En lo morfológico, los efectos del plomo sobre el sistema nervioso central no son específicos. Se observa edema, multiplicación de las células endoteliales, proliferación glial, degeneración neuronal y focos de necrosis. Es decir, hay una combinación de mecanismos vasculares (anoxia) y lesiones directas. <sup>(6, 19, 36, 90, 110, 120)</sup>

El plomo afecta también al sistema nervioso periférico con producción de una neuropatía de predominio motor, más frecuente en los adultos que en los niños, y en el varón que en la mujer, que afecta los miembros superiores.

### **Interacciones con otros metales**

CASSARET refiere la interrelación del plomo con otros metales que pueden condicionar la toxicidad de aquél. Así, una deficiencia en calcio, hierro y zinc en la dieta aumenta la toxicidad del plomo. En los animales con bajos regímenes de Calcio se produce una retención de plomo al disminuir la excreción renal.

En el niño los niveles altos de plomo en sangre se asocian a niveles bajos de 25-hidroxivitamina D (sintetizada en el hígado) y 1-25-hidroxivitamina D (sintetizada en el riñón). Los animales que tienen en su dieta bajas concentraciones de Zn acumulan mayor cantidad de plomo en los huesos. <sup>(126)</sup>

#### 4.7.4. Cuadro clínico

##### **Intoxicación aguda**

Esta forma de intoxicación puede aparecer tras la ingestión de una sal soluble (acetato de plomo) o de una cantidad importante de un alimento contaminado, o como consecuencia de la «pica» en niños. Produce tres tipos de síndromes:

- a) *Síndrome digestivo*. Dolores epigástricos y abdominales violentos, estreñimiento o diarrea, al comienzo, y luego estreñimiento.
- b) *Síndrome hepatorenal*. hepatomegalia y subictericia. Más importantes son las lesiones renales con oliguria, uremia, albuminuria, aminoaciduria y cilindruria. (22,28,71,80,119)
- c) *Encefalopatía*. En los adultos suele ser tardía y los síntomas predominantes son los correspondientes a un edema cerebral: cefaleas intensas, obnubilación, convulsiones y evolución al coma.

##### **Intoxicación crónica**

Se distinguen tres fases en la intoxicación crónica por el plomo. <sup>(126)</sup>

- a) Fase de presaturismo o de impregnación  
Este estadio clínico se alcanza cuando se presenta una plumbemia de 60-70 ug/100ml. Subjetivamente se presenta cansancio, dispepsia, dolores abdominales

y musculares, artralgias, insomnio y alteraciones del carácter, pérdida de fuerza y adelgazamiento. El diagnóstico en este momento es difícil, y el paciente puede ser etiquetado de enfermo reumático.

b) Fase de intoxicación franca

Se acrecientan los síntomas ya señalados en la fase de pre-saturnismo: anorexia, adelgazamiento, dolores musculares y cansancio.

c) Fase de impregnación antigua

Esta fase, señalada por LAUWERYS, <sup>(63)</sup> sería la consecuencia de una exposición prolongada al plomo. Trabajadores que han estado expuestos durante muchos años a cifras de 60 ug %, que podrían ser bien toleradas clínicamente, pueden presentar cuadros de hipertensión permanente y nefritis.

#### 4.7.5. Diagnóstico

Es necesario considerar el plomo ante: cuadros de abdomen agudo repetidos que asemejan una pancreatitis, cuadros de polineuritis de miembros superiores, cuadros reumáticos, anemias y encefalitis en los niños. <sup>(53)</sup>

##### **Investigación toxicológica**

- ✓ Recuento de hematíes con granulocitos basófilos.
- ✓ Dosificación de plomo en sangre.
- ✓ Dosificación del plomo urinario.

#### 4.7.6. Tratamiento

En general, el tratamiento dependerá del tipo de exposición (aguda, crónica), de la magnitud del compromiso del paciente y del nivel del plumbemia.

Tanto en la intoxicación aguda como en la crónica el tratamiento se basa en las siguientes medidas principales: <sup>(53)</sup>

- ✓ Medidas de soporte vital.
- ✓ Alejar al paciente de la fuente de exposición.
- ✓ Tratamiento de los cuadros clínicos acompañantes (cólicos saturnino, encefalopatía, insuficiencia renal, etc.).
- ✓ Tratamiento quelante.

### **Intoxicación aguda**

#### *a) Medidas de soporte vital*

#### *b) Medidas de descontaminación:*

- ✓ Exposición oral: medidas de descontaminación digestiva (vaciado gástrico, carbón activado, etc.)
- ✓ Exposición respiratoria: alejar al paciente de la fuente de exposición, administración de oxígeno si es necesario.
- ✓ Exposición cutánea: lavado con abundante agua y jabón.

*c) Tratamiento quelante:* se inicia en los casos de intoxicación aguda o en las agudizaciones de las intoxicaciones crónicas, en las que el paciente presenta signos de intoxicación o con plumbemias superiores a 60 µg/dl.

#### *d) Tratamiento sintomático:*

- ✓ En el cólico saturnino: antiespasmódicos.
- ✓ En la encefalopatía saturnina: tratamiento de HTA, tratamiento de las convulsiones (barbitúricos).
- ✓ Combatir el shock. <sup>(53)</sup>

### **Intoxicación crónica**

Tratamiento quelante con

- a) *Edetato disódico cálcico (EDTA)*: es el quelante de elección en pacientes sintomáticos y con plumbemias superiores a 60  $\mu\text{g}/\text{dl}$ .  
Dosis: 30 – 50 mg/kg/día diluido en dextrosa al 5 %, infundir por goteo EV en 6 a 8 horas, por 5 días consecutivos. Por lo tanto el tratamiento requiere la hospitalización del paciente.
- b) *Dimercaprol o 2,3 dimercaptopropanol (BAL)*: se asocia al EDTA en casos de encefalopatía o plumbemia mayor a 100  $\mu\text{g}/\text{dl}$  en adultos, o mayor de 60  $\mu\text{g}/\text{dl}$  en niños.  
Dosis (adulto y niños): 3 a 5 mg/kg/dosis vía IM, 4 horas antes de iniciar la infusión de EDTA.; el primer y el segundo día cada 12 horas.
- c) *D-Penicilamina*: está indicada en intoxicaciones crónicas con plumbemias por debajo de 50  $\mu\text{g}/\text{dl}$ , sin embargo, no es un antídoto de primera línea para casos graves, pues su capacidad quelante es inferior al de otros antídotos.
- d) *Acido 2,3-dimercaptosuccinico o succimero (DMSA)*: es un derivado del dimercaprol, de uso oral, quelante del plomo, arsénico y mercurio. Está indicada en niños con plumbemia entre 45 y 70  $\mu\text{g}/\text{dl}$ , en ausencia de manifestaciones sugestivas de encefalopatía.<sup>(53)</sup>

#### 4.8. La problemática del plomo en el Perú

En el Perú, la calidad ambiental es un factor que afecta de manera considerable el estado general de salud

Como se sabe los niveles máximos permisibles para el plomo en aire el Perú es de 1,5  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  según los Estándares Nacionales de Calidad de Aire, D.S. N.º 074-2001-PCM.<sup>(50)</sup>

EL Perú es un país eminentemente minero, es el cuarto productor de plomo en el mundo, por lo que está expuesto a la contaminación ambiental producida por la

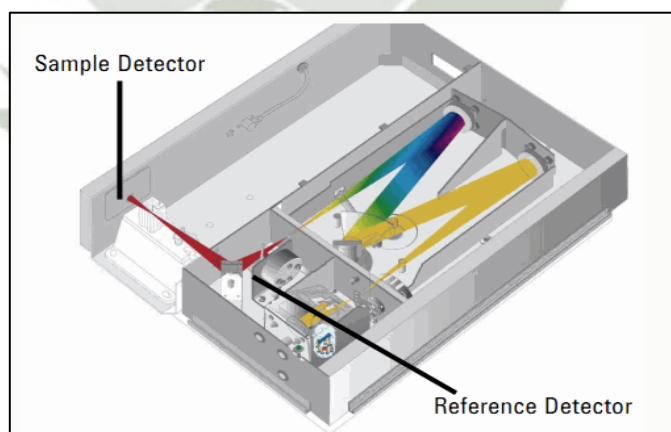
explotación minera formal e informal, así como a los relaves productos de esta actividad. <sup>(51)</sup> se han realizados diferentes estudios en zonas mineras como La Oroya <sup>(91,96)</sup> o en lugares donde es depositado el plomo antes de su exportación como el Callao <sup>(31, 115,116)</sup> donde se ha encontrado altos niveles de plomo en sangre en la población que vive en estas zonas.

Las poblaciones aledañas a relaves mineros, también presentan altos niveles de contaminación por plomo; situación similar a lo observado en otros lugares del mundo en zonas de relaves o con minas abandonadas, <sup>(50)</sup> por lo que no es recomendable que en estas zonas habiten poblaciones por los riesgos para la salud que ello implican y que las mineras realicen estrategias para evitar las consecuencias ambientales de los productos en su actividad. <sup>(50)</sup>

## 5. ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA – VISIBLE

### 5.1. Instrumentación

La espectroscopia ultravioleta-visible es una extensión de la colorimetría ya que permite determinar la absorción de luz en una muestra, en el intervalo de longitudes de onda comprendido entre 190 y 700 nm. <sup>(21)</sup>



**Esquema N°15:** *Instrumentación del UV-VIS.* <sup>(21)</sup>

**Fuente de luz**

Debe tener alta intensidad, baja área superficial, extenso rango espectral, y salida estable en el tiempo.<sup>(21)</sup>

**Monocromador**

Es un detector de longitudes de onda que seleccione una cierta porción de radiación continua es decir tras pasar por varios espejos (seleccionan la luz visible o ultravioleta) y lentes (concentran la luz) el haz de luz policromada (compuesto por muchas longitudes de ondas) es en primer lugar colimado (transformado en luz monocromada de una sola longitud de onda) por el monocromador.<sup>(21)</sup>

Debe cumplir:

- ✓ Absorción mínima de luz
- ✓ Alta precisión al seleccionar la longitud de onda
- ✓ Alta pureza espectral en un rango amplio de longitudes de onda

Puede tratarse de un prisma, una red de difracción o ambos a la vez.

**Cubetas o cámara de muestra**

Estas son de volumen variable, normalmente 3 – 5 ml. Puede ser de material de vidrio, plástico o cuarzo (UV).<sup>(21)</sup>

**Detector**

Es aquel que convierte la energía luminosa en una corriente eléctrica.<sup>(21)</sup>

**5.2. Absorción de luz: ley de Beer – Lamber**

La relación entre la absorción de luz por una solución diluida o por un gas y la concentración de la fase absorbente viene dada por la ley de Beer. La relación

entre la absorción de la luz y el camino recorrido por esta (o sea, el espesor de la cubeta) viene dada por la ley de Lambert. Es conveniente considerar ambas leyes conjuntamente.

La ley de Lambert – Beer permite determinar la concentración de una sustancia a partir de la absorbancia.<sup>(21, 98)</sup>

### 5.3. Desviación de la ley de Beer

Los factores más comunes que originan estas desviaciones son cinco

#### **Empleo de luz no monocromática**

La luz verdaderamente monocromática solo puede obtenerse en un alto grado con fuentes de emisión muy especializadas. Todos los monocromadores cualquiera que sea su calidad y tamaño tienen un poder de resolución finito y, por consiguiente un paso de banda instrumental mínimo. Sin embargo, si la absorbancia es esencialmente constante en la amplitud del paso de la banda instrumental, la ley de Beer concuerda con límites bastante precisos. De esta forma si la constante de absorbancia no es constante en el intervalo de longitudes de onda usado, la ley de Beer produce errores.<sup>(21)</sup>

#### **Asociación o disociación de las especies absorbentes de luz**

Ocurre a veces que la concentración de las moléculas que realmente absorben luz no es igual a la concentración total de la sustancia que se desea determinar. En tales casos puede suceder que la concentración de la sustancia absorbente no aumente o disminuya proporcionalmente a la concentración total.<sup>(21)</sup>

#### **Adición insuficiente del reactivo cromógeno**

Muchas determinaciones analíticas se realizan adicionando un reactivo que forma un producto coloreado con el elemento a determinar. El reactivo debe ser agregado suficientemente.

### **Fluorescencia y turbidez**

Una ligera turbidez en la muestra a analizar puede pasar desapercibida y sin embargo origina un aumento considerable de la absorción de luz, especialmente a pequeñas longitudes de onda.

## **6. VOLTAMPEROMETRIA Y POLAROGRAFIA**

### **6.1. Introducción**

La voltamperometría y polarografía comprende un grupo de técnicas electroquímicas que se basan en la respuesta *corriente-potencial* de un electrodo durante un proceso electroquímico. Un diagrama de la corriente en función del potencial aplicado se llama un voltamograma y es el equivalente electroquímico de un espectro en espectroscopia, proporcionando la información cuantitativa y cualitativa sobre la especie implicada en la reacción de oxidación o de reducción. El fundador de estos métodos, Jaroslav Heyrosky (1890-1967 premio Nobel en Química en 1959) introdujo el electrodo de gota de mercurio como electrodo de trabajo. El electrodo consiste en un capilar de vidrio de paredes gruesas del cual las gotas de mercurio caen en la solución de la muestra bajo la presión de una columna de mercurio, además introdujo el término de polarografía. El término voltamperometría resulta de volt-am (perios)-metry y no debe ser confundido con voltametría (con una sola m) el cual es descrito como una valoración potenciométrica con corriente controlada.

Los términos polarografía y voltamperometría son frecuentemente usados inadecuadamente. De acuerdo a la IUPAC, el término polarografía debe ser usado cuando la curva de la corriente en función del potencial es graficada empleando un electrodo de trabajo con un líquido, del cual la superficie puede ser renovada periódica o continuamente (ej. Gotas). Esto incluye el clásico electrodo de goteo de mercurio (DME) y el subsecuente electrodo de gota de mercurio estática (SMDE). La voltamperometría incluye todos los métodos en el

cual la medición de potencial de la corriente esta hechos en un electrodo fijo y estacionario.

Esto incluye el electrodo de gota colgante de mercurio (HMDE), el electrodo de capa fina de mercurio (TMFE), electrodo de glassy carbón (GCE) y electrodos de pasta de carbón (CPE). Los electrodos de trabajo hechos de metales nobles (oro, platino) son usados menos frecuentemente. Varios métodos son atribuidos a los términos de polarografía y voltamperometría; estos difieren en la técnica de medición y el tipo de potencial eléctrico de excitación usado en el proceso de la determinación <sup>(39, 42, 89)</sup>.

## 6.2. Instrumentación

Consiste en: <sup>(5)</sup>

- ✓ Fuente de voltaje
- ✓ Porta electrodos (con electrodos)
- ✓ Celda electroquímica
- ✓ Unidad de registro de corriente

Aunque los primeros métodos Voltamétricos hacían uso de solo dos electrodos, la voltamperometría moderna hace uso de tres electrodos sumergidos en una solución que contiene analito y un exceso de un electrolito de soporte <sup>(42)</sup>.

- ✓ El electrodo de trabajo (WE), el más importante del sistema electroquímico, su potencial varía de manera lineal con el tiempo. Existen dos tipos el MME (electrodo multimodo) que incluye todos los tipos de electrodos de mercurio (DME, SMDE, HMDE) y el RDE para aplicaciones especiales.
- ✓ El electrodo de referencia (RE): que ofrece un potencial estable. Los potenciales en el WE se aplican con respecto al potencial de referencia constante. Hoy en día se utiliza principalmente sistemas de Ag/AgCl.

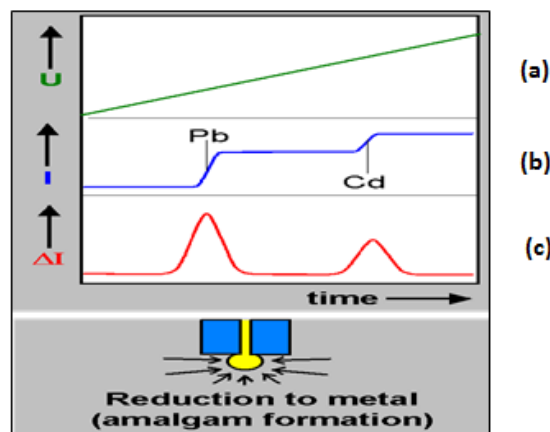
- ✓ El tercer electrodo es el electrodo auxiliar (AE): la corriente fluye entre el trabajo y electrodo auxiliar. Existen dos tipos disponibles: platino (Pt) y carbón vítreo (GC)<sup>(5,42)</sup>.

En voltametría se han empleado mucho los electrodos de mercurio, por varias razones: una de ellas es por el potencial negativo relativamente grande que se puede lograr con el mercurio, debido al alto sobrevoltaje del hidrogeno sobre el mercurio. Éste sobrevoltaje permite la determinación de metales que se reducen con potenciales negativos, hasta amalgamas en la superficie de un electrodo de mercurio. Además, se forma rápidamente una superficie metálica fresca con una nueva gota de mercurio<sup>(42)</sup>.

### 6.3. Principio de la voltametría

La voltamperometría se basa en el **Esquema N°16-** en donde la aplicación de una rampa de voltaje (a), al alcanzarse el potencial de reducción del metal este se reduce se disuelve en el mercurio del electrodo (b), esta reacción produce una corriente, que es medida(c).

La corriente fluye cuando la sustancia es oxidada o reducida en el electrodo. Sin reacción electroquímica no existe corriente<sup>(5)</sup>.



**Esquema N°16:** Principio de la voltamperometría<sup>(50)</sup>

#### 6.4. Métodos voltamétricos

##### **Voltametría de Barrido Lineal (VBL)**

El potencial aplicado (un barrido lineal) varía rápidamente (20-200mV/seg) y toda la corriente es monitorizada directamente. La sensibilidad no es extremadamente alta y algunas distorsiones en el resultado de las ondas pueden ser dificultades para el análisis cuantitativo.<sup>(5)</sup>

##### **Voltametría Directa Simple (DC)**

La voltametría DC es la clásica, es la medición voltamétrica más simple con una limitada sensibilidad. Es principalmente utilizado para la investigación de sistemas reversibles redox.<sup>(5)</sup>

##### **Voltametría de Onda Cuadrada (SqW)**

La voltametría de onda cuadrada es principalmente adecuada para procesos reversibles. Es usada particularmente para voltametría de stripping sensitiva en el modo HMDE o RDE.<sup>(5)</sup>

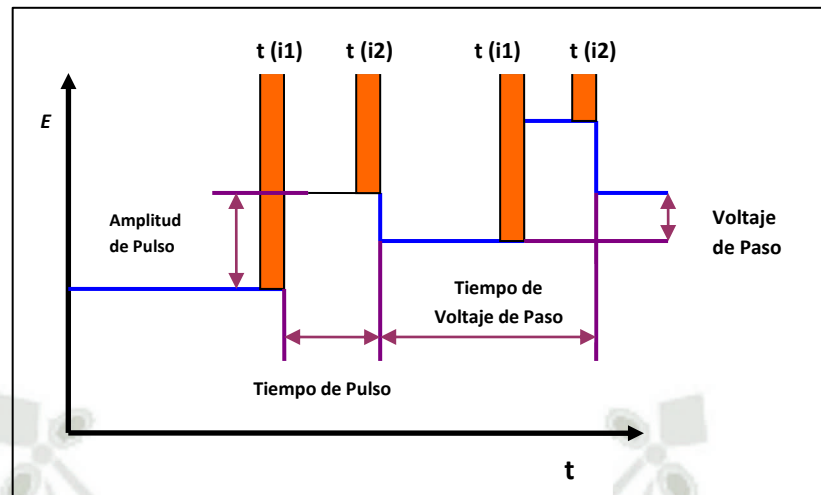
##### **Voltametría Cíclica (CV)**

La voltametría cíclica es principalmente usada para investigar la reversibilidad del proceso del electrodo y para estudios cinéticos<sup>(5)</sup>.

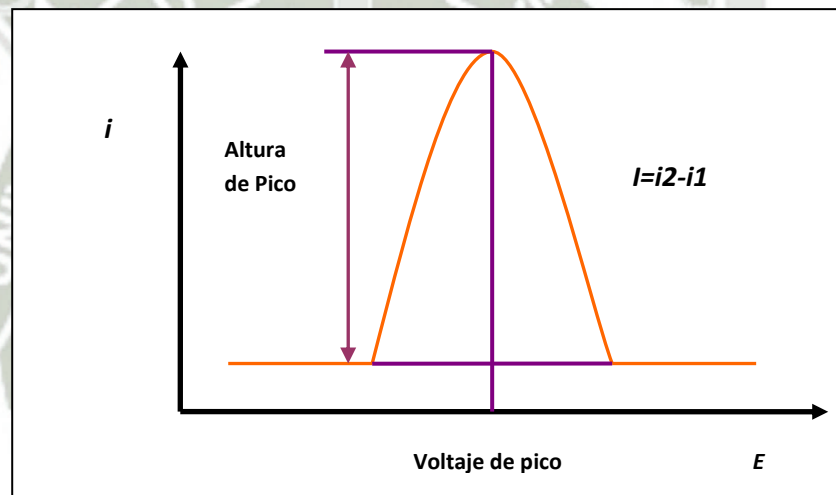
##### **Voltametría de Pulso Diferencial (PD)**

La voltametría de pulso diferencial, es una de las técnicas electroanalíticas que alcanzó una gran popularidad a partir de 1970. Es el modo de medición universal y más frecuentemente usado, es apropiado para sistemas reversibles e irreversibles y ofrece una alta sensibilidad. Para la voltametría PD, la corriente  $i$  es medida en función del voltaje  $U$  inmediatamente antes del pulso  $t$  ( $i_1$ ) y al final del pulso  $t$  ( $i_2$ ), **Esquema N°17**.

De las diferencias entre las dos mediciones de corriente, los picos de la curva obtenidos son evaluados usando base lineal, polinomial o exponencial<sup>(42)</sup>.



Esquema de Voltametría Pulso Diferencial.<sup>(50)</sup>



Esquema N°17: Esquema de Voltametría Pulso Diferencial.<sup>(50)</sup>

### Voltamperometría de redisolución

Una de las más importantes técnicas de voltamperometría cuantitativa es la voltamperometría de redisolución ya que proporciona los límites de detección más bajos para los metales ( $10^{-9}$ - $10^{-12}$ ). Es decir, detecta iones metálicos con una exactitud razonable, en pocos minutos y en un margen de concentración como el antes expresado. Los métodos de redisolución están basados en el siguiente

concepto: la sustancia a determinar se pre-concentra en el electrodo y posteriormente es devuelta a la disolución por un proceso inverso <sup>(39, 5, 42)</sup>.

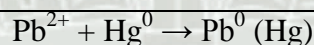
Gracias a la voltamperometría de redisolución se ha conseguido:

- ✓ Pre-concentrar sustancias que antes no era posible al ser consideradas no electroactivas.
- ✓ Desarrollar métodos impulsionales, de onda cuadrada, voltamperometría de corriente alterna, las cuales permiten aumentar la sensibilidad de las determinaciones, pudiéndose llegar en algunos casos a determinar concentraciones de orden  $\mu\text{g/L}$  e incluso  $\text{pg/mL}$ .

Se compone de tres técnicas relacionadas: anódica, catódica y voltamperometría de adsorción. Ya que la voltamperometría de redisolución anódica ha encontrado la aplicación más amplia, la hemos considerado con mayor detalle <sup>(39, 5, 42)</sup>.

**a) Etapa de pre-concentración:**

Objetivo: traspasar el analito de la disolución a la gota de mercurio (electrodo de trabajo).



Pre-concentración mediante electrolisis

Distintos aspectos influyen en esta primera etapa:

La sustancia, el analito, puede llegar al electrodo de tres maneras distintas: por migración (debido a atracciones electrostáticas), por difusión (debido al gradiente de concentración) y por convección (fuerzas mecánicas de agitación). La temperatura, debe estar controlada, ya que, el coeficiente de difusión depende de ella. El tiempo, a medida que aumentamos el tiempo, la cantidad de analito depositado en el electrodo aumenta. Por otro lado la intensidad de corriente disminuye con el tiempo. Para que el proceso mantenga su intensidad

prácticamente constante tendremos que utilizar volúmenes grandes de disolución, superficies pequeñas de electrodo y tiempos de electrodeposición cortos<sup>(39, 5, 32)</sup>.

**b) Etapa de reposo:**

En el proceso de reposo se detiene la agitación y se mantiene el potencial aplicado. Necesitamos que el analito y el electrodo se homogenicen.

**c) Etapa de medida:**

Objetivo: Obtener desde el punto de vista analítico información acerca del depósito que tenemos.

Existen distintas técnicas y la más común es:

Barrido lineal de potencial con respecto al tiempo: Consiste en aplicar al electrodo un potencial cuya variación es una función lineal en el tiempo. En redisolución anódica el barrido lineal consistiría en que el potencial de electrodo se hace variar linealmente hacia potenciales más positivos, registrando la intensidad de la corriente.

En redisolución anódica, a medida que aumenta el potencial se produce un aumento de la intensidad, ya que, aumenta la velocidad de reacción.

En redisolución catódica ocurre lo contrario el potencial varía hacia valores más negativos. A partir de un determinado valor de potencial, la intensidad disminuye al igual que la concentración de sustancia electroactiva<sup>(39, 5, 42)</sup>.

## **6.5. Preparación de muestras para análisis de metales**

Los metales en muestras son determinados por una gran variedad de métodos analíticos. Sin embargo, estos metales presentes en las muestras pueden encontrarse en pequeñas cantidades hecho que hace necesario un pre tratamiento de la muestra. La preparación del material para la determinación del metal tiene

varios propósitos, los cuales varían de acuerdo al tipo de muestra y la demanda particular del análisis.

Algunas funciones de la preparación de la muestra son:

- ✓ Degradar y solubilizar la matriz para la liberación de los metales para su determinación.
- ✓ Extraer los metales de la matriz en un solvente más apropiado para el método analítico a usar.
- ✓ Concentrar los metales presentes en las muestras.
- ✓ Separar un analito de un grupo de analitos de otras especies que puedan estar interfiriendo en el análisis<sup>(106)</sup>.

Los métodos de digestión deben ser seleccionados de acuerdo al tipo de muestra, el metal a ser determinado y finalmente al método analítico, los más comunes son: digestión húmeda en soluciones ácidas, digestión seca y extracción del analito de la muestra sin destrucción total de la matriz. La calcinación seca es útil para muchas muestras como alimentos o muestras botánicas, debido a la rápida y fácil destrucción de grandes cantidades de materia orgánica húmeda; sin embargo si el analito (metal) está presente en forma volátil por ejemplo el metilmercurio la calcinación en seco puede causar la pérdida del analito. Muchas matrices de muestras tanto orgánicas como inorgánicas pueden ser disueltas.

Muchas matrices de muestras tanto orgánicas como inorgánicas pueden ser disueltas por calentamiento en una solución oxidante ácida. Otras muestras pueden ser tratadas por extracción de los metales de la matriz. Este método es frecuentemente usado para muestras de aguas, donde un agente quelante puede ser usado para acomplejar el metal de interés, establecido su fácil separación de la matriz acuosa<sup>(106)</sup>.

## 6.6. Métodos de digestión

Para muestras que contienen mucha materia orgánica, las cuales son analizadas para metales no volátiles, la calcinación seca es un método relativamente simple para la remoción de materia orgánica, que puede ser usado para muestras relativamente grandes y que requieren de cortos tiempos de análisis.

En el método de envase cerrado, la muestra es colocada en un crisol y es calcinada en una mufla. El crisol usado para la calcinación usualmente es de sílica, porcelana, platino o vidrio pírex. El mayor inconveniente de este método es la posible pérdida de algunos elementos por volatilización, contaminación de la muestra por polvo en el aire, ya que debe permanecer abierto a la atmosfera, y la adsorción irreversible de analito en las paredes del recipiente<sup>(106)</sup>.

El grado de pérdida por volatilización depende de la temperatura aplicada, la forma en la cual el analito está presente en la muestra, y el entorno químico en la calcinación. Existen agentes químicos que pueden ayudar a prevenir la volatilización del analito y que además aceleran el proceso de calcinación, los más comunes son el nitrato, magnesio y el óxido de magnesio de alta pureza. Las temperaturas típicas de calcinación se encuentran entre 450 y 550 °C a presión atmosférica, y los residuos son disueltos en un ácido apropiado<sup>(74)</sup>.

La calcinación seca es utilizada para elementos nutricionales que están presentes en alimentos; como Fe, K, Ca Mg y Mn los cuales está en cantidades sustanciales y son estables a temperaturas altas<sup>(74)</sup>.

Entre los tipos de calcinación en seco se encuentran: Extracción orgánica de metales, Extracción con fluidos supercríticos, preparación de muestras por ultrasonido.

### Métodos de digestión húmeda

Los métodos comunes usados para disolver muestras para análisis de metales son la digestión en envase cerrado, digestión en envase sellado y presurizado, y

descomposición asistida con microondas. Los solventes más comunes usados se encuentran en el **Tabla N°4**.

**Tabla N°4:** *Reactivos comúnmente usados en la digestión/disolución de muestras.*

<b>Reactivo</b>	<b>Tipo de muestra</b>
Agua	Sales solubles
Ácidos diluidos	Residuos de cenizas secas, metales y aleaciones fácilmente oxidables, sales.
Ácidos concentrados (ejem.:HNO <sub>3</sub> )	Metales y aleaciones menos fácilmente oxidables, acero, óxidos de metales.
Ácidos concentrados con adición de agentes oxidantes.	Metales, aleaciones, suelos, partículas del aire, minerales refractarios, materia vegetal.
Ácido hidrofúorico	Silicatos u otras muestras de rocas.

**Fuente:** *“Sample preparation techniques in analytical chemistry” John Wiley & Sons, Inc., publication, vol. N° 162, Pag.230.*

Las muestras a ser analizadas para la determinación de metales son preparadas por digestión de la matriz en ácidos fuertes.

En el caso de matrices orgánicas, se usa una mezcla de oxidantes para destruir la matriz orgánica entera y solubilizar la muestra. Comúnmente es usado el ácido nítrico, debido a que no hay posibilidad de formar sales insolubles como puede suceder con el HCl o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El peróxido de hidrogeno puede ser añadido para incrementar el poder oxidante de la solución digestora. Sin embargo el método

no es generalmente recomendado para metales, los cuales tienden a ser perdidos por volatilización<sup>(106)</sup>.

#### **a) Digestión ácida**

El método más simple para la digestión es llevada en un contenedor abierto. Las muestras son secadas, pesadas, y colocadas en un vaso de precipitado, el agente digestor es añadido, el beaker es cubierto con una luna de reloj y colocada en una base caliente, se calienta suavemente para prevenir las salpicaduras. El peróxido de hidrógeno puede ser añadido durante la digestión para ayudar en la oxidación de la materia orgánica: cuando la muestra ha sido digerida completamente, esta se evapora a sequedad y luego es diluida con un ácido para su análisis<sup>(106)</sup>.

#### **b) Digestión asistida por microondas**

Este es un método usado especialmente para muestras pequeñas. Se debe tener extra cuidado en el uso de vasos cerrados a presión. La aplicabilidad de esta técnica es estrictamente dependiente del tipo de la muestra, los carbohidratos son fácilmente mineralizados con ácido nítrico a 180° C, mientras que las grasas, proteínas y aminoácidos presentan digestiones incompletas debido al relativo bajo potencial de oxidación del ácido nítrico a 200 °C, estos materiales requieren la adición de ácido sulfúrico o perclórico con todos los problemas relacionados a sus altas temperaturas y presiones.<sup>(74)</sup>

La digestión de una muestra en un recipiente cerrado en un horno de microondas tiene varias ventajas sobre los métodos de envase abierto. Los contenedores están fabricados con polímeros resistentes a altas temperaturas a menudo policarbonatos o PTFE (politetrafluoroetileno, teflón), y que hace menos probable que contengan contaminantes metálicos que los de vidrio, de cerámica o que los crisoles. El envase sellado elimina la posibilidad de contaminación por polvo en el aire, reducen la evaporación a presión, por lo que es necesario menos solución ácida de digestión. El envase sellado también elimina las pérdidas de las

especies metálicas volátiles, que puede ser un problema en la descomposición de la muestra en un contenedor abierto, especialmente en calcinación seca. Una de las limitaciones es el tiempo requerido para el enfriamiento antes de que el envase pueda ser abierto, lo cual puede tomar horas dependiendo del tipo de equipamiento usado. Existen dos diferentes sistemas disponibles para digestión asistida por microondas; sistema de vaso cerrado a presión y sistema abierto fijo, que funcionan bajo presión atmosférica <sup>(74)</sup>.

El sistema de digestión asistida por microondas se compone de un horno microondas un carrusel giratorio con una o varias bombas de digestión de la muestra, y un sistema de ventilación de estos de manera controlada <sup>(106)</sup>.

### c) Digestión UV

El proceso de oxidación fotoquímica UV representa una mejora prometedora para la descomposición de materia orgánica y, en cierta medida, también la materia inorgánica (ejem. polifosfatos) antes del análisis <sup>(8)</sup>. Se utiliza para la preparación de muestras para espectroscopia, polarografía, voltamperometría y cromatografía de iones para eliminar la matriz orgánica <sup>(26)</sup>. El instrumento ha sido diseñado para la digestión de muestras líquidas que contengan de bajas a moderadas concentraciones de material orgánico. La ventaja de la fotólisis UV es que solo una cantidad pequeña de peróxido de hidrogeno es necesaria y consecuentemente los valores de blanco se mantienen muy bajos <sup>(26)</sup>.

La radiación UV disuelve los componentes de la matriz por la formación de especies oxidantes altamente reactivas ( $H_2O_2$ , radicales hidroxilos, radicales halógenos), los cuales aceleran la descomposición de las sustancias interferentes; el peróxido de hidrogeno es usado como iniciador de la reacción y la energía radiante de la lámpara de mercurio es convertida en calor, la cual acelera la digestión <sup>(26, 35)</sup>.

El sistema consta de una unidad de control con temporizador integrado y una parte separada con lámpara UV, equipo de refrigeración y racks de 12 tubos de digestión de la muestra con volumen de muestra de máx. 12 ml cada uno <sup>(26)</sup>.

## CAPITULO II

### MATERIALES Y METODOS

#### 1. MUESTRA

##### 1.1. Muestra de estudio

Integrada por 24 *ratas albinas Wistar* del Bioterio de la Universidad Católica de Santa María, las cuales fueron intencionalmente intoxicadas con 100 ppm de acetato de plomo vía oral (toxicidad aguda) para posteriormente ser tratadas con solución acuosa de ajo liofilizado (1000  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  de alicina).

##### 1.2. Características de las muestras en estudio

Se eligieron ratas albinas *Wistar* con las siguientes características:

- ✓ Especie : “*Rattus norvegicus*”.
- ✓ Edad : 7 - 9 meses.
- ✓ Sexo : Machos.
- ✓ Peso :  $275 \pm 8$  gramos.

### 1.3. Muestra biológica

*Allium sativum L.* (ajo liofilizado)

- ✓ Cantidad : 500 gramos.
- ✓ Forma : Polvo.
- ✓ Procedencia : Empresa ONMIAGRO S.A.
- ✓ Lugar de obtención : Laboratorio de investigación Proyecto Mercurio de la UCSM.

La muestra fue conservada en un frasco de vidrio ámbar, herméticamente cerrado para protegerlo del aire atmosférico y teniendo la precaución de guardarlo en un ambiente ausente de humedad y luz.

## 2. LUGAR DE EXPERIMENTACIÓN

Para el desarrollo del presente trabajo de investigación, se albergó a los animales de experimentación en el Bioterio de la Universidad Católica de Santa María, lugar donde se administró el tratamiento y posteriormente se extrajeron las muestras biológicas; al mismo tiempo se utilizaron los ambientes del laboratorio de investigación “LPM” ubicado en el pabellón H – 202, donde se realizaron los análisis correspondientes.

## 3. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

### 3.1. Material de vidrio

- ✓ Embudo de vidrio.
- ✓ Espátula.
- ✓ Fiolas de 100, 10 y 5 ml.

- ✓ Micropipetas de 100, 25 y 10  $\mu$ l.
- ✓ Pipetas de 1, 2, 5 y 10 ml.
- ✓ Placas petri.
- ✓ Probetas 100 y 10 ml.
- ✓ Termómetro.
- ✓ Tubos de cuarzo.
- ✓ Tubos de ensayo.
- ✓ Beakers de 1000 y 50 ml.

### 3.2. Otros materiales

- ✓ Agua de mesa.
- ✓ Algodón.
- ✓ Barbijos.
- ✓ Bolsa de polietileno.
- ✓ Capilares heparinizados.
- ✓ Eppendorf.
- ✓ Espátula.
- ✓ Equipo de disección.
- ✓ Guantes quirúrgicos.
- ✓ Jaulas de 60 x 40 x 30 cm.
- ✓ Trípode y malla de asbesto.
- ✓ Selladora de plásticos.

### 3.3. Reactivos

- ✓ Ácido Nítrico 65 % Suprapur. Merck.
- ✓ Ácido Acético Glacial. P.A. Merck.
- ✓ Ácido tricloroacético al 40 % .Merck.
- ✓ 2,4-Dinitrofenilhidrazina (DNPH) 0.0125 %.

- ✓ Agua calidad ultrapura (18.2 M $\Omega$ ).
- ✓ Cloruro de potasio P.A.
- ✓ Estándar de Cadmio (1000 ppm) Merck.
- ✓ Estándar de Plomo (1000 ppm) Merck.
- ✓ Hidróxido de sodio 0.6 N P.A. Merck.
- ✓ Nitrógeno UHP (99.9999%).
- ✓ Peróxido de hidrogeno 30 % P.A. Merck.
- ✓ Piruvato de sodio 0.1  $\mu$ M.

#### 3.4. Equipos

- ✓ Balanza analítica Ohaus Pioneer Tm.
- ✓ Bomba de digestión Microondas Parr.
- ✓ Equipo Barnstead Easy Pure II (agua 18.2 M $\Omega$ ).
- ✓ Equipo de Ultrasonido Brandson 2510-E.
- ✓ Espectrofotómetro UV-VIS (Model 160<sup>a</sup> Shimadzu Serial 28K00690).
- ✓ Estación Voltamétrica (757 VA Computrace). Metrohm.
- ✓ Horno microondas Electrolux EMZ172M1PW.
- ✓ Mechero de Bunsen.
- ✓ Microcentrífuga.
- ✓ Refrigeradora.
- ✓ Sistema de digestión UV - 705 UV Digester Metrohm.
- ✓ Vaso de tapa PTFE y O-ring Parr.

## 4. METODOS

### 4.1. METODOS ANALITICOS

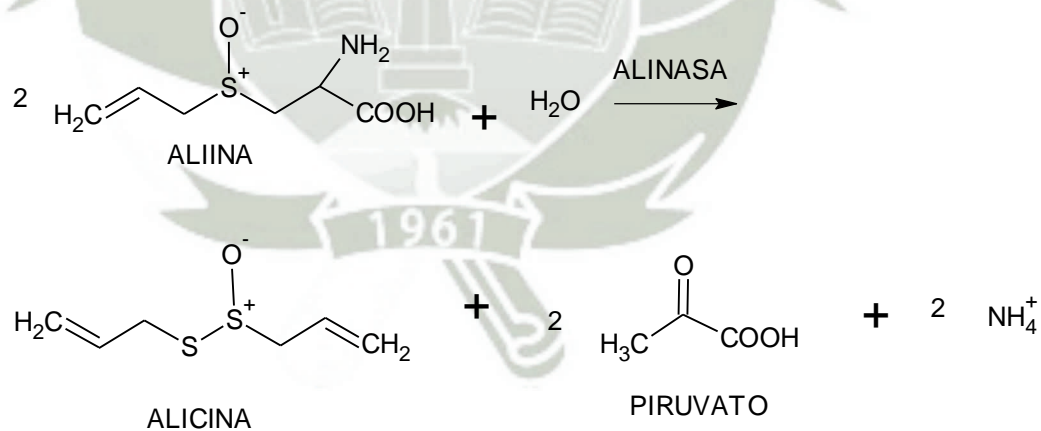
#### 4.1.1. Valoración del principio activo “alicina del ajo”

**Método de Schwimmer modificado, para determinar 2-propentiosulfato de alilo (alicina)**

#### Fundamento

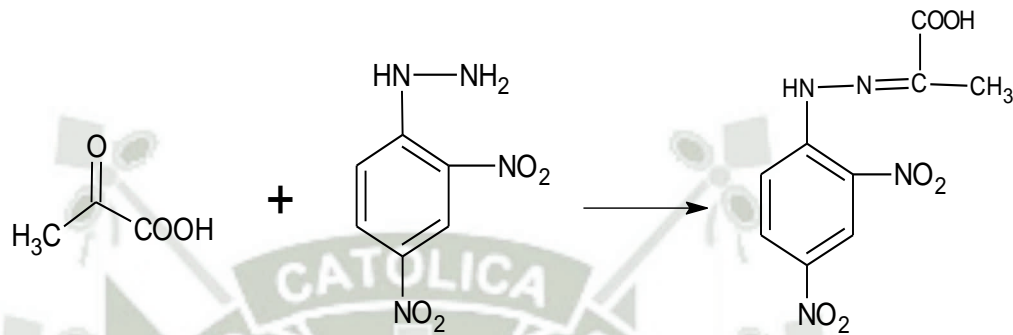
La aliina presente en el ajo es degradada a ácido sulfénico, piruvato y amonio por la acción de la enzima aliinasa cuando el ajo es dañado (**Esquema N°18**). La condensación de dos moles de ácido sulfénico da como resultado 2-propentiosulfinato de alilo: alicina.

Este método valora la alicina indirectamente a través de la determinación de piruvato que es proporcional a la concentración de alicina, ya que por dos moléculas de piruvato se forma una molécula de alicina.



**Esquema N°18:** *Reacción de formación de alicina mediada por la enzima aliinasa.*<sup>(21)</sup>

El piruvato se dosa mediante el uso de una sustancia cromógena como la 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4 DNPH) (**Esquema N°19**) formando la fenilhidrazona del ácido pirúvico de color amarillo-pardoso proporcional a su concentración, por lo que es posible su medición en el espectrofotómetro.



**Esquema N°19:** *Reacción del piruvato con la 2,4 DNPH.*<sup>(21)</sup>

### Preparación de la curva de calibración

#### Procedimiento:

Se procedió a transferir con una micropipeta 200, 400, 600, 800 y 1000 µl de la solución patrón de piruvato de sodio 0.8µM a sendos tubos de ensayo, se añadió a cada tubo 1 ml de la solución de DNPH al 0.0125 %. Se dejó en reposo durante 10 minutos a 38°C y se continuó como se describe bajo el título de “Desarrollo de color”. Para obtener la curva de calibración se procedió a leer en el espectrofotómetro.

#### Muestra problema

#### Procedimiento:

Se pesó y colocó 0.050 g de ajo liofilizado en una fiola de 10 ml, se añadió 5 ml de agua ultrapura y dejó en reposo por 15 minutos a 30 °C.

Se enfrió y añadió 500 µl de ácido tricloroacético al 40 %, posteriormente se enrazó y dejó en reposo durante 20 minutos; finalmente se tomó 1.5 ml de la solución para centrifugarla por 10 minutos a 5000 rpm. Con una micropipeta se

extrajo 500  $\mu$ l del sobrenadante claro para depositarlo en un tubo de ensayo y rotularlo como “Problema”.

### **Muestra control**

#### **Procedimiento:**

Se pesó y colocó 0.050 g de ajo liofilizado en un beaker de 80 ml el cual fue colocado a baño maría e inmediatamente se añadió 5 ml de agua ultrapura a ebullición y se dejó hervir por 5 minutos. Se enfrió y transfirió cuantitativamente el contenido a una fiola de 10 ml al cual se le añadió 500  $\mu$ l de ácido tricloroacético al 40 % y enrazó con agua ultrapura. Se tomó 1.5 ml de la solución y se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos. Con una micropipeta se transfirió 500  $\mu$ l del sobrenadante claro a un tubo de ensayo y se rotuló como “Control”.

### **Desarrollo del color**

#### **Procedimiento:**

Se procedió a pipetear alícuotas de 0.5 ml de las soluciones Problema y Control a sendos tubos de ensayo, se añadió 3.5 ml de agua ultrapura, 1 ml de la solución de DNPH al 0.0125 % y se mantuvo a 38 °C en baño maría durante 10 minutos, posteriormente se enfrió. Se añadió 5 ml de la solución de hidróxido de sodio 0.6 N a uno de los tubos de ensayo y 2 minutos después se hizo la misma operación con el segundo tubo. Se dejó ambos en reposo durante no menos de 8 minutos ni más de 10 minutos y se midió de inmediato la absorbancia a 445 nm.

#### **4.1.2. Validación del equipo (voltámetro – manual metrohm)**

La validación del equipo se efectuó en 2 partes expresas, una validación electrónica y una validación química<sup>(10)</sup>.

*Para la validación electrónica se procedió de la siguiente manera:*

**a) Test de la linealidad**

Se unió los cables del electrodo del VA Computrace en los conectores de la celda estándar incluida en la estación Voltamétrica.

- ✓ Cable del electrodo auxiliar AE al Conector AE.
- ✓ Cable del electrodo de referencia RE al Conector RE.
- ✓ Cable del electrodo de trabajo WE al Conector WE-L.
- ✓ Se cargó el método, Test 757\_L del directorio de métodos y se inició el método.
- ✓ Se registró una línea diagonal.

**b) Test de desempeño del pico**

Se unió los cables del electrodo del VA Computrace en los conectores de la celda estándar incluida en la estación Voltamétrica.

- ✓ Cable del electrodo auxiliar AE al Conector AE.
- ✓ Cable del electrodo de referencia RE al Conector RE.
- ✓ Cable del electrodo de trabajo WE al Conector WE-D.
- ✓ Se cargó el método, Test 757\_L del directorio de métodos y se inició el método.
- ✓ Se registró una curva y se analizó.

*Para la validación química se procedió de la siguiente manera:*

- ✓ Se añadió 20 mL de agua ultrapura en la celda electroquímica.
- ✓ Se añadió 0.5 mL del electrolito KCl (3M) en la celda electroquímica.
- ✓ Se añadió 100  $\mu$ L de la solución estándar de ion Pb (1000 ppm) en la celda de medición.
- ✓ Parámetros de medición:

- Se cargó el método “Test Pb in ion standard solution. mth” desde el directorio métodos.
- Se inició el método.
- La solución es desgasificada y el polarograma es registrado tres veces.
- Se añadió 100  $\mu\text{L}$  de la solución estándar de Pb (1 g/L) en la celda de medición y se presionó “OK”.
- El polarograma de la primera adición estándar es registrado tres veces.
- Se añadió 100  $\mu\text{L}$  de la solución estándar de Pb (1 g/L) en la celda de medición y se presionó “OK”.
- El polarograma de la segunda adición estándar es registrado tres veces.
- El reporte final y los voltamogramas fueron impresos y analizados.

#### 4.1.3. Validación del método para muestras biológicas

Para el análisis de las muestras biológicas se hizo uso de métodos bibliográficos validados por el laboratorio. Con la finalidad de obtener mejores resultados se optó por validar algunos parámetros importantes como son: Linealidad, Precisión, Límite de detección y cuantificación.

##### **Linealidad**

Establecida como la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido. Es necesario determinar la linealidad debido a que el método de calibración que se usará es el de adición estándar.

Se procedió a colocar en la celda electroquímica 10 mL de buffer acetato 0.1 M pH 4.6, se programó el software para adicionar 6 veces 25  $\mu\text{L}$  de solución estándar de plomo a una concentración conocida por triplicado, de modo que se

cumpla con la recomendación de examinar al menos 5 niveles de concentraciones. Se elaboró un cuadro relacionando las concentraciones y sus respuestas. La relación entre ambas variables se expresó matemáticamente como una recta de regresión de tipo lineal:

$$y = a + bx$$

Si la recta no pasa cerca del origen de las coordenadas, significa que el método a evaluar está afectado por un error sistemático por defecto o por exceso en el intervalo estudiado. El estudio de la linealidad no solo implica una representación gráfica sino que es necesaria una comprobación estadística. Para realizar esta evaluación las fórmulas aplicadas fueron las siguientes:

$$y = a + bx$$

$$b = \frac{\sum X_i Y_i - \frac{\sum X_i \sum Y_i}{n}}{\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}}$$

$$a = \frac{\sum Y_i - b \sum X_i}{n}$$

Siendo a y b estimadores de la ordenada al origen y pendiente respectivamente, n el número de mediciones, X, la concentración y Y, el valor medido en el ensayo.

$$r = \frac{\sum X_i Y_i - \frac{\sum X_i \sum Y_i}{n}}{\sqrt{\left(\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}\right) \left(\sum Y_i^2 - \frac{(\sum Y_i)^2}{n}\right)}}$$

El coeficiente de la correlación ( $r$ ) nos indica el grado de relación entre la variable  $X$  y la variable  $Y$ . su valor máximo es 1. Si es cercano a la unidad significa que existe la correlación con una probabilidad elevada. En la práctica,  $r$  es generalmente mayor de 0,99 y los valores menores de 0,90 son raros. Sin embargo, el mejor indicador del modelo lineal no es  $r$  sino un test estadístico, en el cual se calcula un valor de  $t$  con  $n-2$  grados de libertad y se compara con el valor  $t$  tabulado para el nivel de confianza requerido. <sup>(50)</sup>

$$t_r = \frac{[r]\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{1-r^2}}$$

Si el valor observado de  $t$  es mayor que  $t_{\text{tabla}}$ , la correlación es lineal. <sup>(50)</sup>

### **Precisión**

La precisión expresa el grado de concordancia entre una serie de medidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones prescritas.

El objetivo del estudio es conocer la variabilidad o el mas-menos del método de ensayo. Esta variabilidad es debida a errores aleatorios inherentes a todo método de ensayo. Los factores a influir sobre los resultados de un ensayo no pueden ser siempre controlados (analista, equipo instrumental, reactivos, etc.) de aquí la importancia del estudio de la precisión.

- ✓ *Repetibilidad:* Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en la mismas condiciones operativas de análisis (por un mismo analista, mismos aparatos y reactivos, etc.) en un mismo laboratorio en un periodo de tiempo corto.
- ✓ *Precisión intermedia:* Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra pero en condiciones operativas diferentes (diferentes analistas, aparatos, días, etc.) en un mismo laboratorio.

- ✓ *Reproducibilidad*: Estudia la variabilidad del método bajo condiciones operativas diferentes y en distintos laboratorios.

*Para evaluar estos parámetros se realizaron:*

- 3 mediciones en el voltámetro en las mismas condiciones operativas en un día cumpliendo con los requisitos para determinar la repetibilidad.
- Para evaluar la precisión intermedia se efectuó 4 mediciones en las que se modificaron condiciones operativas como analista, reactivos y día de análisis.
- El parámetro de reproducibilidad no fue abarcado al no contar con otro laboratorio que tuviera un voltamperometro, por otro lado este parámetro no resulta obligatorio ya que solo es necesario en el caso de que se quiera transferir el método a otros laboratorios.

La precisión de un método se expresa generalmente como el coeficiente de variación (CV) de una serie de medidas y se calcula matemáticamente de la siguiente manera:

$$CV(\%) = S/X * 100$$

Dónde:

S: Desviación estándar.

X: Media aritmética.

Además se recomienda introducir los intervalos de confianza en el estudio de la precisión. Estos intervalos deben determinarse para cada nivel de concentración estudiada.

Los intervalos de confianza se calculan a partir de:

$$x \pm t * s$$

Dónde:

x: Media de una serie de resultados obtenidos en un mismo nivel de concentración.

t: Valor de la t de Student de tablas para n-1 grados de libertad y  $\alpha = 0.05$ .

s: Desviación estándar.

La precisión estudia la variabilidad que existe entre los diferentes resultados, pero sin tener en cuenta su proximidad al valor real. En la **Tabla N°5** se encuentran los valores aceptables de CV.

**Tabla N°5:** Valores aceptables de CV según la AOAC.

Concentración	Coefficiente de variación (CV)
<b>100%</b>	1 %
<b>10%</b>	1.5 %
<b>1%</b>	2 %
<b>0.1%</b>	3 %
<b>0.01%</b>	4 %
<b>10 µg/g (ppm)</b>	6 %
<b>1 µg/g</b>	8 %
<b>10µg/kg (ppb)</b>	15 %

*Fuente: AOAC Guidelines for Single Laboratory. (47)*

### **Límite de cuantificación y detección LC, LD**

Se entiende por límite de cuantificación a la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede cuantificar con una adecuada precisión y exactitud, y por límite de detección a la mínima cantidad de analito en la muestra que se puede detectar aunque no necesariamente cumple con precisión y exactitud.

Para su evaluación fue necesario:

- ✓ Determinar la pendiente de la curva de calibración ya examinada para el parámetro de la linealidad que fue la que se extrapola.
- ✓ La ecuación de la recta se extrapoló a concentración cero, obteniéndose como señal ruido correspondiente al término independiente, es decir  $Y_{bl}$ .
- ✓ Se construyó otra recta tomando como eje de ordenadas las desviaciones estándar de las respuestas y como eje de abscisas las concentraciones estudiadas, considerándose que la desviación estándar de las respuestas  $S_{bl}$  correspondiera al valor de la ordenada de origen de esta recta.
- ✓ Se calculó el límite de detección y límite de cuantificación aplicando las siguientes fórmulas:

Límite de detección (LD):

$$LD = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b} * \frac{1}{\sqrt{n}}$$

Límite de cuantificación (LC):

$$LC = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b} * \frac{1}{\sqrt{n}}$$

#### 4.1.4. Métodos para la determinación de los niveles de plomo en sangre y órganos

##### a) Intoxicación y tratamiento de los animales de experimentación

Antes de iniciar cualquier tipo de tratamiento, se determinó las concentraciones basales de plomo en sangre de todos los animales de experimentación.

La intoxicación aguda de los animales de experimentación se realizó mediante la administración de una solución acuosa de acetato de plomo a 100 ppm vía oral.

(38,61,78,97,102,113). Para el tratamiento se administró durante seis semanas, una solución acuosa de ajo liofilizado equivalente a 1000  $\mu$ g de alicina /kg de peso

vía oral. <sup>(8,40,41,76,79,85,102,104)</sup> . La intoxicación, el tratamiento y la designación de los grupos de estudio de las 24 ratas fueron de la siguiente manera:

GRUPOS DE ESTUDIO	DESIGNACIÓN	TRATAMIENTO	DÍAS DE INTOXICACION / TRATAMIENTO
Grupo 1	Control negativo	Agua destilada (1 mL).	Seis semanas.
Grupo 2	Control positivo	Solución acuosa de acetato de plomo (100 mg/kg).	Un día de intoxicación.
Grupo 3	Pre-post tratamiento	Soluciones acuosas de ajo liofilizado (1000 µg de alicina/kg/día) y acetato de plomo (100 mg/kg).	Una semana de tratamiento previo al día de la intoxicación y cinco semanas de tratamiento después del día de la intoxicación.
Grupo 4	Post tratamiento	Solución acuosa de ajo liofilizado (1000 µg de alicina/kg/día).	Cinco semanas de tratamiento.

***Fuente:*** *Elaboración propia.*

Paralelo a la determinación de alicina se inició con la selección y preparación de los animales, es así que, quince días antes de iniciar el estudio, todas las ratas a utilizar (24) fueron sometidas a un proceso de adaptación que consistió en estandarizar las condiciones ambientales y alimenticias.

Los animales fueron albergados en el Bioterio de la Universidad Católica de Santa María en jaulas de 60 cm x 40 cm x 30 cm en grupos de 3 animales por jaula y recibieron una alimentación a base de arroz y agua los cuales se dejaron en cantidades suficientes para que el animal pueda alimentarse a voluntad.

Los 24 animales fueron subdivididos al azar en 4 grupos y se determinó las concentraciones basales de plomo en sangre, posteriormente fueron tratados como se describe en el cuadro anterior.

A los animales que conformaron el grupo uno (Control Negativo) se les administraron 1 mL de agua destilada durante todo el periodo de investigación; los que conformaron el grupo dos (Control Positivo) se les administraron solución acuosa de acetato de plomo (100 ppm) por única vez; los animales que conformaron el grupo tres (Pre-post tratamiento) inicialmente se les administraron solución acuosa de ajo liofilizado (1000 µg/kg/día) en volúmenes equivalentes al peso de cada rata durante una semana, posteriormente se les administró 100 ppm de solución acuosa de acetato de plomo (por única vez) para luego continuar con el tratamiento de ajo hasta culminar el tratamiento (cinco semanas); finalmente a los animales que conformaron el grupo cuatro (Post tratamiento) se les administró 100 ppm de solución acuosa de acetato de plomo (por única vez) y posteriormente la solución acuosa de ajo liofilizado (1000 µg/kg/día) hasta culminar el tratamiento (cinco semanas).

Los volúmenes de administración tanto para la intoxicación así como para el tratamiento se calculó de acuerdo al peso de cada rata; teniendo en cuenta que el volumen máximo de ingesta consideradas para las ratas es de 2 mL. (**Anexo 2**)

Para la preparación y administración de la solución acuosa de acetato de plomo, se realizaron los siguientes cálculos:

Datos

- Dosis de acetato de plomo: 100 ppm
- Peso promedio del animal: 270 gramos

$$\begin{array}{r}
 100 \text{ mg} \text{ --- } 1000 \text{ g} \\
 X \quad \text{--- } 270 \text{ g} \\
 X = 27 \text{ mg}
 \end{array}$$

- Preparación de la solución de acetato de plomo = 100 mg en 5 mL de agua destilada.

$$\begin{array}{l} 100 \text{ mg} \text{ --- } 5 \text{ ml} \\ 27 \text{ mg} \text{ --- } X \\ X = 1.35 \text{ ml} \end{array}$$

Entonces 1.35 mL se la solución acuosa de acetato de plomo será el volumen a administrar a una rata cuyo peso promedio es de 270 gramos.

Para la administración del tratamiento con solución acuosa de ajo liofilizado se procedió de la siguiente manera.

Datos:

- Dosis de ajo (alicina): 1000  $\mu\text{g}$  alicina/alicina/kg de peso.
- Peso promedio del animal: 270 gramos

$$\begin{array}{l} 1000 \mu\text{g} \text{ --- } 1000 \text{ g} \\ X \text{ --- } 270 \text{ g} \\ X = 270 \mu\text{g} \end{array}$$

Preparación de la solución acuosa de ajo liofilizado

$$\begin{array}{l} 1000 \mu\text{g} \text{ --- } 5 \text{ mL} \\ 270 \mu\text{g} \text{ --- } x \\ 1,3 \text{ mL} = X \end{array}$$

#### b) Preparación de reactivos

##### Preparación de buffer acetato 0.1 M pH 4.6

Para la determinación voltamperométrica del plomo fue requerido como electrolito de soporte el buffer acetato (ácido acético / acetato de sodio).

Los cálculos en los que fue necesario el uso de la ecuación de Henderson-Hasselbalch son mostrados a continuación:

Cálculos:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{Sal}]}{[\text{Ácido}]}$$

$$4.6 = 4.76 + \log \frac{[\text{Sal}]}{[\text{Ácido}]}$$

$$\frac{[\text{Sal}]}{[\text{Ácido}]} = 0.69$$

$$0.69x + 1x = 0.1M$$

$$x = 0.059M$$

Acido acético:

$$\frac{0.059 \text{ mol}}{L} * \frac{60.05 \text{ g}}{1 \text{ mol}} * \frac{100 \text{ g}}{100 \text{ g}} * \frac{1 \text{ mL}}{1.05 \text{ g}} * 1 L = 3.37 \text{ mL}$$

Acetato de sodio:

$$\frac{0.049 \text{ mol}}{L} * \frac{82.05 \text{ g}}{1 \text{ mol}} * 1 L = 4.02 \text{ g}$$

Hidróxido de sodio:

$$\begin{array}{l} 82.05 \text{ g acetato} \text{ --- } 40 \text{ g NaOH} \\ 4.02 \text{ g acetato} \text{ --- } \mathbf{1.96 \text{ g NaOH}} \end{array}$$

Acido acético:

$$\begin{array}{l} 82.05 \text{ g acetato} \text{ --- } 60.05 \text{ g NaOH} \\ 4.02 \text{ g acetato} \text{ --- } \mathbf{2.94 \text{ mL NaOH}} \end{array}$$

Para preparar 1 L de buffer acetato, se pesó 1.96 g de NaOH, se agregó 2.94 mL de ácido acético y se determina el pH con una estación potenciométrica TITRANDO 808 (Metrohm).

### **Preparación del estándar de plomo 1 mg/L**

Se utilizó la ecuación de dilución:

$$C1 * V1 = C2 * V2$$

$$(1000 \text{ ppm})(V1) = (1 \text{ ppm})(10 \text{ mL})$$

$$V1 = 0.01 \text{ mL} = 10 \mu\text{L}$$

Se pipeteo y transfirió 10  $\mu\text{L}$  de una solución estándar de 1000 ppm de plomo a una fiola de 10 mL y se enrazó con agua ultrapura.

### **c) Muestras sanguíneas**

#### **Extracción de la muestra**

La extracción de la muestra sanguínea (0.5 mL) se realizó cada cinco días del plexo venoso retro orbital (**Anexo 1**) haciendo uso de capilares con anticoagulante, las muestras fueron recolectadas y rotuladas en envases de polietileno con cierre seguro hermético (Eppendorf) que contenían anticoagulante EDTA.

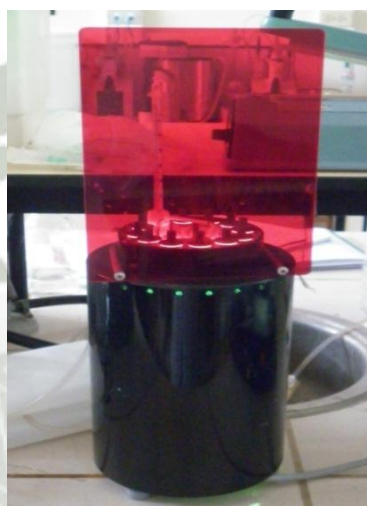
#### **Preparación de la muestra**

Culminada la extracción sanguínea se transportó las muestras al laboratorio para su respectivo análisis. Para ello se tomó 100  $\mu\text{L}$  de sangre de cada muestra y se depositó en tubos de cuarzo, posteriormente se les agregó 20  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogeno, 100  $\mu\text{L}$  de ácido nítrico y 5 mL de agua ultrapura para continuar con la digestión como se describe a continuación.

### **Digestión de la muestra**

Se colocó la batería de tubos en el sistema de digestión UV, el temporizador se programó para 1 hora de digestión, tiempo en el cual, se controló la temperatura para no sobrepasar los 90 °C.

Concluida la digestión de las muestras el contenido de cada tubo se traspasó a fioles de 10 mL y enrazó con agua ultrapura para su posterior medición en el voltamperómetro.



**Figura N°1:** *Digestión UV.*

### **Determinación voltamperométrica de plomo en sangre**

Antes de iniciar la lectura de las muestras, se ingresó los parámetros voltamperométricos del método: tiempo de purga 300 s; potencial de deposición: -0.9 V; tiempo de deposición: 60 s; velocidad de barrido: 20mV/s; amplitud de pulso: 0.05 V; tiempo de pulso 0.04 s; potencial inicial: -0.74 V; potencial final: -0.32 V. Todas las medidas voltamperométricas fueron realizadas por voltametría de redisolución anódica y se usó como solución estándar 1 ppm de plomo.

Una vez ingresado los parámetros, se transfirió a la celda electroquímica 2 mL de muestra problema y 10 mL de buffer acetato para la lectura.

### Muestras de sangre:

Extracción de muestras de sangre.



Digestión:

- 100  $\mu$ L de muestra en tubo de cuarzo.
- 100  $\mu$ L de  $\text{HNO}_3$ , 20  $\mu$ L y 5 mL de agua ultrapura.



Pasar el contenido a una fiola de 10 mL y enrazar.



Lectura en la estación voltamperométrica.

### d) Muestras de órganos

#### Extracción de la muestra

Culminado el periodo de tratamiento se sacrificó a todos los animales de experimentación por contusión cervical para posteriormente extraerles el bazo, hígado y riñón. <sup>(3,22,28,71,80,119)</sup>

#### Preparación de la muestra

En un mortero se trituro cada órgano, se pesó y colocó 100 mg de muestra homogénea en el vaso de digestión a presión, se agregó 1.5 mL de ácido nítrico y se procedió con la pre digestión.

#### Digestión de la muestra

La digestión de los órganos se realizó en dos etapas (*pre-digestión* y *digestión a presión*).

*Pre digestión;* la muestra y el ácido nítrico contenidas en el vaso de digestión fueron dejados en reposo por un periodo de tres horas. Pasada las tres horas se procedió con la digestión propiamente dicha.

*Digestión a presión;* se colocó cada vaso de digestión herméticamente cerrados en un horno microondas a presión media por 2 minutos, lo que corresponde a un ciclo. Las muestras fueron digeridas en dos ciclos, posteriormente, el contenido fue transferido a una fiola de 10 mL y enrazado con agua ultrapura para su posterior análisis voltamperométrico.



**Figura N°2:** *Digestión a presión.*

### **Determinación voltamperométrica de plomo en órganos**

La determinación voltamperométrica fue similar al de la sangre con la diferencia del volumen de muestra para la lectura, que para el caso de los órganos fue de 1 mL y el potencial final fue de 0.27 V.

### Muestras de órganos:

Obtención de muestras de órganos.



Digestión a presión:

- 0.100 g de muestra en vasos de digestión a presión.
- 1.5 mL de HNO<sub>3</sub> y 5 mL de agua ultrapura.



- Pasar el contenido a una fiola de 10 mL.



Lectura en la estación voltamperométrica.

## 4.2. Métodos estadísticos

### 4.2.1. Parámetros de distribución central

#### Promedio:

Valor que representa un conjunto de datos. Señala el centro de los valores, que es la suma de todas las medidas divididas por el número de medidas.

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{n}$$

Dónde:

Σx: Sumatoria del conjunto de datos.

n: Número de datos.

#### 4.2.2. Parámetros de dispersión

##### **Desviación Estándar (S):**

Se considera como la raíz cuadrada de la varianza.

$$S = \sqrt{\frac{\sum(x - X)^2}{n - 1}}$$

Dónde:

x: Sumatoria del conjunto de datos.

X: Sumatoria del conjunto de datos.

n: Número de datos.

##### **Coefficiente de variación (CV):**

Es una medida de variabilidad extensamente utilizada, también conocido como la desviación estándar relativa (DER):

$$CV = DER = 100 * \frac{S}{X}$$

Dónde:

S: Desviación estándar.

X: Promedio.

El CV cuyas unidas se expresan en tanto por ciento, es un ejemplo de error relativo, es decir una estimación del error dividida por una estimación de valor absoluto de la cantidad medida. Los errores relativos se utilizan con frecuencia al comparar las precisiones de los resultados que tienen diferentes unidades o magnitudes.

#### 4.2.3. Pruebas de significancia

El análisis de varianza (ANOVA) es una técnica estadística muy potente que se utiliza para separar y estimar las diferentes causas de variación. Un ANOVA de un factor contrasta la existencia de diferencias significativas entre medias cuando están presentes más de dos muestras.

Las fórmulas son:

**Tabla N°6:** Fórmulas para ANOVA.<sup>(50)</sup>

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Estadístico F
Entre grupos	K-1	SCE	$\frac{SCE}{K-1} = CME$	$\frac{CME}{CMD} = F$
Dentro de grupos	N-K	SCD	$\frac{SCD}{N-K} = CMD$	
Total	N-1	SCT		

Dónde:

N: n° de datos.

K: n° de grupos experimentales.

Para probar la significación en la relación F se recurre a tablas. Se analiza si el valor calculado para F es menor o mayor que el que se indica en tablas de acuerdo a los grados de libertad. En el primer caso, se concluirá que todos los grupos son iguales, en caso contrario se concluirá que no todos los grupos son iguales, entre algunos o todos existe una diferencia estadística significativa.

#### **Prueba de Especificidad: HSD de Turkey (Honest Significant Difference)**

Esta prueba de especificidad, también llamada diferencia honestamente significativa de Turkey, se aplica una vez obtenidos los resultados del análisis

ANOVA, es decir, si al análisis de varianza los resultados obtenidos fueran significativos a los diferentes tratamientos, se procederá a averiguar estadísticamente cuál de ellos fue más eficiente o más específico, de no hallarse significancia en la prueba de ANOVA no será necesario realizar ninguna prueba de especificidad. Esta prueba se calcula con un  $p = 0.05$  y se aplica a cualquier número de tratamientos, se usa la siguiente fórmula:

$$HSD = q_{(K,M)} \sqrt{\frac{MC_{en}}{n}}$$

Dónde:

$q$ : Valor tabulado en tablas para  $p = 0.05$ .

$n$ : Tamaño de la muestra de cada grupo.

$K$ : Es el número de grupos.

$M$ : Son los grados de libertad.

$MC_{(en)}$ : Media de cuadrados.

## CAPITULO III

### RESULTADOS Y DISCUSION

El presente trabajo de investigación busca evaluar el efecto del ajo *Allium sativum L.* sobre los niveles de plomo en sangre y órganos en animales de experimentación con toxicidad aguda experimental, para ello se inició con la búsqueda, análisis y selección bibliográfica donde se halló reportes de investigación que utilizaron el ajo en dosis equivalentes a 1000 µg de alicina/kg/VO como tratamiento de animales de experimentación inducidas con: hiperglicemia <sup>(72)</sup>, hiperlipidemia <sup>(1, 4, 7, 18, 42)</sup> y hepatopatías <sup>(41, 104)</sup>; por los resultados satisfactorios reportados en tales investigaciones, dicha dosis también fue considerada para el desarrollo del presente trabajo.

Para conocer la concentración de alicina de nuestra muestra de ajo liofilizado, ésta se determinó espectrofotométricamente como se describe en el capítulo anterior.

Los resultados de concentración de alicina se muestran a continuación:

#### 1. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE ALICINA

El contenido de alicina por gramo de ajo se determinó usando el método de Schwimmer tal como se describe en el capítulo anterior.

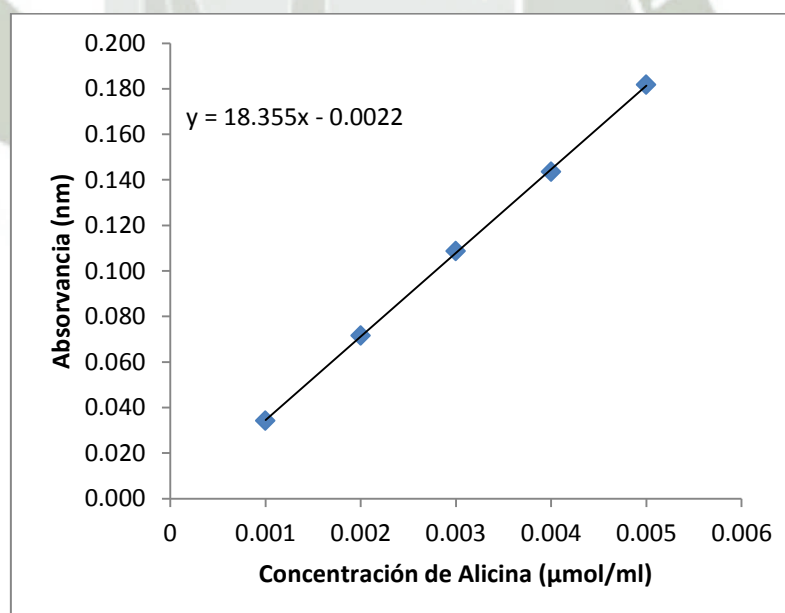
Durante la preparación de la curva de calibración se obtuvieron los siguientes resultados.

**Cuadro N°1:** *Concentraciones y absorbancias promedio de la curva de calibración.*

Muestra	CC1 piruvato	CC2 alicina	Abs1	Abs2	Abs3	X Abs
1	0.002	0.001	0.036	0.035	0.032	0.034
2	0.004	0.002	0.076	0.068	0.070	0.072
3	0.006	0.003	0.114	0.106	0.106	0.109
4	0.008	0.004	0.146	0.145	0.140	0.143
5	0.010	0.005	0.184	0.189	0.173	0.182

*Fuente: Elaboración propia*

Con los datos del **Cuadro N°1** se obtiene la siguiente curva de calibración



**Gráfica N°1:** *Curva de calibración para la valoración de alicina.*

*Fuente: Elaboración propia*

Del gráfico anterior se obtiene los valores de a, b y r:

a	b	r
0.0022	18.355	0.999

El valor del coeficiente de correlación “r” nos indica que nuestra ecuación es una recta, indicando que la concentración de alicina está en relación directa con la absorbancia.

*Ecuación de la recta:*

$$y = a + bx$$

*Reemplazando los valores a y b tenemos:*

$$y = 18.355x + 0.0022$$

Dónde:

y: Absorbancia de la muestra problema.

x: Concentración de alicina.

Una vez elaborada la curva de calibración se procedió a la preparación y lectura de la muestra de ajo para determinar la concentración de alicina. El cuadro inferior muestra los datos promedio de tres lecturas realizadas.

Muestra	Peso (g)	CC. Alicina (x)	Absorbancia (y)
Problema	0.05	$x_p$	0.4289
Control	0.05	$x_c$	0.0523

Si:

$$y = 18.355x + 0.0022$$

Reemplazando:

*Concentración de la muestra problema*

$$X_p = \frac{0.4289 - 0.0022}{18.355}$$

$$X_p = 0.0232$$

*Concentración de la muestra control*

$$X_c = \frac{0.0523 - 0.0022}{18.355}$$

$$X_c = 0.00273$$

Concentración neta de alicina:

$$X = x_p - x_c$$

$$X = 0.021 \mu\text{mol/mL}$$

**Cantidad de alicina por gramo de ajo:**

Por la ecuación de dilución:

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

Reemplazando:

$$(0.021 \mu\text{mol})(1\text{mL}) = C_2(0.5\text{mL})$$

$$C_2 = 0.042 \mu\text{mol}$$

Por lo tanto:

$$0.042 \mu\text{mol} \text{ --- } 0.5 \text{ mL}$$

$$\mathbf{0.84 \mu\text{mol}} \text{ --- } \mathbf{10 \text{ mL}}$$

Se pesó: **0.05 g** de ajo liofilizado:

$$0.84 \mu\text{mol} \text{ --- } 0.05 \text{ g}$$

$$\mathbf{16.8 \mu\text{mol}} \text{ --- } \mathbf{1.0 \text{ g}}$$

Por el peso molecular de alicina:

$$(16.8 \mu\text{mol}) \left( 162.276 \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{mol}} \right) = 2726.24 \mu\text{g}$$

Transformando a miligramos:

$$(2726.24 \mu\text{g}) \left( \frac{1 \text{ mg}}{1000 \mu\text{g}} \right) = 2.73 \text{ mg}$$

***Concentración de alicina en la muestra de ajo liofilizado***

Muestra	mg de alicina / g de ajo
<b>Ajo liofilizado</b>	2.73

Teniendo en cuenta que los valores normales establecidos para la concentración de alicina en un gramo de ajo es de 7 – 9 mg. <sup>(10,101,117)</sup>

Entonces la concentración de 2.73 mg de alicina hallada es muy baja, esto se puede deber a que la muestra ha sido almacenada por un periodo de tiempo relativamente largo (2 años), tiempo en el cual a pesar de que la muestra fue almacenada protegida de la luz, humedad y temperatura elevada, la alicina fue degradándose.

Sin embargo para el propósito del presente trabajo estos valores son aceptables ya que la dosis de alicina requerida para el tratamiento es de 1 mg de alicina/ g de ajo liofilizado.

Entonces 1 mg está contenida en 0.3663 g de ajo.

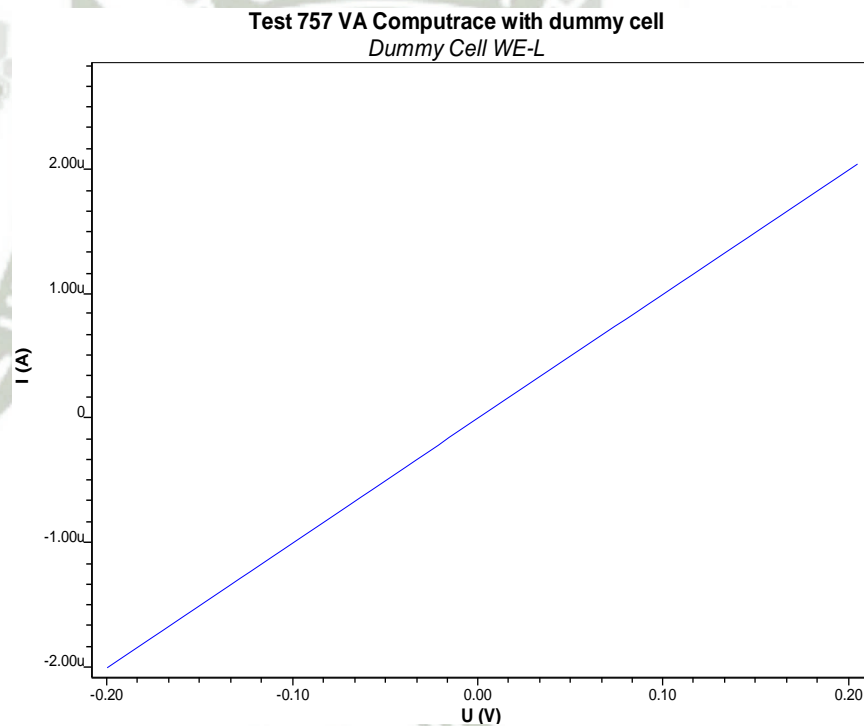
Conocido el valor de la concentración de alicina por gramo de ajo liofilizado, se preparó la solución acuosa para lo cual se pesó 0.3663 g de ajo y se disolvió en 5 mL de agua destilada. La preparación de la solución para el tratamiento se hizo todos los días al igual que la administración hasta culminar el tratamiento.

Antes de determinar la concentración de plomo en sangre, se procedió a validar el equipo y el método voltamperométrico como se describe a continuación.

## 2. VALIDACION DEL EQUIPO

Para validar el instrumento VA Computrace de Metrohm, se utilizó una celda estándar incorporada en el equipo. La validación se efectuó en dos partes, una validación electrónica y una validación química, como se describe en el capítulo anterior.

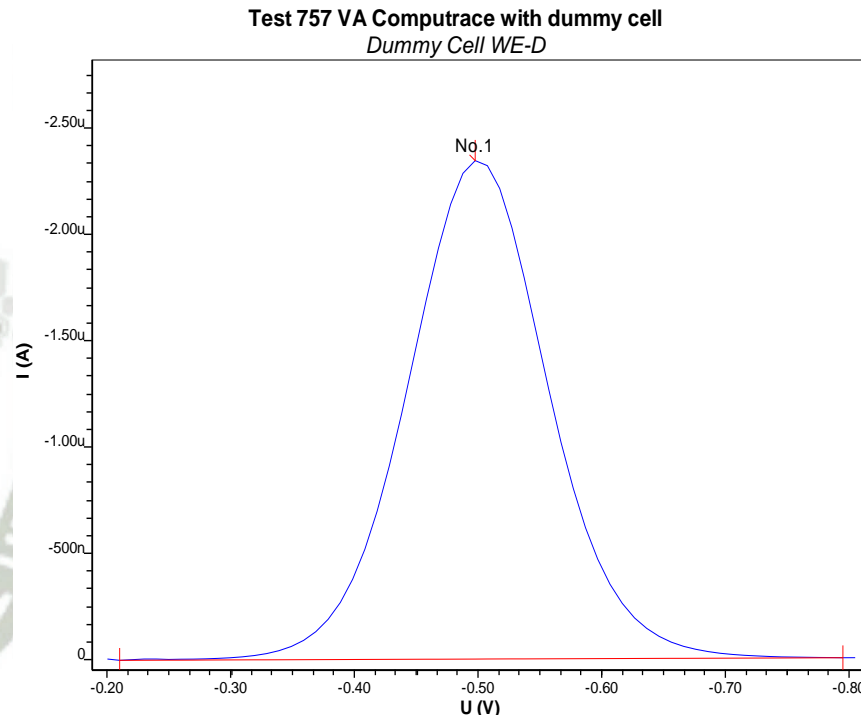
En la validación electrónica se reportó 2 resultados, uno del test de linealidad y otro del test de desempeño del pico, los 2 resultados se dan entre la Intensidad (A) versus el Voltaje (V). Una figura representativa es mostrada a continuación.



**Figura N°3:** Validación electrónica lineal.

En la **Figura N°3**, se observa una línea recta, la cual es obtenida de la corriente mínima (- 2  $\mu$ A) y la corriente máxima (2  $\mu$ A) frente a la rampa de voltaje mínimo (- 200 mV) y la rampa de voltaje máximo (+200mV), la tolerancia para

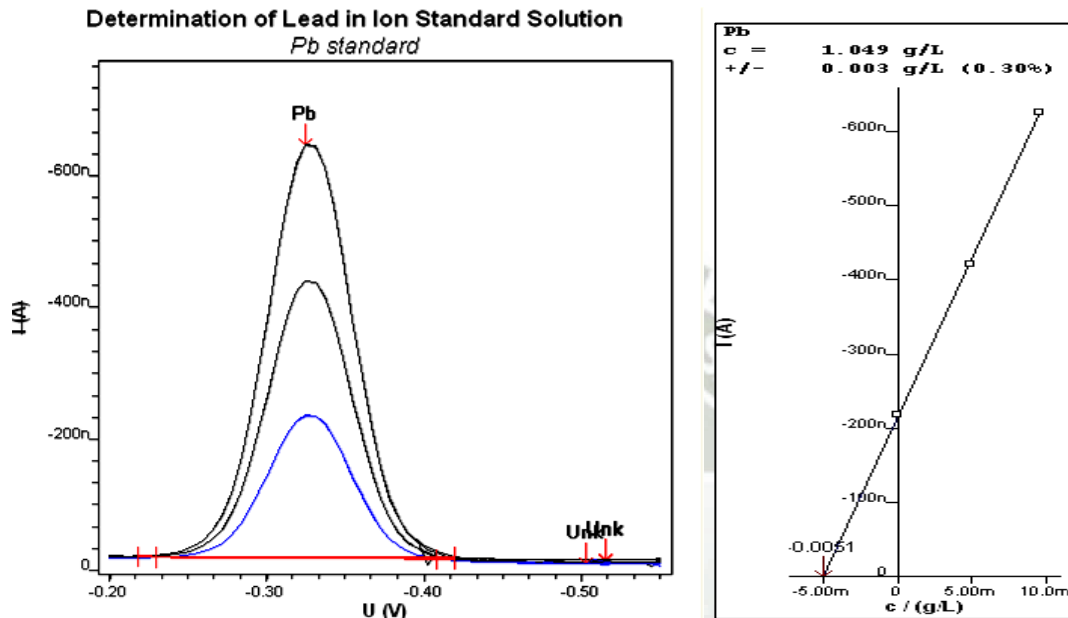
la corriente mínima es de (- 1.6  $\mu\text{A}$ ... - 2.4  $\mu\text{A}$ ) y para la corriente máxima es de (1.6  $\mu\text{A}$ ... 2.4  $\mu\text{A}$ ), según parámetros descritos por Metrohm, con estas características obtenidas se confirma la linealidad para la validación electrónica, es decir que el desempeño de la rampa de voltaje fue óptima para la utilización del equipo.



**Figura N°4:** *Validación electrónica del pico.*

En la **Figura N°4**, se muestra un pico simétrico, el cual fue obtenido del voltaje máximo (- 497 mV) y la corriente máxima (- 2.35  $\mu\text{A}$ ), la tolerancia para el voltaje es de (- 450 mV...- 550 mV) y para la corriente es de (- 2  $\mu\text{A}$ ... - 4  $\mu\text{A}$ ), según parámetros descritos por Metrohm, al producirse un cambio de intensidad por el equipo se evidencia la simetría del pico y la fiabilidad del equipo para la determinación de plomo.

Culminada la validación electrónica se procedió con la validación química, la cual se efectuó para ver la precisión y exactitud con la que cuenta el instrumento para reportar los resultados de las muestras. Una gráfica representativa es mostrada a continuación.



**Figura N°5:** Validación química.

En la **Figura N°5**, observamos la validación química que se efectuó usando una solución estándar de plomo (1 g/L) después de 2 adiciones de estándar de 100  $\mu$ L en modo DME, se muestra un aumento en el pico de dicho metal y la concentración final es de 1.049 g/L de plomo, la tolerancia para la concentración final es de (0.95...1.05g/L), dicha concentración final depende enormemente del cuidado tomado en la preparación de la solución de análisis y en la distribución de las soluciones de adición estándar, al estar la concentración de plomo dentro del rango establecido, se concluye con la validación química dado el cumplimiento de los parámetros descritos por Metrohm.

### 3. VALIDACION DEL METODO

#### Linealidad

Para determinar la linealidad se estudiaron 6 niveles de concentración (0.025, 0.050, 0.075, 0.1, 0.125, 0.150 mg/L) y se analizaron por triplicado, obteniéndose los siguientes resultados representados en el **Cuadro N°2**.

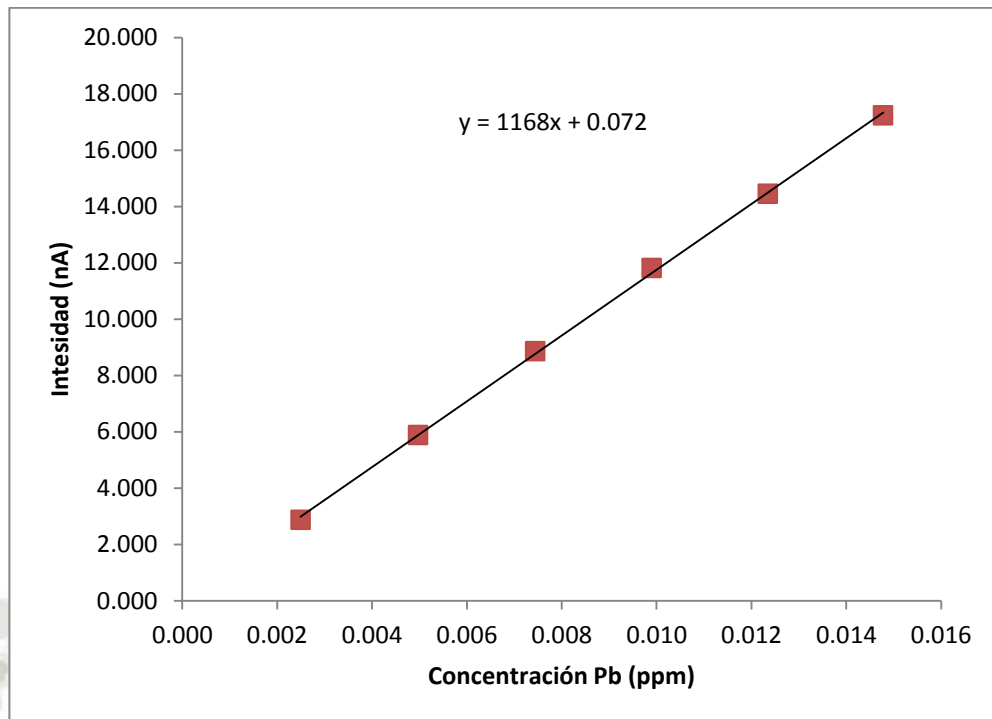
**Cuadro N°2:** Datos para la linealidad del método.

Pb en celda (ppm)	Intensidad I (nA)	Intensidad II (nA)	Intensidad III (nA)	X Intensidad (nA)	Desviación estándar
0.002	2.985	2.854	2.790	2.876	0.099
0.005	6.048	5.878	5.710	5.879	0.169
0.007	8.671	8.799	9.093	8.854	0.216
0.010	11.991	11.499	11.958	11.816	0.275
0.012	14.650	14.183	14.503	14.445	0.239
0.015	17.497	16.989	17.205	17.230	0.255

*Fuente:* Elaboración propia.

Con estos datos se construyó la curva para la linealidad representada en la **Gráfico N°2**.

Independientemente a la apariencia de la recta, fue necesario evaluar el coeficiente de regresión lineal ( $r$ ) que fue igual a 0.9996, valor cercano a la unidad, por lo que se afirma que existe una buena correlación entre las variaciones de la concentración del analito y su respuesta.



**Gráfico N°2:** Linealidad del método voltamperométrico.

*Fuente:* Elaboración propia.

### Precisión

Estudia la variabilidad que existe entre los diferentes resultados, pero sin tener en cuenta su proximidad al valor real. Para determinar la precisión, en un primer ensayo de repetibilidad se realizó el análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas, en un mismo laboratorio, el mismo día, los datos son mostrados en el **Cuadro N°3**.

Según la **Tabla N°5** del capítulo anterior para un nivel de concentración próximo a 1 ppm el valor de coeficiente de variación máximo aceptable es 8 %, por lo tanto los resultados mostrados al ser menores de 8 % cumplen con las especificaciones.

**Cuadro N°3:** Datos para la repetibilidad del método.

Intensidad I (nA)	Intensidad II (nA)	Intensidad III (nA)	Intensidad Promedio (nA)	DS	CV %	Int. Confianza	
2.985	2.85	2.79	2.88	0.10	3.46	2.62	3.13
6.048	5.88	5.71	5.88	0.17	2.87	5.44	6.31
8.671	8.80	9.09	8.85	0.22	2.44	8.30	9.41
11.991	11.50	11.96	11.82	0.28	2.33	11.11	12.52
14.65	14.18	14.50	14.45	0.24	1.65	13.83	15.06
17.4965	16.99	17.21	17.23	0.25	1.48	16.58	17.89

*Fuente:* Elaboración propia.

La repetibilidad del método depende generalmente del proceso de preparación de la muestra, es decir, cuanto mayor sea la manipulación de la muestra más probable es que la variabilidad de método aumente.

Para la precisión intermedia se evaluaron factores como día de ensayo (I), equipo (II) y analista (III) representados a continuación.

**Cuadro N°4:** Datos para la precisión intermedia.

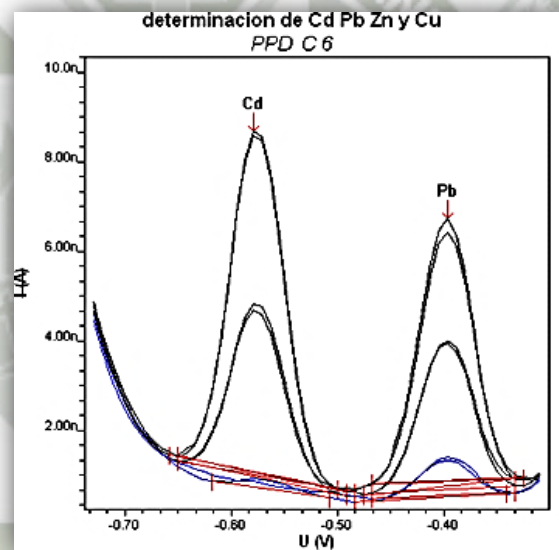
Intensidad I (nA)	Intensidad II (nA)	Intensidad III (nA)	Promedio Intensidad (nA)	DS	CV	Int. Confianza	
3.30	3.62	3.82	3.58	0.26	7.37	2.90	4.26
6.24	6.45	6.59	6.42	0.17	2.70	5.98	6.87
8.76	9.26	9.64	9.22	0.44	4.78	8.09	10.36
11.85	11.73	12.71	12.10	0.53	4.39	10.73	13.46
14.25	14.22	15.05	14.51	0.47	3.22	13.30	15.71
16.96	16.99	17.43	17.13	0.26	1.53	16.45	17.80

*Fuente:* Elaboración propia.

Para la precisión intermedia generalmente se acepta valores inferiores al doble del coeficiente de variación de la repetibilidad del método, de tal modo que los datos mostrados en el **Cuadro N°4**, cumplen con las especificaciones dadas. Los límites de confianza representan el intervalo en torno al valor estimado que contiene el valor real con una probabilidad del 95 %.

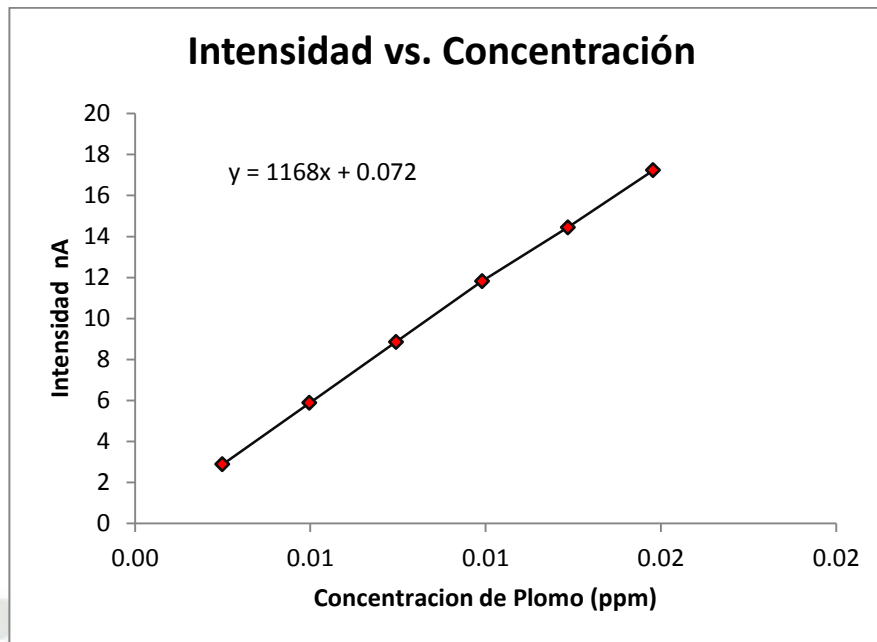
### Límite de cuantificación y detección LC, LD

Los LC y LD fueron calculados con los datos obtenidos de los análisis realizados por triplicado en el **Cuadro N°2**. Una figura representativa es mostrada a continuación:



**Figura N°6:** Para la determinación del LC y LD.

Se determinó la pendiente de la curva de calibración para los datos, de donde se pudo extrapolar a concentración cero la ecuación de la recta (**Grafica N°3**), obteniéndose como señal ruido la correspondiente al termino independiente, es decir  $Y_{bl}$ .



**Gráfico N°3:** *Concentración versus Intensidad (nA.).*

*Fuente:* Elaboración propia.

Se construyó otra recta tomando como eje de ordenadas las desviaciones estándar de las respuestas y como eje de abscisas las concentraciones estudiadas, considerándose que la desviación estándar de las respuestas  $S_{bl}$  corresponderá al valor de la ordenada de origen de esta recta.

Con los datos necesarios se calculó el límite de detección y límite de cuantificación aplicando las siguientes fórmulas:

*Límite de detección (LD):*

$$LD = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b} * \frac{1}{\sqrt{n}}$$

**Valor LD: 0.000134 ppm ó 0.13 ppb**

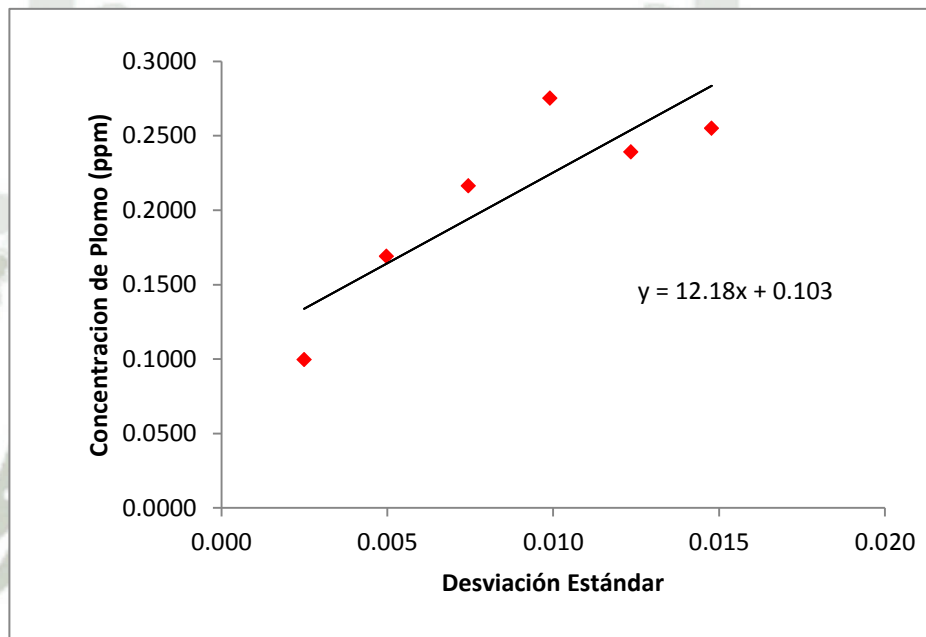
*Límite de cuantificación (LC):*

$$LC = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b} * \frac{1}{\sqrt{n}}$$

**Valor de LC: 0.001433 ppm ó 1.43 ppb**

Dónde:

De modo que se puede determinar que el método es capaz de detectar 1.4 ppb de plomo en sangre y órganos con una buena precisión y exactitud.



**Gráfico N°4:** *Desviación estándar versus Intensidad (nA).*

*Fuente: Elaboración propia.*

#### 4. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PLOMO EN SANGRE Y ÓRGANOS DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se muestran los resultados en cuadros y gráficos del efecto de la solución acuosa de ajo liofilizado en *Rattus norvegicus* variedad Wistar con toxicada aguda experimental y que fueron tratados por cinco (grupo 4) y seis semanas (grupo 3).

Grupos de estudio	Designación
Grupo 1	Control Positivo
Grupo 2	Control Negativo
Grupo 3	Pre-post tratamiento
Grupo 4	Post tratamiento

### Efecto de la solución acuosa de ajo liofilizado sobre las concentraciones de plomo en sangre.

Con la finalidad de monitorizar las concentraciones de plomo en muestras sanguíneas de los cuatro grupos en estudio durante todo el periodo de investigación, se procedió tal y como se describe en el capítulo; así mismo se llevó un control semanal de los pesos de todos los animales de experimentación (**Anexo 3**) los cuales no variaron significativamente.

A continuación se muestran los resultados hallados antes, durante y después de la intoxicación de los cuatro grupos de estudio, (**Anexo 7**).

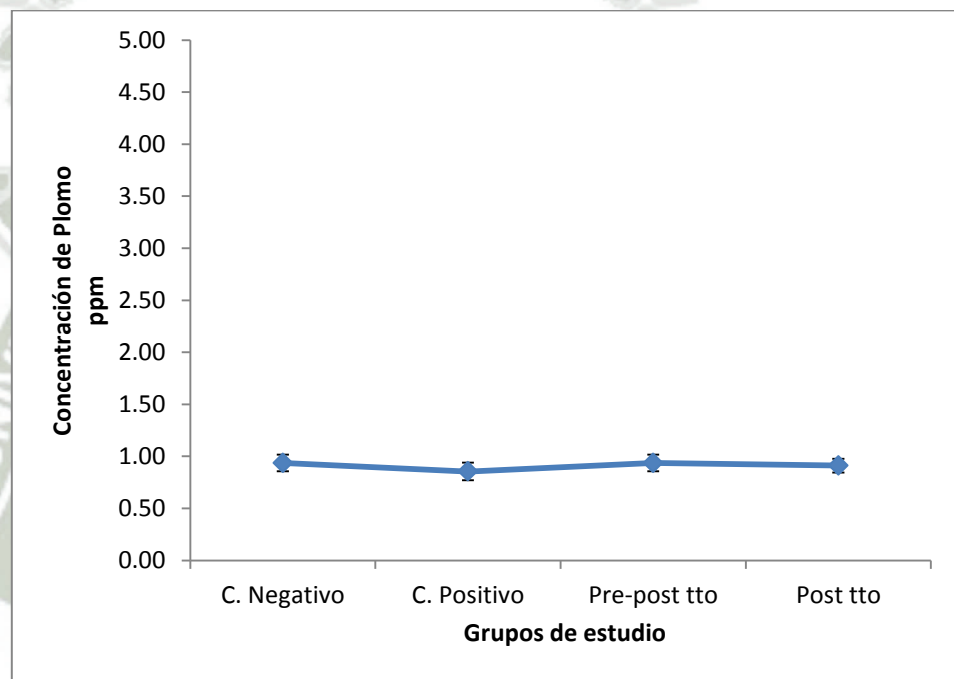
- ✓ *Antes de la intoxicación*; con la finalidad de determinar las concentraciones basales de plomo sanguíneo. Los resultados se muestran en la **Cuadro N°5** y **Grafica N°5**.

**Cuadro N°5:** Concentraciones basales de plomo en sangre (mg/L).

Días	C. Negativo	C. Positivo	Pre-post tratamiento	Post tratamiento
1	0.936 ± 0.080	0.855 ± 0.085	0.936 ± 0.080	0.911 ± 0.065

**Fuente:** *Elaboración propia.*

En el **Cuadro N°5** y **Gráfica N°5** se observa que todos los animales de experimentación presentan concentraciones basales de plomo en sangre alrededor de 1 ppm. Al iniciar el trabajo de investigación, como sería natural, no se esperaba encontrar niveles de plomo en sangre. Esto puede deberse a que la alimentación (maíz humedecido en agua) y bebida de las ratas del Bioterio de la UCSM, son a base de agua subterránea en donde es normal encontrar metales pesados como el plomo.<sup>(50)</sup>



**Gráfico N°5:** *Concentraciones basales de plomo en sangre (ppm).*

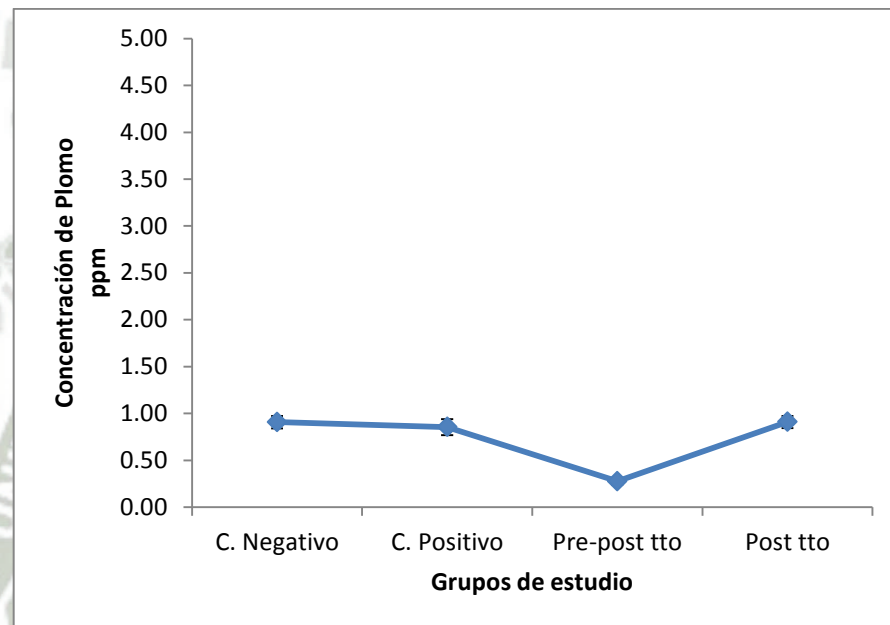
**Fuente:** *Elaboración propia.*

Una vez determinado las concentraciones basales de plomo sanguíneo, al grupo 3 (Pre-post tratamiento) se le administró ajo liofilizado (1000  $\mu\text{g}$  de alicina/kg/día) en solución acuosa como tratamiento durante siete días obteniéndose los siguientes resultados que se muestran en el **Cuadro N°6** y **Gráfico N°6**.

**Cuadro N°6:** Concentraciones de plomo sanguíneo (mg/L) tras siete días de tratamiento del grupo 3.

Días	C. Negativo	C. Positivo	Pre-post tratamiento	Post tratamiento
8	0.908 ± 0.066	0.855 ± 0.085	0.277 ± 0.039	0.911 ± 0.065

**Fuente:** Elaboración propia.



**Gráfico N°6:** Concentraciones de plomo sanguíneo (ppm) tras siete días de tratamiento del grupo 3.

**Fuente:** Elaboración propia.

En el **Cuadro N°6** y **Gráfico N°6** se observa que después de siete días de tratamiento con ajo del grupo 3 (Pre-post tratamiento), la concentración de plomo disminuye en un 70.41% en valores que fueron desde 0.936 mg/L a 0.277 mg/L.

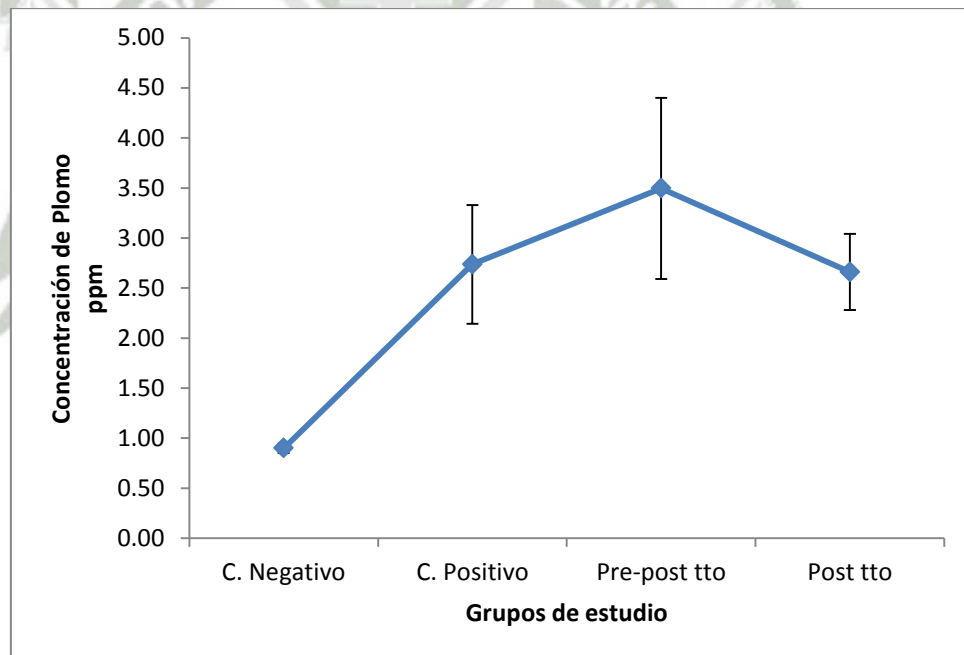
- ✓ Durante (24 horas después de la intoxicación); con la finalidad de determinar las nuevas concentraciones de plomo sanguíneo. Se obtuvieron los siguientes resultados.

**Cuadro N°7:** Concentraciones de plomo sanguíneo (mg/L) 24 horas después de la intoxicación con acetato de plomo.

Días	C. Negativo	C. Positivo	Pre-post tratamiento	Post tratamiento
10	0.901 ± 0.048	2.737 ± 0.594	3.496 ± 0.904	2.661 ± 0.381

**Fuente:** Elaboración propia.

En el **Cuadro N°7** y **Gráfico N°7** se observa un incremento de las concentraciones de plomo en sangre de los grupos 2,3 y 4, los cuales fueron sometidos a un cuadro de intoxicación aguda con 100 ppm de acetato de plomo vía oral, lo que nos indica que los animales efectivamente fueron intoxicados.



**Gráfico N°7:** Concentraciones de plomo sanguíneo (ppm) 24 horas después de la intoxicación con acetato de plomo.

**Fuente:** Elaboración propia.

- ✓ (Después de la intoxicación) cada cinco días durante el tratamiento continuo; cuya finalidad fue determinar si las concentraciones de plomo sanguíneo disminuían o se mantenían constantes, los datos se muestran en el Cuadro N°8 y Gráficos N°8, 9, 10 y 11.

**Cuadro N°8:** Concentraciones promedio de plomo sanguíneo (mg/L).

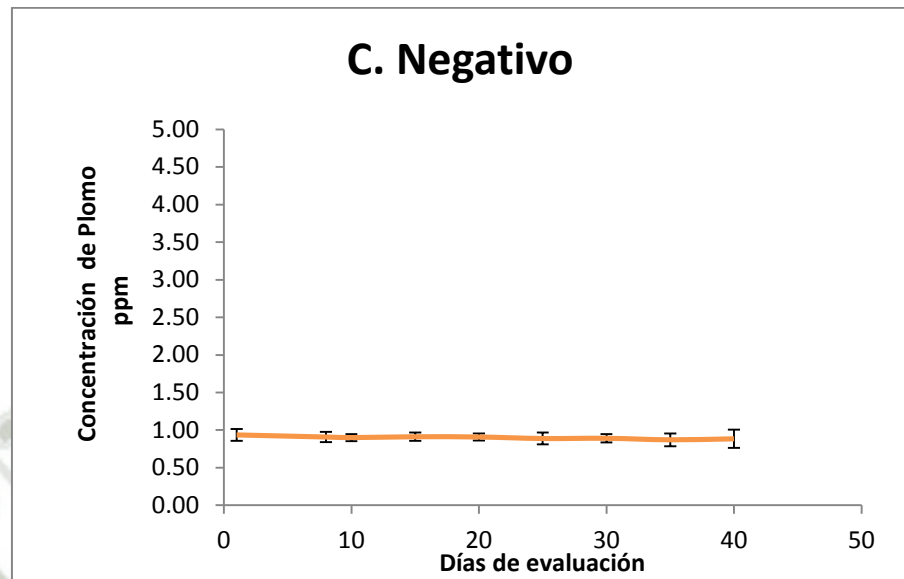
		CONCENTRACION (ppm)			
		Control	Control	Pre-post	Post
		Negativo	Positivo	tratamiento	tratamiento
<b>Basal</b>	<b>Días</b>				
	<b>1</b>	0.936 ± 0.080	0.855 ± 0.085	0.936 ± 0.080	0.911 ± 0.065
	<b>8</b>	0.908 ± 0.066	0.855 ± 0.085	0.277 ± 0.039	0.911 ± 0.065
	<b>10</b>	0.901 ± 0.048	2.737 ± 0.594	3.496 ± 0.904	2.661 ± 0.381
<b>Tratamiento</b>	<b>15</b>	0.912 ± 0.054	2.288 ± 0.651	1.023 ± 0.165	1.045 ± 0.173
	<b>20</b>	0.908 ± 0.049	1.819 ± 0.335	0.650 ± 0.153	0.624 ± 0.181
	<b>25</b>	0.888 ± 0.079	1.608 ± 0.231	0.442 ± 0.084	0.452 ± 0.133
	<b>30</b>	0.891 ± 0.057	1.433 ± 0.202	0.276 ± 0.038	0.383 ± 0.111
	<b>35</b>	0.871 ± 0.085	1.340 ± 0.182	0.156 ± 0.050	0.309 ± 0.074
	<b>40</b>	0.884 ± 0.122	1.281 ± 0.148	0.192 ± 0.043	0.285 ± 0.058

**Fuente:** Elaboración propia.

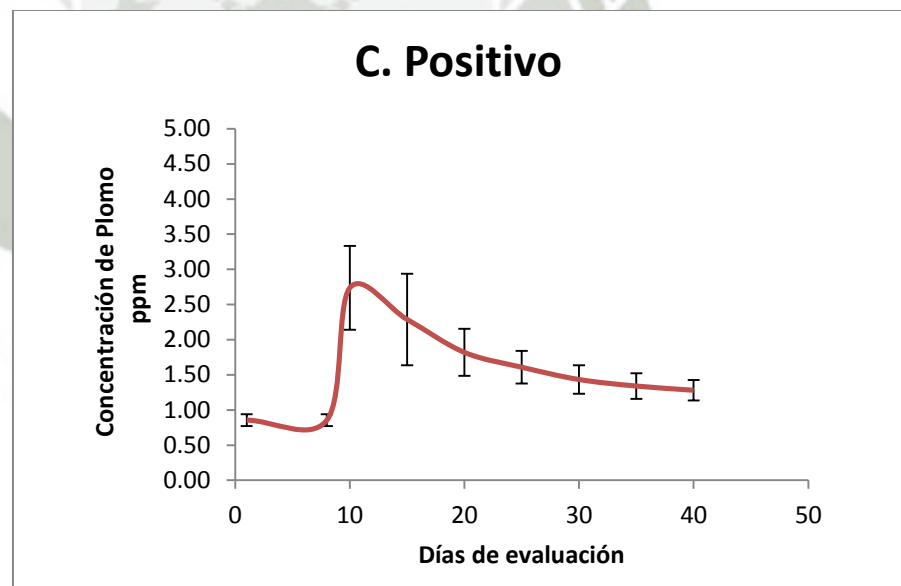
■ Siete días después de tratamiento con solución acuosa de ajo liofilizado.

■ 24 horas después del día de la intoxicación

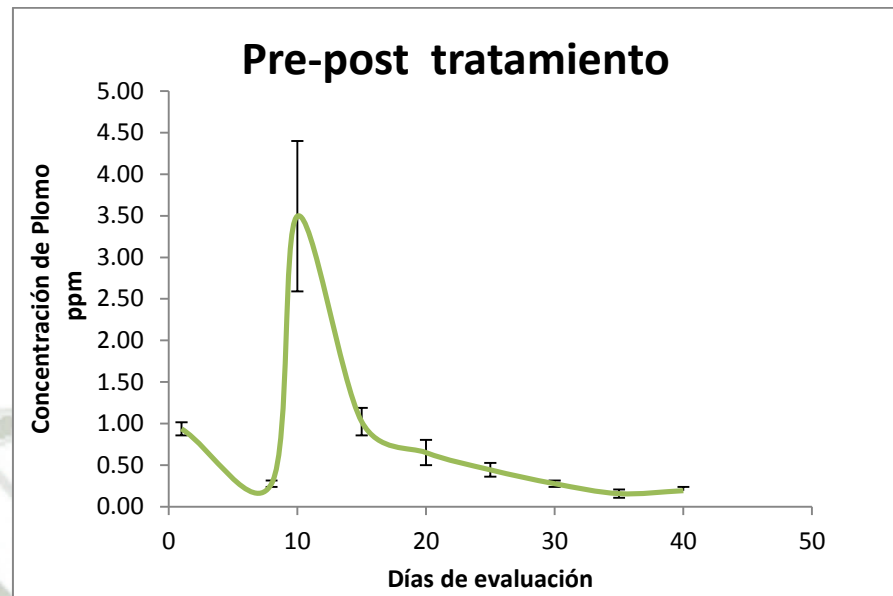
Con los datos del Cuadro N°8, se realizaron los Gráficos N°8, 9, 10, 11 y 12, en donde se muestran concentraciones promedio de plomo en sangre (ppm) y las desviaciones estándar de todo el periodo de tratamiento de todos los grupos en estudio: (Control Negativo, Control Positivo, Pre-post tratamiento y Post tratamiento).



**Gráfico N°8:** Grupo control negativo.  
*Fuente:* Elaboración propia.

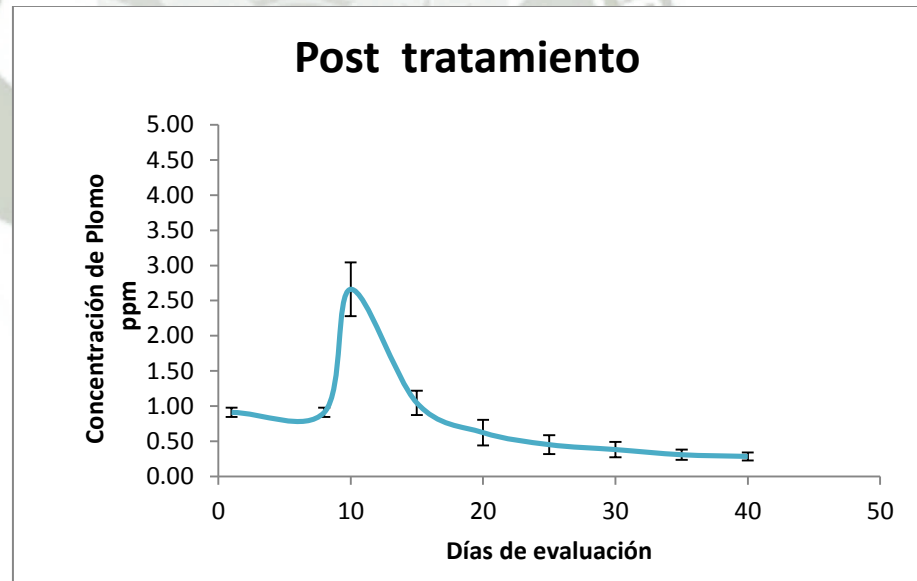


**Gráfico N°9:** Grupo control positivo.  
*Fuente:* Elaboración propia.



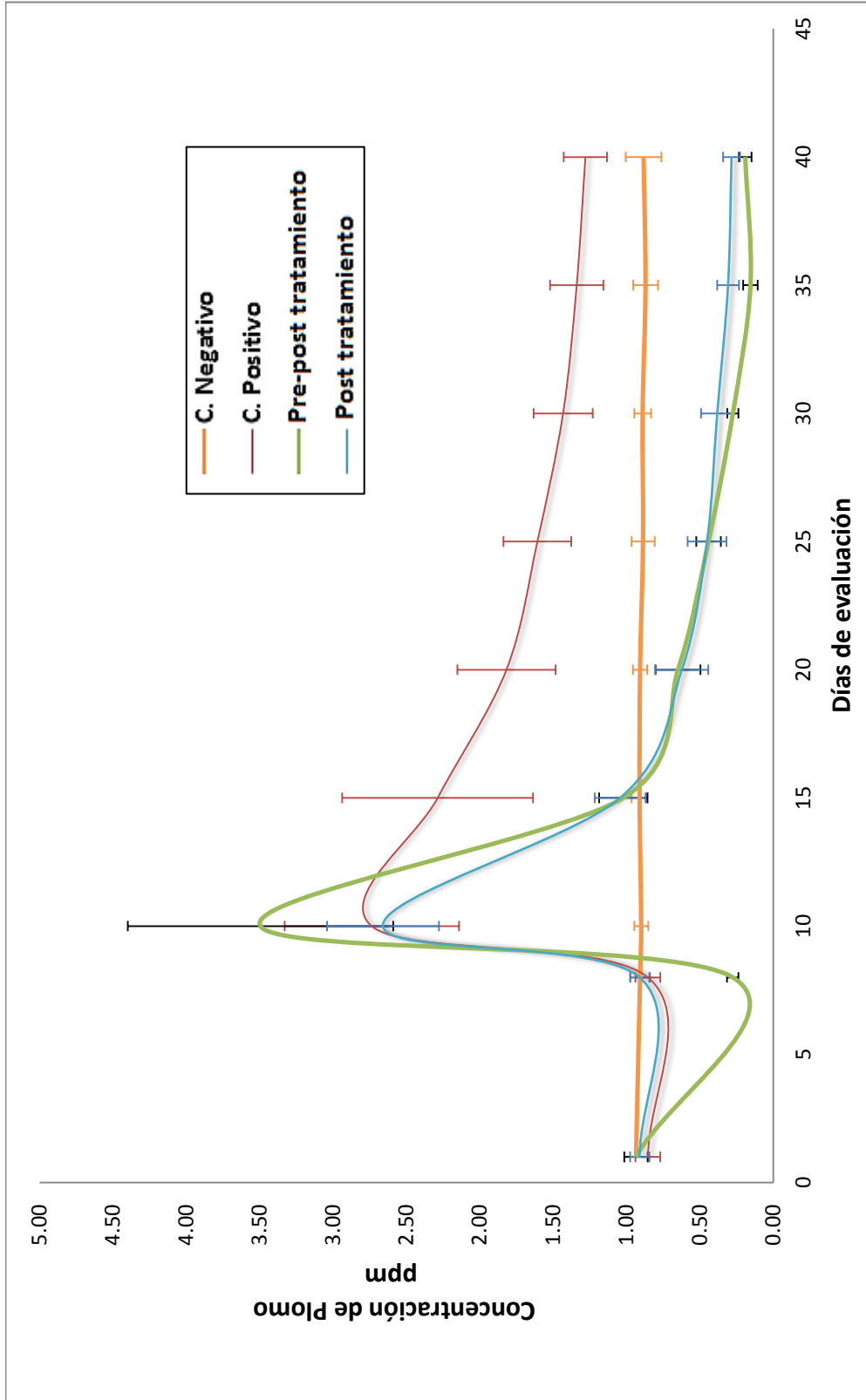
**Gráfico N°10:** Grupo pre-post tratamiento.

*Fuente:* Elaboración propia.



**Gráfico N°11:** Grupo post tratamiento.

*Fuente:* Elaboración propia



**Grafico N°12:** Concentraciones promedio de plomo sanguíneo (ppm).

*Fuente: Elaboración propia.*

Tomando en cuenta los valores de los gráficos anteriores, numéricamente se puede determinar que la solución acuosa ajo "*Allium sativum L.*" administrada como tratamiento a los grupos 3 (Pre-post tratamiento) y grupo 4 (Post tratamiento), parece disminuir los niveles de plomo en sangre en relación al grupo control positivo. Para corroborar dicha suposición se analizó estadísticamente todos los valores y se aplicó un Análisis de Varianza (ANOVA) ( $p < 0.05$ ) para establecer si existe o no diferencia significativa entre las concentraciones promedio de plomo en sangre de todos los grupos de estudio.

**Cuadro N°9:** Análisis de varianza aplicada a las concentraciones de plomo de los cuatro grupos de estudio (mg/L).

	Día	Valor F	Valor crítico para F	Probabilidad	Significancia
<i>Basal</i>	1	1.44969766		0.25824086	No
<i>Pre-post tratamiento</i>	8	131.617442		2.4539E-13	Si
<i>Intoxicación</i>	10	21.9676251		1.5373E-06	Si
	15	20.9618072	<b>3.09839121</b>	2.1874E-06	Si
	20	44.2326911		5.1599E-09	Si
	25	85.2931463		1.4339E-11	Si
<i>Tratamiento</i>	30	117.452858		7.2116E-13	Si
	35	146.676092		8.7481E-14	Si
	40	151.720643		6.3333E-14	Si

**Fuente:** Elaboración propia.

Dónde:

*Sí; si existe diferencia estadísticamente significativa.*

*No; no existe diferencia estadísticamente significativa.*

De los gráficos anteriores y del análisis de varianza se puede determinar que no se encontró diferencia significativa ( $p>0.05$ ) entre las concentraciones basales de plomo en sangre de los cuatro grupos de estudio, así mismo, los valores promedio de las concentraciones de plomo en sangre del grupo control negativo, al cual se le administró 1 mL de agua destilada, se mantuvieron constantes durante todo el periodo de evaluación, por lo que podemos establecer que no existe ningún factor externo que esté influyendo significativamente en las concentraciones de plomo durante el periodo de investigación.

En relación al gráfico y análisis de varianza del grupo control positivo, se encontró diferencia significativa ( $p<0.05$ ) en los niveles de plomo en sangre respecto a los otros tres grupos de estudio, así mismo los valores promedio de las concentraciones de plomo de dicho grupo, no se mantuvieron constantes los 30 primeros días, esto se debe a que el propio organismo de los animales, una vez inducidas a un cuadro de toxicidad aguda con 100 mg/kg de acetato de plomo, trata de eliminar por diferentes medios el exceso de plomo como mecanismo de defensa lo cual es catalogado como “eliminación fisiológica” en las investigaciones realizadas por (Senapati SK et al., 2001; Awivedi SK et al., 2001). Sin embargo los días posteriores al día 30, las concentraciones de plomo parecen hacerse constantes, lo que nos indica que la fisiología del animal de experimentación llega a un punto en el que no puede eliminar más el exceso de plomo en sangre debido a que por el tiempo podría estarse presentando el equilibrio tricompartmental característico del plomo que se describe en las investigaciones realizadas por (Sina K et al., 2012; Vega j et al., 2003; Payton M et al., 1998; Lamphear Ret al., 2000).

A pesar de que después de la intoxicación aguda las concentraciones de plomo disminuyen fisiológicamente, estadísticamente ( $p<0.05$ ) los valores hallados para el grupo control positivo difieren significativamente del resto de grupos. Frente a estos datos se puede afirmar que efectivamente estamos frente a un cuadro de intoxicación aguda y por lo tanto se debe administrar algún tipo de tratamiento

que revierta las concentraciones elevadas de plomo tal y como se realizó en presente trabajo y cuyos resultados se exponen a continuación.

Los resultados de los animales que conformaron el grupo 3 (Pre-post tratamiento); a los cuales luego de determinar sus concentraciones basales, se les administró un tratamiento de siete días con solución acuosa de ajo liofilizado (1000 µg/kg/día de alicina), el día ocho se les intoxicó con solución acuosa de acetato de plomo (100 mg/kg) y posteriormente se continuó con el tratamiento; los resultados se muestran en los **Cuadros N°8, 9** y **Gráfico N°10** y se analizan en tres momentos:

*Primero;* luego de siete días de tratamiento con ajo liofilizado, en donde se observa una disminución del 70.41% de la concentración basal de plomo; así mismo los resultados estadísticos del **Cuadro N°8**, indican que existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) del grupo 3 (Pre-post tratamiento) respecto al resto de grupos. Por lo que podemos establecer que la solución acuosa de ajo liofilizado disminuye los niveles basales de plomo en sangre.

*Segundo;* el día diez cuyos datos pertenecen al momento de la intoxicación aguda, muestran un mayor aumento de la concentración de plomo en sangre respecto al resto de grupos (**Gráfico N°10**), esta mayor absorción de plomo se debería probablemente a que luego de los siete días de tratamiento el equilibrio tricompartmental característico del plomo se vio alterado y entonces el día de la intoxicación no sólo se registra la concentración de plomo administrado intencionalmente, sino que probablemente a esto también se sumaría el plomo que se encuentra depositado en órganos y huesos y que se estarían removiendo para lograr nuevamente el equilibrio tricompartmental.

*Tercero;* las cinco semanas de tratamiento posteriores al día de la intoxicación, muestran un mayor descenso de los niveles de plomo los cinco primeros días, esto se debería a la sumatoria de la eliminación fisiológica de plomo más la eliminación relacionado a la administración de ajo. Los días posteriores de tratamiento, la reducción de los niveles de plomo en sangre continúan siendo

evidentes llegando incluso a disminuir por debajo de las concentraciones basales. Por lo tanto se puede establecer que la administración acuosa de ajo liofilizado administrado antes y después de la intoxicación con acetato de plomo, reduce los niveles de plomo en sangre. Estos resultados coinciden con lo reportado por (Badiei K et al., 2006; Massadeh AM et al., 2007).

En relación a los datos correspondientes al grupo 4 (Post tratamiento), estos muestran una disminución paulatina de la concentraciones de plomo después del día de la intoxicación, así mismo se puede observar que dichas concentraciones disminuyen incluso por debajo de las concentraciones basales, lo que podría indicarnos que el tratamiento con solución acuosa de ajo liofilizado no solo disminuye las concentraciones de plomo administradas intencionalmente, sino que también disminuye las concentraciones basales de plomo determinadas al inicio del tratamiento.

Por otro lado tanto el grupo 3 (Pre-post tratamiento) como el grupo 4 (Post tratamiento), según el análisis de varianza (**Cuadro N°9**), difieren significativamente ( $p > 0.05$ ).

Tomando en cuenta los resultados anteriores, los valores de los grupos de estudio 3 y 4 demuestran que ambos tratamientos disminuyen la concentración de plomo sanguíneo; para determinar el mejor tratamiento para el efecto de la solución acuosa de ajo liofilizado en *Rattus norvegicus* variedad Wistar, se empleó el Test de Turkey ( $p < 0.05$ ) como prueba de significancia que permite múltiples comparaciones entre todos los pares de medias y cuyos resultados son mostrados a continuación.

**Cuadro N°10:** Análisis estadístico del promedio del promedio de los resultados de las concentraciones sanguíneas de plomo, empleando el test de Turkey (mg/L).

GRUPOS DE ESTUDIO	Día 1		Día 8		Día 10		Día 15		Día 20	
	Prom.	Signif. (p<0.05)	Prom.	Signif. (p<0.05)	Prom.	Signif. (p<0.05)	Prom.	Signif. (p<0.05)	Prom.	Signif. (p<0.05)
G 1 Control Negativo	0.936	A	0.909	A	0.901	B	0.912	B	0.909	B
G 2 Control positivo	0.855	A	0.855	A	2.737	A	2.289	A	1.819	A
G 3 Pre-post tratamiento	0.936	A	0.277	B	3.496	A	1.024	B	0.650	B
G 4 Post tratamiento	0.911	A	0.911	A	2.661	A	1.045	B	0.624	B

GRUPOS DE ESTUDIO	Día 25		Día 30		Día 35		Día 40	
	Prom.	Signif. (p<0.05)	Prom.	Signif. (p<0.05)	Prom.	Signif. (p<0.05)	Prom.	Signif. (p<0.05)
G 1 Control Negativo	0.889	B	0.891	B	0.871	B	0.884	B
G 2 Control positivo	1.608	A	1.433	A	1.340	A	1.281	A
G 3 Pre-post tratamiento	0.442	C	0.276	C	0.156	C	0.192	C
G 4 Post tratamiento	0.453	C	0.383	C	0.309	C	0.285	C

Prom. : Promedio

Signif. : Significancia

Fuente: Elaboración propia.

Los resultados del test de Turkey (**Cuadro N°10**), muestran que en el día 1 los valores obtenidos fueron estadísticamente no significativos ( $p>0.05$ ) por lo que se considera que las medias de los cuatro grupos de investigación son iguales ya que corresponden a las concentraciones basales de plomo en sangre. Los datos del día 8, muestra que los valores del grupo 3 son estadísticamente significativos y diferentes al resto de grupos ( $p<0.05$ ), por lo que se establece que el tratamiento por siete días con solución acuosa de ajo liofilizado disminuyó los niveles de plomo en sangre. Los datos del día diez, correspondiente a una día después de la intoxicación con 100 ppm de acetato de plomo y muestran una diferencia significativa del grupo control negativo en relación a los otros grupos, esto debido a que dicho grupo de estudio no fue sometido a un cuadro de toxicidad aguda. Así mismo los datos de los días 15 y 20, muestran diferencias estadísticas ( $p<0.05$ ) entre el grupo control positivo y el resto de grupos, por lo que se puede determinar que a partir del día 15 los tratamientos empleados en el grupo 3 y 4, hacen efecto, ya que los valores de ambos grupos no se diferencian significativamente del grupo control negativo ( $p>0.05$ ). Los valores de los cuatro grupos de estudio correspondientes a los días 25, 30, 35 y 40 evidencian una clara diferencia significativa ( $p<0.05$ ) del grupo 1 (Control Negativo) en relación a los grupos 2, 3, 4 y del grupo 2 (Control Positivo) en relación a los grupos 1, 3, 4; por lo que se puede establecer que los tratamientos empleados en los grupos 3 y 4, efectivamente disminuyen los niveles de plomo en sangre de los animales de experimentación, además, se puede afirmar que no existe diferencia estadísticamente significativa ( $p>0.05$ ) entre administrar un tratamiento Pre-post intoxicación y un tratamiento post intoxicación.

### **Efecto de la solución acuosa de ajo liofilizado sobre las concentraciones de plomo en órganos (hígado, bazo y riñón).**

Con la finalidad de determinar si la solución acuosa de ajo liofilizado tiene algún efecto sobre las concentraciones de plomo en órganos, se procedió a sacrificar

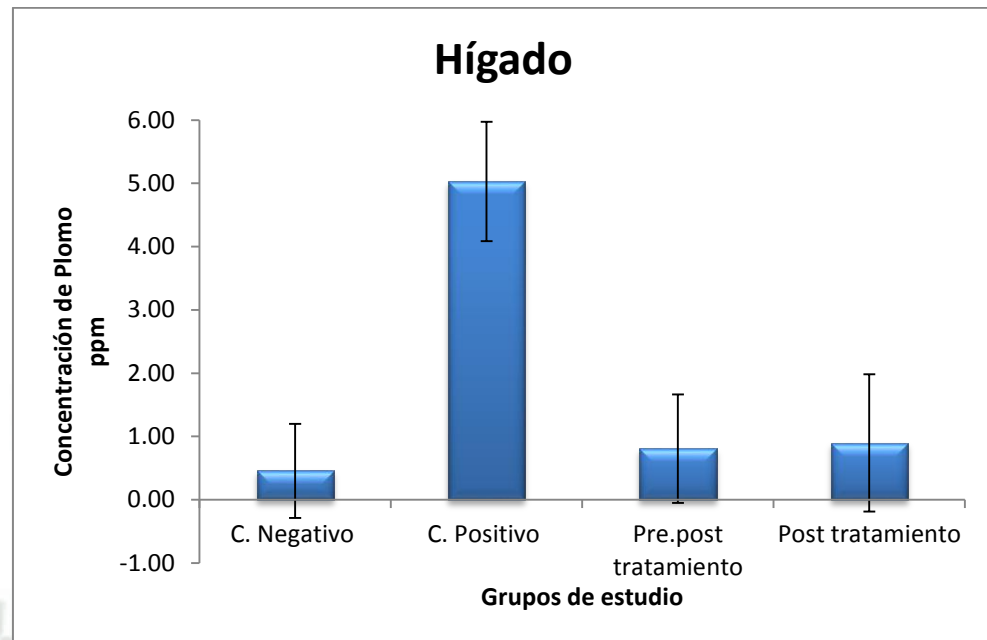
por contusión cervical a todos los animales de experimentación al finalizar el periodo de tratamiento y se les extrajeron el bazo, hígado y riñón, los cuales fueron colocados en bolsas de polietileno debidamente rotuladas (**Anexo 8**) para luego pesarlos y continuar con los análisis tal como se describe en el capítulo anterior.

A continuación se muestran cuadros y gráficos con los resultados de los estudios, además la interpretación de los datos se hizo considerando como concentraciones basales los valores del grupo control negativo (Grupo 1) al cual, como se mencionó anteriormente, no se le administró ningún tipo de tratamiento.

**Cuadro N°11:** *Concentraciones promedio de plomo en los diferentes órganos ( $\mu\text{g/g}$ ).*

	Hígado	Bazo	Riñón
C. negativo	0.455 $\pm$ 0.743	0.763 $\pm$ 0.356	0.891 $\pm$ 0.867
C. positivo	5.030 $\pm$ 0.943	1.983 $\pm$ 1.105	2.232 $\pm$ 1.817
Pre-post tratamiento	0.809 $\pm$ 0.857	1.017 $\pm$ 0.759	2.345 $\pm$ 1.271
Post tratamiento	0.898 $\pm$ 1.085	0.956 $\pm$ 0.463	2.579 $\pm$ 1.342

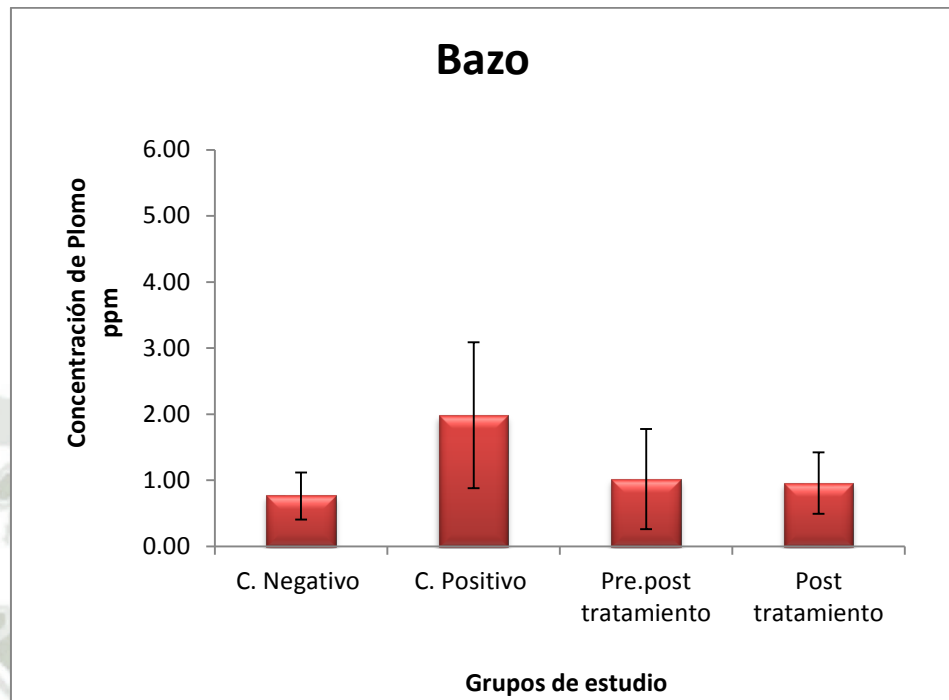
*Fuente: Elaboración propia.*



**Grafico N°13:** Concentraciones promedio de plomo en hígado ( $\mu\text{g/g}$ ).

*Fuente:* Elaboración propia.

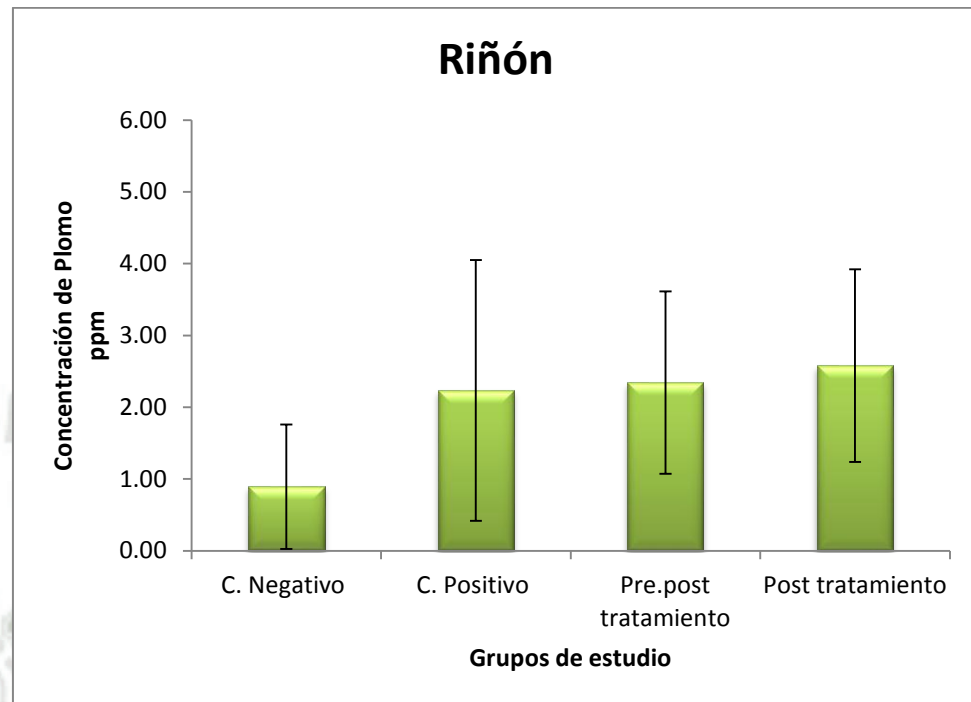
En el **Cuadro N°11** y **Grafico N°13** se observa que la concentración basal de plomo en hígado es de  $0.455 \pm 0.743 \mu\text{g/g}$ , por otro lado la concentración promedio del grupo 2 (C. Positivo) que fue intoxicado con 100 ppm de acetato de plomo y que no recibió ningún tipo de tratamiento es de  $5.030 \pm 0.943 \mu\text{g/g}$ ; los otros dos grupos a los que se les administró solución acuosa de ajo liofilizado como tratamiento, muestran valores de  $0.809 \pm 0.857 \mu\text{g/g}$  y  $0.898 \pm 1.085 \mu\text{g/g}$  respectivamente. Por lo que podemos establecer que el tratamiento con ajo disminuye alrededor de un 83% las concentraciones de plomo en hígado en ambos grupos tratados. Estos resultados coinciden con estudios relacionados reportados por (Wu CC et al., 2002; Rahmy TR et al., 2001; Massadeh AM et al., 2007).



**Grafico N°14:** Concentraciones promedio de plomo en bazo ( $\mu\text{g/g}$ ).

*Fuente:* Elaboración propia.

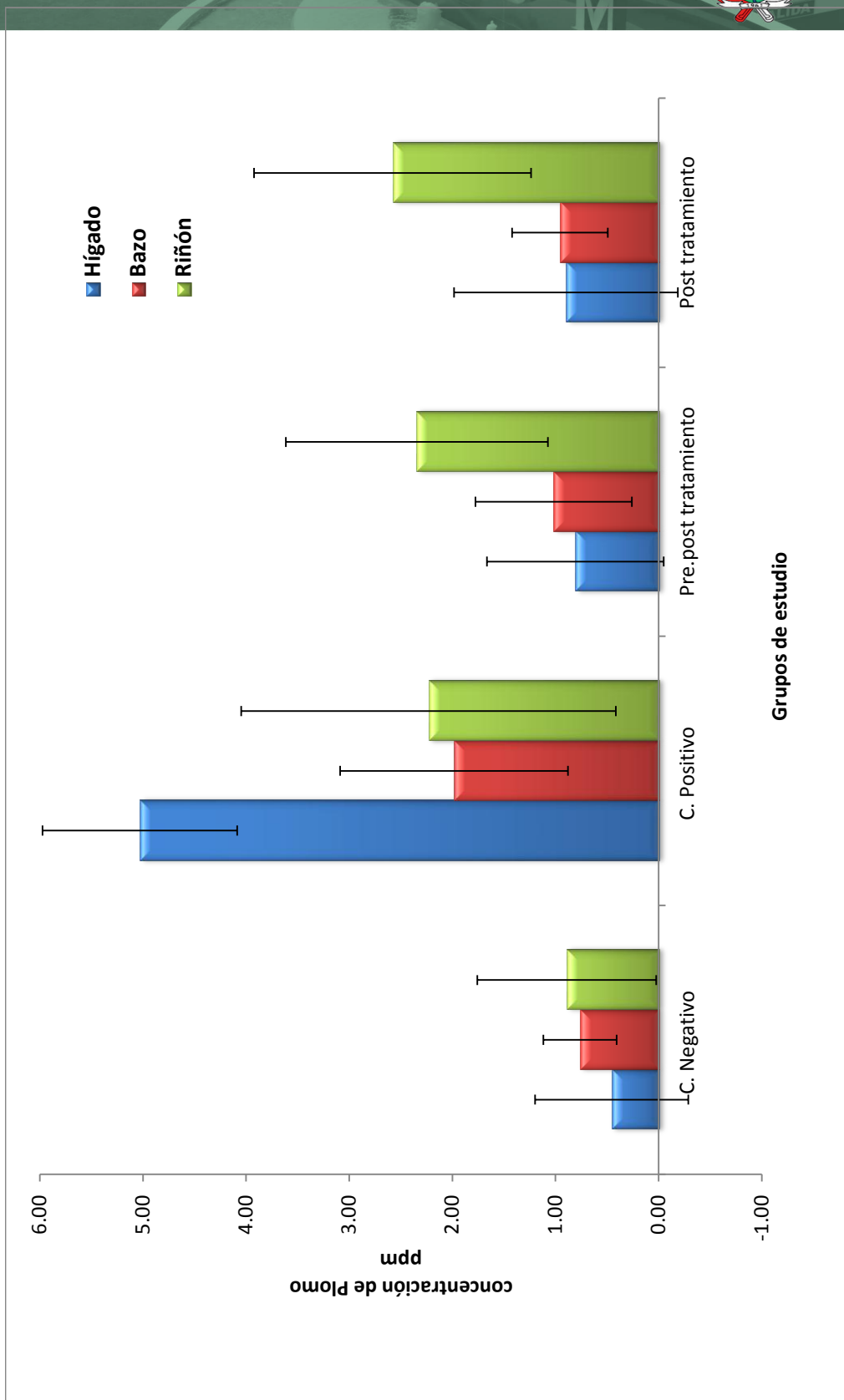
Los valores del **Cuadro N°11** y **Grafico N°14** muestran que la concentración basal de plomo en bazo es de  $0.763 \pm 0.356 \mu\text{g/g}$ , por otro lado la concentración promedio del grupo Control Positivo que fue intoxicado con 100 ppm de acetato de plomo y que no recibió ningún tipo de tratamiento es de  $1.983 \pm 1.105 \mu\text{g/g}$ ; los otros dos grupos a los que se les administró solución acuosa de ajo liofilizado como tratamiento, muestran valores de  $1.017 \pm 0.759 \mu\text{g/g}$  y  $0.956 \pm 0.463 \mu\text{g/g}$  respectivamente. Por lo que se puede establecer que el tratamiento con ajo disminuye alrededor de un 50 % las concentraciones de plomo en bazo en ambos grupos tratados.



**Grafico N°15:** Concentraciones promedio de plomo en riñón ( $\mu\text{g/g}$ ).

*Fuente:* Elaboración propia.

Los valores del **Cuadro N°11** y **Grafico N°15** muestran que la concentración basal de plomo en riñón es de  $0.891 \pm 0.867 \mu\text{g/g}$ , por otro lado la concentración promedio del grupo Control Positivo que fue intoxicado con 100 ppm de acetato de plomo y que no recibió ningún tipo de tratamiento es de  $2.232 \pm 1.817 \mu\text{g/g}$ ; los otros dos grupos a los que se les administró solución acuosa de ajo liofilizado como tratamiento, muestran valores de  $2.345 \pm 1.271 \mu\text{g/g}$  y  $2.579 \pm 1.342 \mu\text{g/g}$  respectivamente. Por lo que podemos establecer que el tratamiento con ajo no disminuye las concentraciones de plomo en riñón en ninguno de los dos grupos que fueron tratados con ajo liofilizado.



**Grafico N°16:** Concentraciones promedio de plomo en órganos (ppm).

*Fuente: Elaboración propia.*

Tomando en cuenta los valores de los cuadros y gráficos anteriores, numéricamente se puede determinar que la solución acuosa ajo “*Allium sativum L.*” administrada como tratamiento a los grupos 3 (Pre-post tratamiento) y 4 (Post tratamiento), disminuye los niveles de plomo en hígado y bazo en relación al grupo control positivo, sin embargo, esta reducción de la concentración de plomo no se evidencia en el riñón de ninguno de los dos grupos de tratamiento, mas por el contrario, se observa un pequeño incremento de los valores de plomo en dicho órgano. Esto se puede deber a que una de las principales funciones del riñón es la eliminación de desechos y sustancias extrañas del organismo mediante la orina, en consecuencia es muy probable que el plomo al estar siendo eliminado por esta vía se halle en mayor concentración. Estos resultados coinciden con estudios relacionados reportados por (Senapati S et al., 2001; Sina K et al., 2012).

Mediante un análisis estadístico de Varianza (ANOVA) ( $p < 0.05$ ), se determinó si entre las concentraciones de las muestras biológicas de los grupos de estudio existe diferencia estadísticamente significativa.

**Cuadro N°12:** *Análisis de varianza aplicada a las concentraciones de plomo en los órganos de los grupos de estudio ( $\mu\text{g/g}$ ).*

Órgano	Valor F	Valor crítico para F	Probabilidad	Significancia
Bazo	3.35105977	3.09839121	0.03953124	Si
Hígado	33.4915672		5.4203E-08	Si
Riñón	1.86128905		0.16869799	No

**Fuente:** *Elaboración propia.*

Dónde:

*Sí; si existe diferencia estadísticamente significativa.*

*No; no existe diferencia estadísticamente significativa.*

Tomando en cuenta los resultados anteriores, los valores de los grupos de estudio 3 y 4 demuestran que ambos tratamientos disminuyen las concentraciones de plomo en hígado y bazo, mas no en el riñón.

Para determinar el mejor tratamiento para el efecto de la solución acuosa de ajo liofilizado sobre los niveles de plomo en hígado y bazo en *Rattus norvegicus* variedad Wistar, se empleó el Test de Turkey ( $p < 0.05$ ) como prueba de significancia que permite múltiples comparaciones entre todos los pares de medias y cuyos resultados son mostrados a continuación.

**Cuadro N°13:** *Análisis estadístico de las concentraciones de plomo en bazo e hígado empleando el test de Turkey ( $\mu\text{g/g}$ ).*

		<b>Bazo</b>		<b>Hígado</b>	
<b>GRUPOS DE ESTUDIO</b>		Prom.	Sign. ( $p < 0.05$ )	Prom.	Signif. ( $p < 0.05$ )
G 1	Control negativo	0.763	B	0.455	B
G 2	Control positivo	1.983	A	5.030	A
G 3	Pre-post tratamiento	1.017	AB	0.809	B
G 4	Post tratamiento	0.956	AB	0.898	B

**Prom. :** *Promedio*

**Signif. :** *Significancia*

**Fuente:** *Elaboración propia.*

Los resultados del test de Turkey (**Cuadros N°13**); muestran que los valores del grupo 2 (Control positivo) muestran una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en relación a los tres grupos restantes, además, los valores de los grupos 1, 3 y 4, no muestran una diferencia estadísticamente significativa entre ellos. Por lo que se puede determinar que los tratamientos con solución acuosa de ajo liofilizado empleados a los grupos 3 y 4, efectivamente disminuye los niveles de

plomo en hígado y bazo de los animales de experimentación , además, se puede afirmar que no existe diferencia estadísticamente significativa entre administrar un tratamiento Pre-post intoxicación y un tratamiento post intoxicación.



## CONCLUSIONES

Basados en los resultados de este estudio, se puede concluir lo siguiente:

1. El contenido de alicina en el *Allium sativum L.* (ajo) variedad arequipeño empleado en nuestra investigación es de 2.73 mg/g, lo que corresponde al 0.27 g/%.
2. La validación del equipo, la linealidad, precisión y el límite de detección y cuantificación obtenidas en el presente estudio, demuestran que la voltametría es una técnica efectiva para determinar plomo en muestras sanguíneas y en órganos.
3. La administración de solución acuosa de ajo liofilizado como tratamiento en la intoxicación aguda con plomo, demostró reducir los niveles de plomo en muestras sanguíneas.
4. La administración de solución acuosa de ajo liofilizado como tratamiento en la intoxicación aguda con plomo, demostró reducir los niveles de plomo en hígado y bazo.

## SUGERENCIAS

1. Proporcionar información a la población en general sobre la intoxicación con plomo, ya que están expuestos a una gran cantidad de vehículos en el parque automotor, industrias, mineras y demás fuentes de intoxicación que contaminan el suelo, agua y aire con este tóxico. Poner énfasis acerca de los signos y síntomas que puede ocasionar la exposición a este metal y sobre todo enfatizar en la prevención.
2. Promocionar el consumo de ajo como parte de la dieta diaria.
3. Determinar si el ajo "*Allium sativum L.*" disminuye los niveles de otros metales pesados en muestras biológicas.
4. Llevar a cabo trabajos de investigación de las propiedades desintoxicantes de otras plantas medicinales.
5. Aprovechar al máximo la Voltamperometría por demostrar ser una técnica altamente sensible.

## BIBLIOGRAFIA

1. ACKERMANN RT; MULROW CD; RAMIREZ G; GARDNER CD; MORBIDONI L; LAWRENCE VA (2001); Garlic shows promise for improving some cardiovascular risk factors. Arch Intern Med; 161 (6):813 – 24.
2. ADRIANO IV; FOMCHENKOV IV; OREKHOV AN (2002); Hypotensive effect of long-acting garlic tablets allacor (a double-blind placebo. controlled trial). Ter Arkh; 74(3):76-8.
3. AHMED E; ABDEL M; MOHAMED S; SALEH A. The protective effects of flaxseed oil on lead acetate – induces renal toxicity in rats. Journal of Hazardous Materials. 2011; 194: 250 – 255. Disponible en internet [www.elsevier.com/locate/jhamat](http://www.elsevier.com/locate/jhamat)
4. AMAGASE H; PETESCH BL; MATSUURA H; KASUGA S; ITAKURA Y (2001) Intake of garlic and its bioactive components. Nutr: 131(3s):955S-62S.
5. An Introduction in Theory, Metrohm Ltd. CH-9100, Herisau Switzerland, Voltammetry.
6. ASILBERGED EK. Mechanisms of lead neurotoxicity, or looking beyond the lamppost. FASEB J. 1992; 6: 3201 – 6.
7. AVATO P; TURSIL E; VITALI C; MICCOLIS V; CANDIDO V (2000); Ally sulfide constituents of garlic volatile oil as antimicrobial; agents. Phytomedicine; 7(3):239-43.
8. BADIEI K; MOSTAGHNI A; TABATABAEI N. Ameliorated effects of Allium sativum on subclinical lead toxicity in goats. Department of clinical studies, School of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Kazeroun, iran. Pakistan Vet. J., 2006, 26(4): 184 – 186.

9. BALASENTHIL S; RAO KS; NAGINI S (2002). Garlic induces apoptosis during 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Oral Oncol*; 38(5):431-6.
10. BALDARRAGO SILVA GINA. 1991. Actividad Antifúngica “*in vitro*” del *Allium sativum L.* (ajo) frente a los dermatofitos *Microsporum*, *Trichophyton*. Universidad Católica de Santa María – Arequipa.
11. BATIREL HF; NAKA Y; KAYANO K; OKADA K; VURAL K; PINSKY DL; OZ MC (2002). Intravenous allicin improves pulmonary blood flow after ischemia-reperfusion injury in rats. *J Cardiovasc Surg (Torino)*; 43(2):175-9.
12. BIANCHINI F; VAINIO H (2001). Allium vegetables and organosulfur compounds: do they help prevent cancer? *Environ Health Perspect*; 109(9):893-902.
13. BONIFAZ, ALEXANDRO; MUÑOZ AYALA, MARIA DE JESUS; MONGE, BERNAL (1990). Estudio de la actividad in vitro de la alicina (principio activo del ajo) en el tratamiento de tiñas del cuerpo e inguinal; *Dermatol. Rev. Mex*: 34(3):199-204.
14. BOREK C (2001). Antioxidant health effect of aged garlic extract. *J Nutr*; 131(3s):1010S-5S.
15. BOTTONE FG; BAEK SJ; NIXON JB; ELING TE (2002). Diallyl disulfide (DADS) induces the antitumorigenic NSAID-activated gene (NAG-1) by a p53-dependent mechanism in human colorectal HCT 116 cells. *J Nutr*; 132(4):773-8.
16. BRIGGS WH; XIAO H; PARKIN KL; SHEN C; GOLDMAN IL Differential inhibition of human platelet aggregation by selected Allium thiosulfinates. *J Agric Food Chem*; 48(11):5731-5, 2000.

17. CALDERON S; QUINTANAR E; GONZALEZM; HERNANDEZ L. Lead and calcium transport in human erythrocyte. *Human and Experimental Toxicology*. 1999, 18, 327 – 332.
18. CAMPBELL JH; EFENDY JL; SMITH NJ; CAMPBELL GH (2001). Molecular basis by which garlic suppresses atherosclerosis. *J Nutr*; 131(3s):1006S-9S.
19. CANFIELD RL; HENDERSON JR; CORY- SLECHTA DA; COX C; LUSKO TA;LAMPHEAR B. Intellectual impairment in children with blood lead concentration below 10 micrograms per deciliter. *New Engl J Med*. 2003; 348: 1517 – 26.
20. CAPASSO. L.: Archaeological documentation of the atmospheric pollution in antiquity. *Med. Secoli*, 7 (3), 435-444, 1995.
21. Catherine L; Aidée C; “Efecto antifúngico del talco a base de *Allium sativum L.* (Ajo) sobre los dermatofitos causantes de tinea pedis (pie de atleta)”. Universidad Católica de Santa María.
22. CHAURASIA SS; PAUDE S; KARA. Withania sinbufera root extractin the regulation of lead induced oxidative damage in male mouse. *Pharmacol Res*. 2000; 41 (6): 663 – 6.
23. COLIC M; VUCEVIC D; KILIBARDA V; RADICEVIC N; SAVIC M (2002). Modulatory effects of garlic extracts on proliferation of T- lymphocytes in vitro stimulated with concanavalin A. *Phytomedicine*; 9(2):117-24.
24. DASILVA E; HOAREAU L. Medicinal plants: are emerging health aid. *Electron. J. Biotech*.1999; 15: 56 – 70.
25. DHIN IS; RODHERS WJ; GOMAA EA; STRASBURG GM; GRAY JI (2002). Inhibition of heterocyclic aromatic amine formation in fried ground beef patties by garlic and selected garlic-related sulfur compounds. *J Food Prot*; 65(11):1766-70.

26. Digester UV 705 (220 V, 60 Hz), Sample preparation in VA, disponible: <http://products.metrohm.com/polarograph/va-sample-preparation/product/27050016.aspx>.
27. DIKASSO D; LEMMA H; URGA K; DEBELLA A; ADDIS G; TADELE A. YIRSAW K (2002). Investigation on the antibacterial properties of garlic (*Allium sativum*) on pneumonia causing bacteria. *Ethiop Med J*; 40(3):241-9.
28. DING Y; GONICK HC; VAZIRI ND; LIANG K; WEI L. Lead induced hypertension, III: increased hydroxyl radical production. *Am J Hypertension*. 2001; 14: 169 – 73.
29. DIRSCH V.M.; VOLLMAR A.M (2001). Ajoene, a natural product with non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) - like properties? *Biochem Pharmacol*; 61(5):587-93.
30. DIRSCH VM; ANTLSPERGER DS; HENTZE H; VOLLMAR A.M (2002). Ajoene, an experimental anti-leukemic drug: mechanism of cell death. *Leukemia*: 16(1):74-83.
31. ESPINOZA R; HERNANDEZ A; NARCISO J; GASTAÑAGA C; MOSCOSO S; ORTIZ G. Determinants of blood lead levels in children in callao and Lima metropolitan area. *Salud Pública Mex*. 2003; 45 (supl 2): s209 – 19.
32. FANSWORTH NR; AKERELE OO; BINGEL AS; SOEJARTA DD; ENO Z. Medicinal plants in therapy. *Bulletin World Health Organization*. 1985; 63: 965 – 981.
33. FLEISCHAUER AT; POOLE C; ARAB L (2000). Garlic consumption and cancer prevention: meta-analyses of colorectal and stomach cancers. *Am J Clin Nutr*; 72(4):1047-52.

34. FLORES T, HAROLDO A.; ESTEVES G. JUDITH P. Efecto del extracto hidroalcoholico del *Allium sativum* L. sobre la disfunción endotelial en ratas. Universidad Católica de Santa María –Arequipa.
35. Florian D; Knapp G; Anal Ch; 2001,73 (7) ,1515 - 1520, disponible en: [http://www.s-prep.com/B83IE29A\\_Microwave-assisted\\_UV\\_Digestion.pdf](http://www.s-prep.com/B83IE29A_Microwave-assisted_UV_Digestion.pdf).
36. GOYER RA. Lead toxicity: current concerns. Environ Health Perspect. 1993; 100: 177 – 87.
37. GRUDZINSKI IP; FRANKIEWICZ-JOZKO A; BANY J (2001). Diallyl sulfide - - a flavor component from garlic (*Allium sativum*) attenuates lipid peroxidation in mice infected with *Trichinella spiralis*. Phytomedicine; 8(3):174-7.
38. GUADALUPE G; VISTOR R; ISRAELA B; JIMENA S; MARTHA L; CAMILO R; FEDERICO B. Cognitive déficits in adult rats by lead intoxication are related with regional specific inhibition of cNOS. Science Direct. 2004; 149: 49 – 59.
39. GUNTER HENZE, “Introduction to polarography and voltammetry”, Methrom Ltd.CH-9101 Herisau.
40. HAIYAN Z; YINGNAN J; ZHENYAN H; MI M. Cadmium accumulation and oxidative burst in garlic (*Allium sativum*). Journal of Plant Physiology.2005; 163: 977 – 984.Disponible en internet: [www.elsevier.de/jplph](http://www.elsevier.de/jplph) .
41. HANAFY M; SHALABY M; ELFONLY M; ADBEL A; SOLIMAN O. Effects of garlic on lead contents in chicken tissue. Dtsch. Tierarztl. Wochenschr. 1994, 101: 157 – 158.
42. HARVEY, D. DePauw University. “Modern Analytical Chemistry”, McGraw-Hill Higher Education.2000, Pág. 508-520.SomenathMitra Department of Chemistry and Environmental Science New Jersey institute of Technology,

“Sample preparation techniques in analytical chemistry” John Wiley & Sons, Inc., publication, Vol. N° 162, Pag: 227-245.

43. HARVEY, D. DePauw University. Modern Analytical Chemistry. 2000.
44. HATTORI A; YAMADA N; NICHIKAWA T; FUKUDA H; FUJINO T (2002). Protective effect of ajoene on acetaminophen-induced hepatic injury in mice. *Biosci biotechnol Biochem*; 65(11):2555-7.
45. HECK AM; DEWITT BA; LUKES AL (2000). Potential interactions between alternative therapies and warfarin. *Am J Health Syst Pharm*; 57(13):1221-7; quiz 1228-30.
46. HODGE G; HODGE S; HAN P (2002). *Allium sativum* (garlic) suppresses leukocyte inflammatory cytokine production in vitro: potential therapeutic use in the treatment of inflammatory bowel disease. *Cytometry*; 48(4):209-15.
47. HOFBAUER R; FRASS M; GMEINER B; KAYE AD; FROST EA (2001). Effect of garlic extract (*Allium sativum*) on neutrophil migration at the cellular level. *Heath Dis*; 3(1):14-7.
48. HORIE T; AWAZU S; ITAKURA Y; FUWA T (2001). Alleviation by garlic of antitumor drug-induced damage to the intestine. *J Nutr*; 131(3s):1071S-4S.
49. IIMURO M; SHIBATA H; KAWAMORI T; MATSUMOTO T; ARAKAWA T; SUGIMURA T; WAKABAYASHI K (2002). Suppressive effects of garlic extract on *Helicobacter pylori*. Induced gastritis in Mongolian gerbils. *Cancer Lett*; 187(1-2):61-8.
50. JANETH M; JUAN Q. Determinación de los niveles de plomo (II) en leche de vacuno por Voltamperometría. Universidad Católica de Santa María. 2011
51. JONH A; WALTER C; MARIA DEL CARMEN C; MARTA L; ISELLE S; TANIA O; JESSIE P; FELIX R. Intoxicación por plomo y otros problemas de

- salud en niños de poblaciones aledañas a relaves mineros. Rev. Perú Med Exp Salud Publica.2009; 26(1): 15-19.
52. JOSLING P (2001). Preventing the common cold with a garlic supplement: a double-blind, placebo-controlled survey. Adv. Ther; 18(4):189-93.
53. JUAN C, Alvarado. “Apuntes de Toxicología”,1º edición 2011
54. KANNAR D; WATTANAPENPAIBOON N; SAVIGE GS; WAHLQVIST ML (2001). Hypocholesterolemic effect of an entericoated garlic supplement. J Am Coll Nutr; 20(3):225-31.
55. KAYE AD; DE WITT BJ; ANWAR M; SMITH DE; FENG CJ; KADOWITZ PJ; NOSSAMAN BD (2000). Analysis of responses of garlic derivatives in the pulmonary vascular bed of the rat. J Appl Physiol; 89(1):353-8.
56. KEHOL, R. A.: The metabolism of lead in man in health and disease; lecture II. Soc. R. Inst. Publ. Health High. 24, 120, 1961.
57. KOLLER K; SPURGEON A; LEVY L. Recent developments in low – level lead exposure and intellectual impairment in children. 2004, 112, 987 – 994.
58. KU DD; ABDEL-RAZEK TT; SAI J; KIM.PARK S; FALLON MB; ABRAMS GA (2002). Garlic and its active metabolite allicin produce endothelium and nitric oxide-dependent relaxation in rat pulmonary arteries. Clin Exp Pharmacol Physiol; 29(1-2):84-91.
59. KUETTNER EB; HILGENFELD R; WEIAA MS (2002). The active principle of garlic at atomic resolution. J. Biol Chem; 277(48)46402-7.
60. LANPHEAR, B. P.; DIETRICH, K.; ANINGER, P.; Y COX, C.: Cognitive deficits associated with blood lead concentrations < 10 nanograms % in U.S. children and adolescents. Public Health Rep., 115, 521 – 529, 2000.

61. LASLEY SM; GREEN MC; GILBERT ME. Rat hippocampal NMDA receptor binding as a function of chronic lead exposure level. *Neurotoxicol teratol.* 2001; 23: 185 – 9.
62. LAU BH (2001). Suppression of DLD oxidation by garlic. *J Nutr;* 131(3s):985S-8S.
63. LAUWERYS, R.: *Toxicology Industrially et Intoxications Professionals*, 2°. Ed. Masson, Paris, 1982.
64. LEDEZMA E; JORQUERA A; BENDEZU H; VIVAS J; PEREZ G (2002). Antiproliferative and leishmanicidal effect of ajoene on various *Leishmania* species: ultrastructural study. *Parasitol Res;* 88(8):748-53.
65. LEDEZMA E; MARCANO K; JORQUERA A; DE SAUSA L; PADILLA M; PULGAR M; APITZ-CASTRO R (2000). Efficacy of ajoene en the treatment of Tinea pedis: a double-bild and comparative study with terbinafine. *J Am Acad Dermatol;* 43(5Pt 1):829-32.
66. LI M; CIU JR; YE Y; MIN JM; ZHANG LH; WANG K; GARES M; CROS J; WRIGHT M; LEUNG-TACK J (2002). Antitumoractivity of Z-ajoene, a natural compound purifiel from garlic antimitotic and microtubule-interaction properties. *Carcinogenesis;* 23(4)573-9.
67. LI M; MIN JM; CUI JR; ZHANG LH; WANG K; VALETTE A; DAVRINCHE C; WRIGHT M; LEUNG-TACK J (2002). Z-ajoene induces apoptosis of HL-60 cells: involment of Bcl-2 cleavage; *Nutr Cancer;* 42(2):241-7.
68. LIU L; YEH YY (2000). Inhibition of cholesterol biosynthesis by organosulfur compounds derived from garlic. *Lipids;* 35(2):197-203.
69. LIU L; YEH YY (2001). Water-soluble organosulfur compounds of garlic inhibit fatty acid and triglyceride syntheses in cultured rat hepatocytes. *Lipid;* 36(4):395-400.

70. LIU L; YEH YY (2002). S-alk (en) yl cysteines of garlic inhibit cholesterol synthesis by deactivating HMG-CoA reductase in cultured rat hepatocytes J Nutr; 132(6): 1129-34.
71. LOCKITCH G. Perspectives on lead toxicity. Clin Biochem. 1993; 26: 371 – 81.
72. LOPEZ, JORGE; LAZARTE, CESAR (1997). Tratamiento dietético con alicina en la gastritis crónica por Helicobacter pylori en el Hospital IPSS Tacna Rev. Med. Inst. Perú. Secur. Soc; 6(3/4):20-4.
73. LUO R; DONG Y; FANG F (2001). The experimental study of the anti-enterovirus effects of drug in vitro. Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi; 15(2):135-8.
74. M.GRAC, A. DE KORN, E. SANTOS DA BOA, D.C.MUNIZ, J.TEIXEIRA,J.PEREIRA, A. PAIXA, A. PIRES, B.WELZ, W. P. CARVALHO, E. BATISTA Y M. KORN; “Sample Preparation for the Determination of Metals in Food Samples Using Spectroanalytical Methods - A Review”; Applied Spectroscopy Reviews, vol:43,Nº2, pag.67-92,2008. Disponible en internet: <http://libra.msra.cn/Publication/26978070/sample-preparation-for-the-determination-of-metals-in-food-samples-using-spectroanalytical-methods>
75. MANTAWY MM; MAHMOUD AH (2002). Effect of Allium cepa and Allium sativum feeding on glucose, glycogen, protein bands profile and phenol oxidase activity in Biomphalaria alexandriiba. J Egypt Soc Parasitol; 32(1):271-83.
76. MASSADEH AM; AL-SAFI; MAMONI IF; ALOMARY AA; JARADAT QM; ALKOFahi AS. Garlic (Allium sativum L.) as a potential antidote for cadmium and lead intoxication: cadmium and lead distribution and analysis in different mice organs. Biol Trace Elem Res. 2007; 120: 227 – 34.
77. MATSUURA H (2001). Saponins in garlic and modifiers of the risk of cardiovascular disease. J Nutr; 131(3s):1000S-5S.

78. MERCE C; ANTONI F; ROIG N; CARLOS M. Motro behavior and brain enzymatic changes after acute lead intoxication on different strains of mice. Science Direct. 2003; 74:2009 – 2021.
79. MICHALAK E; WIERZBICLA M. Differences in lead tolerance between *Allium sativum* cepa plants developing from seeds and bulbs. Plant Soil. 1998; 1999: 251 – 60.
80. MOERIRA GE; ROSA GJ; BARROS SB; VASSILIEFF VS; VASSILIEFF I. Antioxidant defense in rat brain regions after developmental knead exposure. Toxicology. 2001; 169 (2): 145 – 51.
81. MORAN B.; NORMA J.; Álvarez B. SANDRA M. 1991. Actividad antibacteriana in vitro del 2-propentiosulfinato de alilo del *Allium sativum* L. (extracto acuoso en cepas de Salmonellas: tiphy, paratiphy A y paratiphy B.)
82. MORIGUCHI T; TAKASUGI N; ITAKURA Y (2001). The effects of aged garlic extract on lipid peroxidation and the deformability of erythrocytes. J Nutr; 131(3s): 1016S-9S.
83. NAGANAWA RIE, NAMI IWATA. KEIKO ISHIKAWA. HIROYUKI FUKUDA, TSUCHIYOSHI FUJINO and ATSUSHI SUZUKI. 1996 Inhibition of Microbial growth by ajoeno, a sulfur containing compound derived from garlic. Applies and Environmental Microbiology. Nov. 1996. P. 4238-4242. American Society for Microbiology.
84. NAIK G; PRIYADARSINIK; SATAV J; BANAVALLIKAR M; SOHANI D; BIYANI M; MOHAN H. Comparative antioxidant of individual herbal components used in ayurvedic medicine. Phytochemistry. 2003; 63: 97 – 104.

85. NAJAR – NEZHAD V; ASLANI MR; BALALI – MOOD M. Evaluation of allicin for the treatment of experimentally induced subacute lead poisoning in sheep. *Biol Trace Elem Res.* 2008; 126: 141 – 7.
86. NAKAGAWA H; TSUTA K; KIUCHI K; SENZAKI H; TANAKA K; HIOKI K; TSUBURA A (2001). Growth inhibitory effects of diallyl disulfide on human breast cancer cell lines. *Carcinogenesis*; 22(6):891-7.
87. NEEDLEMAN H. Lead poisoning. *Annual Review of biochemistry.* 2004, 55. 209 – 222.
88. O’GARA E.A., D.J. HILL and D.J. MASLIN. 2000. Activities of garlic oil, garlic powder and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2269-2273. American Society for Microbiology.
89. ORTIZ, R. MARTINEZ, Y.; Laboratorio de Análisis Instrumental. Universidad de los Andes. Facultad de ciencias. Departamento de Química. Prácticas de Electroanalítica. Disponible en Internet: [http://webdelprofesor.ula.ve/ciencias/ymartin/index\\_archivos/Guia%20de%20instrumental.pdf](http://webdelprofesor.ula.ve/ciencias/ymartin/index_archivos/Guia%20de%20instrumental.pdf)
90. PAYTON M; RIGGS K; SPIRO A; WEISS S; HU H. Relations of bone and blood lead to cognitive function: the VA normative aging study. *Neurotoxicol Teratol.* 1998; 20: 19 – 27.
91. PEBE G; VILLA H; ESCATE L; CERVANTES G. Niveles de plomo sanguíneo en recién nacidos de la Oroya, 2004 – 2005. *Rev. Perú Med Exp Salud Pública.* 2008; 25(4): 355 – 60.
92. PEDRAZA-CHAVERRI J; MALDONADO PD; MEDIN-CAMPOS ON; OLIVARES.CORICHI IM; GRANADOS.SILVESTRE M; HERNANDEZ-PRADO R; IBARRA-RUBIO ME (2000). Garlic ameliorates gentamicin

nephrotoxicity: relation to antioxidant enzymes. *Free Radic Biol Med*; 29(7):602-11.

93. PINTO JT; RIVLIN RS (2001). Antiproliferative effects of allium derivatives from garlic. *J Nutr*; 131(3s):1058s-60s.
94. RABINOWITZ, M. B.; WERTHERILL, G. V., Y KOPPLE, J. M.: Kinetic analysis of lead metabolism in healthy humans. *J. Clin, Invest.*, 58, 260, 1976.
95. RAHMY TR; HEMMAID KZ (2001). Prophylactic action of garlic on the histological and histochemical patterns of hepatic and gastric tissues in rats injected with a snake venom. *J Nat Toxins*; 10(2)137-65.
96. RAMIREZ AV; CAM J; MEDINA JM. Plomo sanguíneo en los habitantes de cuatro localidades peruanas. *Rev. Panamá Salud Pública*. 1997; 1(5): 344 – 48.
97. RENDON R; CERBON S; MALDONADO V; QUINTANAR E; CALDERON S. Vitamin – E reduces the oxidative damage on  $\delta$  – aminolevulinic dehydratase induced by lead intoxication in rat erythrocytes. *ScienceDirect – Toxicology in vitro*. 2007, 1121 – 1126.
98. Richard W. *Equilibrio y Análisis Químico*. Ed. México.140-141.
99. ROBERT V; MOUILLE B; MAYEUR C; MICHAUD M; BLACHIER F (2001). Effects of the garlic compound diallyl disulfide on the metabolism, adherence and cell cycle of HT-29 colon carcinoma cells: evidence of sensitive and resistant sub-populations. *Carcinogenesis*; 22(8):1155-61.
100. ROSS Z., E.A. O’GARA, D,J, HILL, H.V. SLEIGHTHOLME, and D.J. MASLIN. 2000. Antimicrobial Properties of garlic oil against human enteric bacteria: evaluation of Methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic power. *Applied and Environmental Microbiology*. Jan. 2001. p. 475-480. American Society for Microbiology.

101. SALINAS MENESES DELSY SANDRA. 1989. Efecto antifungico del *Allium sativum* L. (ajo). Universidad Católica de Santa María –Arequipa.
102. SENAPATI S; DEY S; DWIVEDI S; SWARUP D. Effects of garlic (*Allium sativum* L.) extract on tissue lead level in rats J. ethnopharmacol. 2001. 76: 229 – 232.
103. SENAPATI SK; DEY S; AWIVEDI SK: SWARUP D (2001). Effect of garlic (*Allium sativum* L.) extract on tissue lead level in rats. J Ethnopharmacol; 76(2)229-32.
104. SINA K; MAHDI B; SEYED R; VALIOLLAH M; MAHMOUND S; BITA D; OMID R; MOHAMMAD T. Comparison of therapeutic effect of garlic and D-Penicillamine in patients with chronic occupational lead poisoning. Basic & Clinical & toxicology. 2012, 110, 476 – 481.
105. SLOWING K; GANADO P; SANZ M; RUIZ E; TEJERINA T (2001). Study of garlic extracts and fractions on cholesterol plasma levels and vascular reactivity in cholesterol-fed rats. Nutr; 131(3s):994S-9S.
106. Somenath M. Department of Chemistry and Environmental Science New Jersey institute of Technology, “Sample preparation techniques in analytical chemistry” John Wiley & Sons, Inc., publication, Vol.N°162, Pag:227-245.
107. SOVOVA M; SOVA P; MRAZOVA A (2002). Pharmaceutical importance of *Allium sativum* L. 3. Antibacterial effects on *Helicobacter pylori*. Ceska Slov Farm; 51(4):168.
108. STEINER M; LI W (2001). Aged garlic extract, a modulator of cardiovascular risk factors: a dose-finding study on the effects of AGE on platelet functions. J Nurt; 131(3s):980S-4S.

109. SUMIOKA I; MATSURA T; YAMADA K (2001). Therapeutic effect of S-allylmercaptocysteine on acetaminophen-induced liver injury in mice. *Eur J Pharmacol*; 433(2-3):177-85.
110. TOSACANO CD; GUILLARTE TR. Lead neurotoxicity: from exposure to molecular effects. *Brain res brain*. 2005; 49: 529 – 54.
111. TSAO S; YIN M (2001). In vitro activity of garlic oil and four diallyl sulphides against antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumonia*. *J Antimicrobial Chemother*; 47(5):665-70.
112. TSAO SM; YIN MC (2001). In-vitro antimicrobial activity of four diallyl sulphides occurring naturally in garlic and Chinese leek oils. *J Med Microbiol*; 50(7):646-9.
113. UKWUEMEKA R; MAGDALENE I; IMARIA A; JOSHUA O; DAMIAN C; BUKOLA O; DANIEL U; MOSES O. Comparative analysis on the effect of *licopersicon esculentum* (tomato) in reducing cadmium, mercury and lead accumulation in liver. *Food and Chemical Toxicology*. 2012; 50: 2070 – 2073. Disponible en internet [www.com/locate/foodchemtox](http://www.com/locate/foodchemtox) .
114. VEENA S; ARTI S; LEENA K. The effect or oral administration of *Allium sativum* extracts on lead nitrate induced toxicity in male mice. *Food and Chemical Toxicology*. 2010; 48: 928 - 936. Disponible en internet [www.com/locate/foodchemtox](http://www.com/locate/foodchemtox).
115. VEGA D; SALINAS P; GUTIERREZ C; PONCE C. Lead level and cognitive abilities in Peruvian children. *Rev Bras Psiquiatr*. 2006; 28 (1): 33 – 39.
116. VEGA J; DE COLL J; KATEKARU D; LERMO J; ESCOBAR J; DIAZ M. Intoxicación plúmbica crónica y alteraciones del crecimiento y desarrollo cognitivo – emocional en niños. *An Fac Med (Lima)*. 2003; 64 (2): 94 – 100.

117. VILLANUEVA SALAS JOSE A. 1989. Principios activos, propiedades medicinales y factibilidad de uso del *Allium sativum* L. (ajo) como agente terapéutico. Universidad Católica de Santa María-Arequipa.
118. VILLANUEVA, J., PACHECO L. 1988. Valoración química y determinación de la actividad antibacteriana “in vitro” del 2-propentiosulfonato de alilo: ALICINA del *Allium sativum* L. (ajo) frente a bacterias aisladas de infecciones urinarias en paciente ambulatorios- Hospital central del Sur – Área I. Universidad Católica de Santa María-Arequipa.
119. VILLEDA H; BARROSO R; MENDEZ M; NAVA C; HUERTA R; RIOS C. Enhanced barín regional lipid peroxidation in developing rats exposed to low level lead acetate. *Brain Res Bull.* 2011; 55 (2): 247 – 51.
120. WILSON MA; JOHNSTON MV, GOLDSTEIN GW; BLUE M. Neonatal lead exposure impairs development of rodent barrel field cortex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97: 5540 – 5.
121. WU CC; SHEEN LY; CHEN HW; KUO WW; TSAI SJ; LII CK (2002). Differential effects of garlic oil and its major organosulfur component on the hepatic detoxification system in rats. *Agric Food Chem;* 50(2):378-83.
122. YANG CS; CHHABRA SK; HONG JY; SMITH TJ (2001). Mechanisms of inhibition of chemical toxicity and carcinogenesis by diallyl sulfide (DAS) and related compound from garlic. *J Nutr;* 131(3s):1041S-5S.
123. YEH YY; LIU L (2001).Cholesterol-lowering effect of garlic extracts and organosulfur compounds: human and animal studies. *J Nutr;* 131(3s):989S-93S.
124. ZHANG XH; LOWE D; GILES P; FELL S; CONNOCK MJ; MASLIN DJ(2001). Gender may affect the action of garlic oil on plasma cholesterol and glucose levels of normal subjects. *J Nutr;* 131(5):1471-8.

125. ZIAEI S; HANTOSHZADEH S; REZASOLTANI P; LAMYIAN M (2001). The effect of garlic tablet on plasma lipids and platelet aggregation in nulliparous pregnant at high risk of preeclampsia. Eur J Obstet Gynecologic reprod Biol; 99(2):201-6.
126. Z ZGISBERT CALABUIG, Juan Antonio; E. VILLANUEVA Cañadas. Medicina Legal y Toxicología. Sexta edición. España: 2001: p. 835 – 850.





## ANEXOS

### Anexo 1: Extracción de muestras sanguíneas.



### Anexo 2: Administración vía oral.



**Anexo 3: Pesos de los animales de experimentación.**

GRUPOS DE ESTUDIO	MARCA	AMBIENTACION				TRATAMIENTO							
		Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6	Semana 7	Semana 8				
CONTROL NEGATIVO	CA	273.5	281.0	277.0	273.5	275.0	274.5	276.0	275.0	274.5	276.0	275.0	
	PAI	270.5	273.5	272.5	273.5	275.5	271.5	273.5	275.5	271.5	269.5	273.5	
	PAD-PAI	281.5	284.0	279.0	275.0	273.5	276.0	274.5	273.5	274.5	274.5	275.0	
	PPD	279.0	280.0	282.0	280.0	281.0	279.0	283.5	282.5	283.5	283.5	282.5	
	PPI	270.5	278.0	275.5	274.0	276.5	273.5	271.5	274.5	271.5	271.5	274.5	
CONTROL POSITIVO	PPD-PPI	271.5	279.0	281.0	277.0	276.0	275.5	274.5	276.0	275.5	274.5	275.5	
	CA	273.5	269.0	273.0	276.0	271.5	273.5	271.5	273.5	273.5	271.5	272.0	
	LO	279.0	276.5	278.0	279.0	270.0	275.0	274.0	276.0	275.0	274.0	276.0	
	CO	273.0	273.0	273.0	273.5	271.5	273.0	273.0	273.0	273.0	273.0	279.5	
	PAD	273.5	279.0	275.5	270.0	268.5	273.0	275.0	274.0	268.5	275.0	274.0	
PREVENTIVO	PAI	273.5	279.0	273.0	273.0	262.5	275.0	271.5	262.5	275.0	271.5	273.0	
	PAD-PAI	279.0	275.0	273.0	276.0	264.5	273.0	274.0	264.5	273.0	274.0	275.0	
	CA-LO	279.0	282.0	279.0	270.0	271.5	272.0	271.5	270.0	272.0	271.5	265.0	
	CA-LO-CO	271.0	279.5	277.0	269.5	270.0	269.0	267.0	270.0	269.0	267.0	264.5	
	LO	270.5	278.0	274.5	270.0	270.0	271.5	270.0	270.0	270.0	270.0	260.5	
CURATIVO	CO-PAI	270.0	273.5	276.0	268.0	271.5	272.0	270.5	271.5	272.0	270.5	267.0	
	PPI	272.5	279.0	274.5	267.0	269.0	268.0	266.5	269.0	268.0	266.5	266.5	
	PPI-PPD	269.0	273.0	275.0	269.5	267.0	268.5	266.0	267.0	268.5	266.0	260.0	
	CA	273.5	278.0	276.0	273.0	270.0	269.0	270.5	270.0	269.0	270.5	265.5	
	CA-CO	278.0	273.5	279.5	273.5	269.5	268.0	270.0	268.0	269.5	270.0	268.0	
CURATIVO	LO	273.0	279.0	273.0	270.0	271.5	272.0	268.0	271.5	272.0	268.0	262.0	
	CO	275.0	276.0	279.5	269.0	272.0	273.5	269.0	272.0	273.5	269.0	266.5	
	PPD	279.5	271.5	273.0	271.5	273.0	272.0	268.5	273.0	272.0	268.5	263.0	
	PPI	273.0	276.0	278.0	276.0	276.5	278.0	276.0	276.5	278.0	276.0	269.5	

**Anexo 4: Rack de tubos de cuarzo y digestor UV.**



a)



b)



c)

*Cambios en la muestra durante el proceso de digestión UV; a) muestra más agua; b) muestra con peróxido de hidrógeno y ácido nítrico y c) muestras sanguíneas 1<sup>ra</sup> hora de después de la digestión.*

**Anexo 5: Rack de vaso del digestor a presión y horno microondas.**



*a)*



*b)*



*c)*

*a) Proceso de pre digestión; b) bombas de digestión; c) horno microondas*

**Anexo 6: Parámetros voltamétricos para la determinación de sangre y órganos.**

**Edit working method parameters**

Determination | **Voltammetric** | Substances | Calculations | Documentation

Voltammetric analysis differential pulse

Initial purge time (s) :	300	Sweep	Hydrodynamic (measurement) :	<input type="checkbox"/>	
Conditioning cycles		Start potential (V) :	-0.74	End potential (V) :	-0.32
Start potential (V) :	0	Pulse amplitude (V) :	0.05	Pulse time (s) :	0.04
End potential (V) :	0	Voltage step (V) :	0.007935	Voltage step time (s) :	0.4
No. of cycles :	0	Sweep rate (V/s) :	0.0198	Cell off after measurement :	<input checked="" type="checkbox"/>
Pretreatment		Stand-by potential (V) :	0		
Cleaning potential (V) :	0				
Cleaning time (s) :	0				
Deposition potential (V) :	-0.9				
Deposition time (s) :	60				
Equilibration time (s) :	10				



Anexo 7: Concentraciones finales de plomo en muestras sanguíneas.

GRUPOS DE ESTUDIO	MARCA	DÍA 1		DÍA 5		DÍA 10		DÍA 15		DÍA 20		DÍA 25		DÍA 30		DÍA 35		DÍA 40	
		CF mg/L	DS ±	CF mg/L	DS ±	CF mg/L	DS ±	CF mg/L	DS ±	CF mg/L	DS ±	CF mg/L	DS ±	CF mg/L	DS ±	CF mg/L	DS ±	CF mg/L	DS ±
CONTROL NEGATIVO	CA	0.847	0.035	0.808	0.030	0.859	0.040	0.907	0.032	0.835	0.021	0.823	0.050	0.829	0.024	0.769	0.017	0.748	0.023
	PAI	1.017	0.027	0.937	0.043	0.937	0.020	0.953	0.026	0.951	0.070	0.922	0.020	0.950	0.016	0.945	0.028	0.989	0.040
	PAD-PAI	1.035	0.045	0.984	0.026	0.974	0.052	0.942	0.026	0.957	0.048	1.009	0.027	0.961	0.046	0.952	0.026	1.059	0.018
	PPD	0.908	0.032	0.937	0.071	0.878	0.029	0.950	0.018	0.894	0.026	0.797	0.009	0.834	0.030	0.786	0.028	0.769	0.021
	PPI	0.954	0.028	0.937	0.032	0.903	0.032	0.910	0.018	0.941	0.021	0.929	0.018	0.904	0.034	0.941	0.021	0.885	0.021
	PPD-PPI	0.856	0.041	0.848	0.014	0.852	0.018	0.808	0.043	0.875	0.028	0.851	0.030	0.869	0.053	0.835	0.026	0.856	0.041
	promedio	<b>0.936</b>	<b>0.035</b>	<b>0.908</b>	<b>0.036</b>	<b>0.901</b>	<b>0.032</b>	<b>0.912</b>	<b>0.027</b>	<b>0.908</b>	<b>0.035</b>	<b>0.888</b>	<b>0.026</b>	<b>0.891</b>	<b>0.034</b>	<b>0.871</b>	<b>0.024</b>	<b>0.884</b>	<b>0.027</b>
	PROM. - DS	<b>0.936</b>	<b>0.080</b>	<b>0.908</b>	<b>0.066</b>	<b>0.901</b>	<b>0.048</b>	<b>0.912</b>	<b>0.054</b>	<b>0.908</b>	<b>0.049</b>	<b>0.888</b>	<b>0.079</b>	<b>0.891</b>	<b>0.057</b>	<b>0.871</b>	<b>0.085</b>	<b>0.884</b>	<b>0.122</b>
	CA	0.757	0.022	0.757	0.022	2.107	0.118	1.650	0.078	1.356	0.165	1.277	0.060	1.141	0.048	1.133	0.097	1.146	0.042
	LO	0.774	0.027	0.774	0.027	3.870	0.127	3.524	0.191	2.366	0.352	1.822	0.041	1.769	0.048	1.626	0.023	1.517	0.029
CONTROL POSITIVO	CO	0.969	0.026	0.969	0.026	2.662	0.088	1.912	0.077	1.612	0.191	1.562	0.043	1.450	0.022	1.349	0.026	1.171	0.032
	PAD	0.931	0.021	0.931	0.021	2.478	0.099	2.350	0.071	1.860	0.235	1.743	0.080	1.461	0.066	1.425	0.014	1.350	0.039
	PAI	0.870	0.032	0.870	0.032	2.639	0.101	2.162	0.067	1.861	0.216	1.837	0.048	1.409	0.058	1.158	0.018	1.160	0.045
	PAD-PAI	0.829	0.022	0.829	0.022	2.665	0.104	2.133	0.062	1.861	0.213	1.409	0.055	1.370	0.028	1.350	0.029	1.342	0.042
	promedio	<b>0.855</b>	<b>0.025</b>	<b>0.855</b>	<b>0.085</b>	<b>2.737</b>	<b>0.106</b>	<b>2.288</b>	<b>0.091</b>	<b>1.819</b>	<b>0.229</b>	<b>1.608</b>	<b>0.054</b>	<b>1.433</b>	<b>0.045</b>	<b>1.340</b>	<b>0.034</b>	<b>1.281</b>	<b>0.038</b>
	PROM. - DS	<b>0.855</b>	<b>0.085</b>	<b>0.855</b>	<b>0.085</b>	<b>2.737</b>	<b>0.594</b>	<b>2.288</b>	<b>0.651</b>	<b>1.819</b>	<b>0.335</b>	<b>1.608</b>	<b>0.231</b>	<b>1.433</b>	<b>0.202</b>	<b>1.340</b>	<b>0.182</b>	<b>1.281</b>	<b>0.148</b>
	CA-LO	1.012	0.041	0.263	0.027	3.608	0.136	1.100	0.063	0.581	0.020	0.426	0.022	0.322	0.012	0.200	0.010	0.230	0.017
	CA-LO-CO	1.046	0.028	0.335	0.026	3.471	0.136	1.198	0.046	0.516	0.029	0.443	0.019	0.264	0.021	0.102	0.029	0.214	0.030
	LO	0.857	0.021	0.266	0.016	4.018	0.081	1.072	0.035	0.656	0.024	0.540	0.019	0.231	0.011	0.116	0.019	0.157	0.030
	CO-PAI	0.950	0.032	0.223	0.020	2.414	0.122	1.135	0.057	0.869	0.047	0.421	0.021	0.252	0.019	0.224	0.014	0.210	0.010
PREVENTIVO	PPI	0.891	0.028	0.268	0.016	2.609	0.167	0.808	0.053	0.488	0.021	0.304	0.019	0.263	0.009	0.172	0.030	0.219	0.015
	PPI-PPD	0.862	0.036	0.305	0.019	4.855	0.071	0.829	0.037	0.792	0.045	0.519	0.050	0.322	0.018	0.123	0.028	0.121	0.018
	promedio	<b>0.936</b>	<b>0.031</b>	<b>0.277</b>	<b>0.021</b>	<b>3.496</b>	<b>0.119</b>	<b>1.023</b>	<b>0.048</b>	<b>0.650</b>	<b>0.031</b>	<b>0.442</b>	<b>0.025</b>	<b>0.276</b>	<b>0.015</b>	<b>0.156</b>	<b>0.022</b>	<b>0.192</b>	<b>0.020</b>
	PROM. - DS	<b>0.936</b>	<b>0.080</b>	<b>0.277</b>	<b>0.039</b>	<b>3.496</b>	<b>0.904</b>	<b>1.023</b>	<b>0.165</b>	<b>0.650</b>	<b>0.153</b>	<b>0.442</b>	<b>0.084</b>	<b>0.276</b>	<b>0.038</b>	<b>0.156</b>	<b>0.050</b>	<b>0.192</b>	<b>0.043</b>
	CA	0.979	0.059	0.979	0.059	2.225	0.083	1.153	0.063	0.979	0.026	0.669	0.040	0.581	0.030	0.399	0.017	0.357	0.020
	CA-CO	0.861	0.049	0.861	0.049	3.187	0.201	1.211	0.048	0.559	0.026	0.465	0.030	0.413	0.022	0.344	0.012	0.307	0.019
	LO	0.873	0.022	0.873	0.022	2.697	0.068	1.230	0.042	0.555	0.039	0.390	0.018	0.333	0.024	0.316	0.018	0.301	0.020
	CO	0.951	0.029	0.951	0.029	2.655	0.156	0.836	0.032	0.468	0.021	0.363	0.031	0.339	0.016	0.189	0.015	0.187	0.031
	PPD	0.974	0.026	0.974	0.026	2.245	0.182	0.898	0.056	0.563	0.019	0.529	0.029	0.377	0.028	0.344	0.015	0.304	0.026
	PPI	0.826	0.026	0.826	0.026	2.954	0.102	0.943	0.035	0.619	0.029	0.300	0.014	0.253	0.019	0.262	0.019	0.255	0.026
PROM. - DS	<b>0.911</b>	<b>0.035</b>	<b>0.911</b>	<b>0.035</b>	<b>2.661</b>	<b>0.132</b>	<b>1.045</b>	<b>0.046</b>	<b>0.624</b>	<b>0.027</b>	<b>0.452</b>	<b>0.027</b>	<b>0.383</b>	<b>0.023</b>	<b>0.309</b>	<b>0.016</b>	<b>0.285</b>	<b>0.024</b>	
PROM. - DS	<b>0.911</b>	<b>0.065</b>	<b>0.911</b>	<b>0.065</b>	<b>2.661</b>	<b>0.381</b>	<b>1.045</b>	<b>0.173</b>	<b>0.624</b>	<b>0.181</b>	<b>0.452</b>	<b>0.133</b>	<b>0.383</b>	<b>0.111</b>	<b>0.309</b>	<b>0.074</b>	<b>0.285</b>	<b>0.058</b>	
CURATIVO	CA	0.847	0.035	0.808	0.030	0.859	0.040	0.907	0.032	0.835	0.021	0.823	0.050	0.829	0.024	0.769	0.017	0.748	0.023
	PAI	1.017	0.027	0.937	0.043	0.937	0.020	0.953	0.026	0.951	0.070	0.922	0.020	0.950	0.016	0.945	0.028	0.989	0.040
	PAD-PAI	1.035	0.045	0.984	0.026	0.974	0.052	0.942	0.026	0.957	0.048	1.009	0.027	0.961	0.046	0.952	0.026	1.059	0.018
	PPD	0.908	0.032	0.937	0.071	0.878	0.029	0.950	0.018	0.894	0.026	0.797	0.009	0.834	0.030	0.786	0.028	0.769	0.021
	PPI	0.954	0.028	0.937	0.032	0.903	0.032	0.910	0.018	0.941	0.021	0.929	0.018	0.904	0.034	0.941	0.021	0.885	0.021
	PPD-PPI	0.856	0.041	0.848	0.014	0.852	0.018	0.808	0.043	0.875	0.028	0.851	0.030	0.869	0.053	0.835	0.026	0.856	0.041
	promedio	<b>0.936</b>	<b>0.035</b>	<b>0.908</b>	<b>0.036</b>	<b>0.901</b>	<b>0.032</b>	<b>0.912</b>	<b>0.027</b>	<b>0.908</b>	<b>0.035</b>	<b>0.888</b>	<b>0.026</b>	<b>0.891</b>	<b>0.034</b>	<b>0.871</b>	<b>0.024</b>	<b>0.884</b>	<b>0.027</b>
	PROM. - DS	<b>0.936</b>	<b>0.080</b>	<b>0.908</b>	<b>0.066</b>	<b>0.901</b>	<b>0.048</b>	<b>0.912</b>	<b>0.054</b>	<b>0.908</b>	<b>0.049</b>	<b>0.888</b>	<b>0.079</b>	<b>0.891</b>	<b>0.057</b>	<b>0.871</b>	<b>0.085</b>	<b>0.884</b>	<b>0.122</b>
	CA	0.757	0.022	0.757	0.022	2.107	0.118	1.650	0.078	1.356	0.165	1.277	0.060	1.141	0.048	1.133	0.097	1.146	0.042
	LO	0.774	0.027	0.774	0.027	3.870	0.127	3.524	0.191	2.366	0.352	1.822	0.041	1.769	0.048	1.626	0.023	1.517	0.029

**Anexo 8: Extracción y almacenamiento de órganos.**



Anexo 9: Peso en gramos de los órganos después de la extracción.

GRUPOS DE ESTUDIO	ORGANOS			
		Hígado	Bazo	Riñón
CONTROL POSITIVO	CA	7.874	0.441	1.700
	LO	5.624	0.300	1.313
	CO	7.462	0.398	1.791
	PAD	7.520	0.395	1.656
	PAI	6.222	0.347	1.315
	PAD-I	6.704	0.396	1.357
<b>PROM</b>		<b>6.901</b>	<b>0.380</b>	<b>1.522</b>
<b>DS</b>		<b>0.869</b>	<b>0.049</b>	<b>0.217</b>
CONTROL NEGATIVO	CA	4.851	0.345	1.3499
	PAI	4.730	0.3556	1.2205
	PAD-I	6.024	0.3728	1.6155
	PPD	6.920	0.5082	1.9755
	PPI	6.436	0.3384	1.7437
	PPD-I	8.777	0.4665	2.024
<b>PROM</b>		<b>6.290</b>	<b>0.398</b>	<b>1.655</b>
<b>DS</b>		<b>1.495</b>	<b>0.072</b>	<b>0.326</b>
PREVENTIVO	CA-LO	5.278	0.401	1.401
	CA-LO-CO	7.449	0.459	1.921
	LO	5.951	0.305	1.492
	CO-PAI	8.423	0.516	2.222
	PPI	5.558	0.446	1.420
	PPD-I	5.684	0.383	1.328
<b>PROM</b>		<b>6.390</b>	<b>0.418</b>	<b>1.631</b>
<b>DS</b>		<b>1.255</b>	<b>0.073</b>	<b>0.359</b>
CURATIVO	CA	6.951	0.503	1.635
	CA-CO	6.783	0.377	1.593
	LOMO	6.997	0.523	1.423
	COLA	6.439	0.405	1.684
	PPD	6.535	0.481	1.497
	PPI	4.610	0.290	1.230
<b>PROM</b>		<b>6.386</b>	<b>0.430</b>	<b>1.510</b>
<b>DS</b>		<b>0.898</b>	<b>0.089</b>	<b>0.167</b>

Anexo 10: Concentraciones finales de plomo en hígado bazo y riñón.

GRUPOS DE ESTUDIO	MARCA	ORGANOS					
		BAZO		RIÑÓN		HIGADO	
		CF µg/g	DSF ±	CF µg/g	DSF ±	CF µg/g	DSF ±
CONTROL NEGATIVO	CA	0.907	0.091	1.535	0.076	1.780	0.075
	PAI	0.546	0.074	1.344	0.190	0.009	0.003
	PAD-PAI	0.655	0.067	0.010	0.003	0.911	0.154
	PPD	1.363	0.137	0.393	0.192	0.008	0.002
	PPI	0.780	0.184	0.012	0.004	0.009	0.003
	PPD-PPI	0.325	0.098	2.051	0.267	0.011	0.003
CONTROL POSITIVO	CA	3.959	0.182	2.273	0.088	5.160	0.283
	LO	1.431	0.201	2.183	0.130	3.921	0.123
	CO	2.195	0.085	5.440	0.181	5.285	0.600
	PAD	1.426	0.143	0.733	0.074	6.364	0.372
	PAI	2.136	0.125	0.260	0.154	3.959	0.074
	PAD-PAI	0.752	0.060	2.502	0.138	5.492	0.117
PREVENTIVO	CA-LO	2.506	0.109	2.239	0.099	0.925	0.063
	CA-LO-CO	0.662	0.086	2.293	0.084	0.637	0.102
	LO	0.868	0.065	0.010	0.003	0.013	0.004
	CO-PAI	1.009	0.068	2.980	0.160	0.011	0.003
	PPI	0.396	0.086	3.764	0.333	2.339	0.145
	PPI-PPD	0.661	0.056	2.784	0.114	0.926	0.058
CURATIVO	CA	0.713	0.051	2.905	0.138	0.008	0.002
	CA-CO	0.862	0.086	3.037	0.083	2.329	0.088
	LO	0.630	0.115	0.009	0.003	0.912	0.066
	CO	0.614	0.053	2.370	0.104	2.115	0.074
	PPD	1.831	0.159	3.417	0.136	0.013	0.004
	PPI	1.090	0.073	3.738	0.288	0.012	0.003