

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

ESCUELA DE POST GRADO

MAESTRÍA EN QUÍMICA DEL MEDIO AMBIENTE



“CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA Y LIBERACION DE ALUMINIO, *In vitro* - *In vivo*, DE LA ARCILLA (CHACO) – 2015”

TESIS PRESENTADA POR LA
BACHILLER:

Celia Choquenaira Quispe

PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO
EN QUÍMICA DEL MEDIO AMBIENTE

ASESOR:

Dr. Gonzalo Dávila Del Carpio

AREQUIPA – PERÚ

2016

AGRADECIMIENTOS

Dios, tú eres el principal actor de esta obra tan maravillosa, todo te lo debo a ti. El presente trabajo de tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, brindándome su apoyo incondicional, acompañándome en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad. A mis padres y mis hermanos porque a pesar de la carga laboral, estudios y la distancia siempre estuvieron atentos al desarrollo del presente trabajo. Mi especial agradecimiento a la persona que en los momentos difíciles supo apoyarme y brindarme su ayuda incondicional, porque a pesar de los inconvenientes jamás dejó que decline y en los momentos de felicidad hizo hasta lo imposible para que siga sonriendo, gracias por los detalles y el apoyo durante este periodo, te amo Tom (Ever). Quiero agradecer al Doctor José A. Villanueva Salas, por todo el tiempo compartido y porque siempre estuvo en el momento preciso en el desarrollo de las investigaciones, gracias por la paciencia, las enseñanzas y la inspiración hacia el desarrollo personal y profesional. Agradezco al Doctor Gonzalo Dávila del Carpio, por haber sido el promotor principal para la ejecución de la maestría, por el asesoramiento de la tesis y el tiempo brindado. Finalmente mi especial agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación tecnológica (CONCYTEC) por financiar la ejecución y desarrollo de la Maestría en Química del Medio Ambiente en convenio con la Universidad Católica de Santa María.

Dios gracias por la oportunidad brindada.

INDICE

	Pág.
CONTENIDO	
RESUMEN	1
ABSTRACT	3

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN	5
OBJETIVOS	6
HIPÓTESIS	7
PLANTEAMIENTO TEÓRICO	8
1. Problema de investigación	8
1.1. Enunciado del problema	8
1.2. Descripción del problema	8
1.3. Justificación del problema	9

CAPÍTULO II

1. MARCO CONCEPTUAL	10
1.1. Geomedicina	10
1.2. Arcilla	11
1.3. Ensayos <i>in vitro</i>	14
1.4. Ensayos <i>in vivo</i>	15
1.5. ICP-OES	15
2. ANÁLISIS DE ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS	16

CAPÍTULO III

1. PLANTEAMIENTO OPERACIONAL	19
1.1. Instrumentos, materiales y reactivos	19
1.2. Validación del método en el ICP-OES	20
1.3. Metodología	22
Obtención y caracterización de la arcilla	22
Ensayos <i>in vitro</i> – perfil de disolución	23
Ensayos <i>in vivo</i>	26
Obtención y tratamiento de muestras biológicas	29
Cálculos y análisis estadísticos	30
2. CAMPO DE VERIFICACIÓN	30

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES	32
Resultados – ensayos <i>in vitro</i>	40
Resultados – ensayos <i>in vivo</i>	61
CONCLUSIONES	83
SUGERENCIAS	84
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXOS	93

RESUMEN

Geofagia, la ingestión intencional y repetida de arcillas, suelos, u otros materiales geológicos se ha practicado durante siglos en todo el mundo con fines terapéuticos y alimenticios. En nuestro país la arcilla “chaco” es utilizada desde tiempos precolombinos en forma de suspensión para tratar síntomas de enfermedades acido-pépticas. En tal sentido, en el presente trabajo de investigación, se realizó un análisis fisicoquímico de la arcilla “chaco” para posteriormente determinar la liberación de aluminio de la arcilla en diferentes medios de disolución (ensayo *in vitro*) y finalmente evaluar la disponibilidad de este elemento en animales de experimentación (ensayo *in vivo*). La cantidad de aluminio liberado en los ensayos *in vitro* e *in vivo* fue determinada en el espectrómetro de emisión óptica con plasma inductivamente acoplado (ICP-OES).

Los resultados *in vitro* evidencian una relación directamente proporcional entre la cantidad de arcilla y la liberación de aluminio, la cantidad de aluminio *in vitro* depende del tipo de medio de disolución observándose una mayor liberación de aluminio (3.057 ± 0.019 mg/L) en jugo intestinal simulado y una menor liberación (1.533 ± 0.019) a pH 1.2.

Los resultados *in vivo* determinan que la administración de Dosis 1 (Do1) (50mg/kg) y Dosis 2 (Do2) (500 mg/kg), producen un incremento exponencial de la concentración de aluminio plasmático en las primeras 6 horas alcanzando

concentraciones máximas de 18.644 ± 0.976 y 21.406 ± 0.968 mg/L respectivamente, a partir de las 8 horas, se evidencia el decaimiento de ambas líneas de tendencia lo cual indica que la concentración de aluminio en sangre disminuye en función del tiempo. Además, se observa que a mayor dosis de arcilla administrada, mayor es la cantidad de aluminio liberado y por ende mayor es la cantidad detectada en sangre. Así mismo, después de 24 horas de administrada la arcilla, las cantidades de aluminio disminuyen a valores cercanos a los basales

En relación a las muestras de orina, la concentración de aluminio a las 24 horas, cuando se ensaya con la Do1, es de 8.351 ± 0.298 mg/L, el cual comparada con la máxima concentración de aluminio en sangre de este mismo grupos, representa el 44.79%, este valor representa el porcentaje de aluminio excretado vía urinaria en las primeras 24 horas. En relación al grupo Do2, la máxima concentración de aluminio excretado vía renal es de 11.257 ± 0.358 mg/L que representa un porcentaje de eliminación del 52.59% en las primeras 24 horas.

El ingesta de arcilla “chaco” y su exposición a cambios de pH dentro del tracto gastrointestinal produce la liberación y absorción del aluminio, pudiendo ocasionar efectos negativos en la salud.

ABSTRACT

Geophagia, intentional and repeated clays, soil, or other geological materials ingestion has been practiced for centuries worldwide for therapeutic and nutritional purposes. In our country the clay "chaco" is used since pre-Columbian times as a suspension to treat symptoms of acid-peptic diseases. In this sense, the present research, a physicochemical analysis of clay "chaco" to subsequently determine the release of aluminum from clay in different dissolution media (in vitro assay) was performed and finally evaluate the availability of this element in experimental animals (in vivo assay). The amount of aluminum released in vitro and in vivo assays was determined in the optical emission spectrometer with inductively coupled plasma (ICP-OES).

The in vitro results show a direct relationship between the amount of clay and release of aluminum, the amount of aluminum in vitro, dependent dissolution medium and observed, an increased release of aluminum (3.057 ± 0.019 mg/L) in simulated intestinal juice and release less (1.533 ± 0.019) at pH 1.2.

The in vivo results determine that the administration of doses 1 (Do1) (50 mg/kg) and doses 2 (Do2) (500 mg/kg), produce an exponential increase in the concentration of aluminum in the first 6 hours with peak concentrations of $18,644 \pm 0,976$ and $21,406 \pm 0.968$ mg/L respectively, after 8 hours, the decay of the two trend lines indicating that

the aluminum concentration in blood decreases with time is evident. It is further noted that the higher the dose administered clay, the greater the amount of aluminum released and therefore the greater is the amount detected in blood. Also, after 24 hours of administration clay, aluminum amounts decrease to values close to baseline

Concerning the urine samples, the aluminum concentration at 24 hours, when tested with Do 1, is 8.351 ± 0.298 mg/L, which compared to the maximum concentration of aluminum in blood of the same group, It represents 44.79%, this value represents the percentage of aluminum excreted via urine within 24 hours. Relative to group Do2, the maximum concentration of aluminum excreted renally is 11.257 ± 0.358 mg/L representing a percentage of 52.59% removal within 24 hours.

The intake of clay "chaco" and its exposure to changes in pH within the gastrointestinal tract causes the release and absorption of aluminum can cause adverse health effects.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

El consumo de arcillas por humanos se inició hace más de 500 años y estuvo relacionado con la domesticación de papas nativas las cuales contienen glucoalcaloides (solaninas) que irritan el tubo digestivo en humanos y animales. En la región Puno, las personas del altiplano y también los loros de Tambopata aprendieron con la experiencia que sus problemas gastrointestinales podían aliviarse con el consumo de arcillas.

En el altiplano peruano-boliviano existen varios yacimientos de arcillas comestibles de las cuales los principales están ubicados en Ácora, Asillo, Azángaro y Tiquillaca en el Perú; Achocalla, Mocomoco y Oruro en Bolivia. Se cree que estas arcillas están compuestas principalmente por minerales como la montmorillonita, caolinita, illita y cuarzo.

En la actualidad estas arcillas son consumidas por los pobladores rurales con frecuencia al finalizar la etapa de cosecha de papas. Es importante mencionar que estas arcillas naturales se comercializan en las ferias y mercados de las ciudades principales de la región sur de nuestro país.

OBJETIVOS

Objetivo general

- a) Caracterizar fisicoquímicamente la arcilla comestible “chaco” y la liberación de aluminio en ensayos *in vitro* - *in vivo*.

Objetivos específicos

- a) Caracterizar fisicoquímicamente la arcilla “chaco”.
- b) Estandarizar el método para la determinación de aluminio en ICP-OES.
- c) Establecer las cinéticas de liberación del aluminio en diferentes medios de disolución.
- d) Determinar el efecto de la administración de la arcilla “chaco” sobre los niveles de aluminio en sangre y orina en animales de experimentación.

HIPÓTESIS

“Dado que el chaco es una arcilla compuesta principalmente por aluminio y silicio, capaces de adsorber elementos catiónicos en forma natural y este es consumido tradicionalmente por las poblaciones altiplánicas como parte de su dieta y con fines terapéuticos, es probable que al ser sometida a pH fisiológico pueda liberar elementos traza tóxicos perjudiciales para la salud”.

PLANTEAMIENTO TEÓRICO

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Enunciado del problema

Caracterización fisicoquímica y liberación de aluminio, in vitro - in vivo, de la arcilla (chaco).

1.2. Descripción del problema

El “chaco” (denominación en lengua quechua) o “passa” (lengua aymara) es una arcilla utilizada desde tiempos precolombinos en forma de suspensión para tratar los síntomas de las enfermedades ácido-pépticas y como parte de la dieta nutricional. Por otro lado, el uso de arcilla para fines médicos ha incrementado recientemente por el creciente éxito de los recursos naturales con fines terapéuticos. Sin embargo, la arcilla por su estructura fisicoquímica, alta capacidad de intercambio de iones y una elevada área específica, tiene una gran capacidad de adsorción de elementos trazas tóxicos por lo que el consumo de la arcilla y su subsecuente exposición a cambio de pH propios del tracto gastrointestinal, podría liberar elementos propios de su estructura (aluminio) y/o elementos traza tóxicos pudiendo ocasionar problemas en la salud.

Tipo y nivel de investigación: experimental, prospectivo y longitudinal

Análisis u operacionalización de variables

VARIABLES	INDICADORES
INDEPENDIENTE	
<ul style="list-style-type: none">• Caracterización fisicoquímica• pH y temperatura del medio.• pH estomacal e intestinal	<ul style="list-style-type: none">• Composición porcentual de elementos tóxicos• Unidades de pH y °C.• Concentración de aluminio liberado por la arcilla.

DEPENDIENTE	<ul style="list-style-type: none"> • Cantidad de elementos traza liberados por la arcilla • Cinética de liberación • Biodisponibilidad de elementos traza liberados por la arcilla 	<ul style="list-style-type: none"> • Concentración en ppm en el medio de prueba • Cantidad de aluminio liberado en el medio por unidad de tiempo • Concentración de aluminio en sangre
-------------	---	---

1.3. Justificación del problema

Las razones de la ingesta de arcilla “chaco” no están debidamente justificadas, sin embargo; las influencias tradicionales, psicológicas, medicinales, culturales y religiosas son relevantes en las costumbres geofágicas.

La arcilla debido a su estructura (silicatos de aluminio) y composición podría acumular y/o liberar elementos tóxicos para la salud, además esto se agrava si se tiene en cuenta que en nuestro país el hábito geofágico como alimento o con fines terapéuticos se practica en zonas rurales de la región sur sin ningún tipo de control de calidad o información al consumidor.

Bajo este esquema la ingesta en forma sistemática del chaco podría conllevar a efectos negativos e irreversibles en la salud y que más halla de remediar algún tipo de malestar, podría provocar intoxicaciones por metales como el aluminio y manganeso, los cuales se caracterizan por ser elementos altamente neurotóxicos (degeneración neuronal, Alzheimer, disfunción motora, problemas de aprendizaje y memoria) además, de producir problemas renales.

En consecuencia la cuantificación de elementos traza liberados por la arcilla sometidas a cambios de pH fisiológico mediante ensayos de disolución y su posterior estudio de biodisponibilidad en animales de experimentación es importante para evaluar la seguridad de la práctica geofágica en nuestro país.

CAPITULO II

MARCO CONCEPTUAL

Desde la prehistoria, los seres humanos han utilizado arcillas con fines terapéuticos.¹⁻³ Hay indicios de que el *Homo erectus* and *Homo neanderthalensis* usaron mezcla de ocre con agua y diferentes tipos de lodos para curar heridas, calmar irritaciones, como un método de limpieza de la piel, etc.¹

La geofagia, se produce en todo el mundo en una variedad de grupos étnicos, religiosos y sociales y se ha documentado ya desde 1398,^{4, 5} además, la geofagia es una conducta humana común entre niños pequeños y mujeres embarazadas que implica la ingestión de sustancias terrosas tales como el suelo y arcilla. Varios estudios coinciden en que este comportamiento tiene sus raíces en la evolución y es común entre el reino animal.⁶⁻⁹ Sin embargo, la geofagia se considera como un comportamiento aberrante, y potencialmente peligrosa debido a la contaminación con tóxicos constituyentes tales como metales, metaloides, parásitos, patógenos o contaminantes orgánicos persistentes, como PCDD (dibenzo-p-dioxinas y dibenzofuranos policlorados).¹⁰⁻¹³

1.1. Geomedicina

Los términos geomedicina y Geoquímica Ambiental se han utilizado tradicionalmente. Selinus¹⁴ en 1931, fue el primero que introdujo el término

geomedicina, y consideró que era sinónimo de Medicina Geográfica, el cual es definido como "una rama de la medicina, donde geográfica y los métodos cartográficos se utilizan para presentar resultados de investigación médica"¹⁵

Además algunos autores señalan que los profesionales de la Geología Médica están involucrados en tareas como:

- La identificación de causas ambientales sobre posibles problemas de la salud, a fin de buscar soluciones para prevenir o minimizar estos problemas.
- La identificación de contaminantes geoquímicos en suelos, sedimentos, y aguas que pueden impactar en la salud de forma negativa.
- La evaluación de efectos beneficiosos para la salud de geo-materiales y sus procesos.¹⁶

Por otro lado, La geofagia o comúnmente llamado pica, es el hábito de consumir arcilla o tierra y ha sido practicada por la humanidad en la mayoría de las culturas en muchos continentes y por un largo periodo de tiempo (documentado desde 1398) ^{4, 7, 17-19} y nuestro país no es ajeno a ello.

Finalmente es importante mencionar que, la arcilla es una roca natural de granos finos ²⁰ o material sólido que contiene uno o más minerales con trazas de óxidos metálicos y materia orgánica. Algunos trabajos indican que la arcilla debe ser reconocida como el material del siglo 21 debido a su abundancia natural, bajo costo y amigable con el medio ambiente.²¹⁻²³ Sin embargo, el uso de arcillas con fines terapéuticos y cosméticos debe cumplir con ciertos requisitos físicos, fisicoquímicos y microbiológicos

1.2. Arcilla

Definición

La arcilla se define como un grupo de minerales secundarios microcristalinos que consisten en silicatos de aluminio hidratados que tienen estructuras en forma de hoja o lamina.

Los minerales arcillosos se distinguen uno de otros por la fórmula química general, la estructura y las propiedades químicas y físicas. Los tres grupos de minerales arcillosos son los siguientes:

- Grupo de la montmorillonita, $\text{Al}_2(\text{OH})_2\text{SiO}_{10}$
- Grupo de la illita, $\text{K}_{0-2}\text{Al}(\text{Si}_{8-6}\text{Al}_{0-2})\text{O}_{20}(\text{OH})_4$
- Grupo de la caolita, $\text{Al}_2\text{SiO}_5(\text{OH})_4$

Muchas arcillas contienen grandes cantidades de sodio, potasio, magnesio, calcio y hierro, así como cantidades traza de otros metales.²⁴

Estructura

La estructura en capas de la arcilla consiste en láminas de óxido de silicio que alternan con láminas de óxido de aluminio. Las láminas de óxido de silicio están constituidas por tetraedros en los que cada átomo de silicio está rodeado por cuatro átomos de oxígeno. En cada tetraedro, tres son compartidos con otros átomos de silicio que son componentes de otro tetraedro. Esta lámina u hoja se denomina lámina tetraédrica.^{24, 25}

El óxido de aluminio está contenido en una lámina octaédrica, así llamada porque cada átomo de aluminio está rodeado por seis átomos de oxígeno en una configuración octaédrica.^{26, 27}

Clasificación estructural de la arcilla

Estructuralmente las arcillas pueden clasificarse como:

- Arcillas de capas unitarias
- Arcillas de dos capas en la que los átomos de oxígeno son compartidos entre una lámina tetraédrica y otra octaédrica adyacente
- Arcillas de tres capas en que una lámina octaédrica comparte átomos de oxígeno con láminas tetraédricas a ambos lados

Una capa unitaria de una arcilla de dos capas tiene típicamente alrededor de 0.7 nanómetros (nm) de espesor, mientras que el espesor de una arcilla de tres capas es mayor de 0.9 nm.²⁷

Propiedades físico-químicas

Las propiedades de la arcilla derivan principalmente del:

- Tamaño de partícula
- Morfología laminar (filosilicatos)
- Las sustituciones isofórmicas, que dan lugar a la aparición de cargas en las láminas y a la presencia de cationes débilmente ligados en el espacio inter-laminar

Como consecuencia de estas características, las arcillas presentan una elevada área superficial y elevada capacidad de adsorción,^{28, 29} además, la presencia de una gran cantidad de superficie activa con enlaces no saturados por lo que pueden interactuar con diversas sustancias, en especial compuestos polares, esta propiedad se conoce como capacidad de intercambio iónico.²⁹

Superficie específica

También llamada área específica, se define como el área de la superficie externa más el área de la superficie interna (si existe) de las partículas constituyentes, por unidad de masa, expresado en m²/g. Las arcillas poseen una elevada superficie específica,³⁰ muy importante para ciertos usos industriales como su aplicación en envases de alimentos.³¹

Algunos ejemplos de superficie específica de las arcillas son por ejemplo:²⁹

- Caolinita de elevada cristalinidad 15 – 50 m²/g.
- Illita 50 m²/g.
- Montmorillonita 80 – 300 m²/g.
- Sepiolita 100 - 240 m²/g.
- Paligorskita 100 – 200 m²/g.

Capacidad de intercambio catiónico

La capacidad de intercambio catiónico (CEC) se define como la suma de todos los cationes de cambio, que un mineral puede adsorber a un determinado pH. Es equivalente a la medida del total de cargas negativas del mineral. Estas cargas negativas pueden ser generadas en tres formas diferentes:^{29, 31}

- Enlaces insaturados
- Sustituciones isomórficas dentro de la estructura
- Disolución de los grupos hidroxilos accesibles

1.3. Ensayos *in vitro*

El ensayo de disolución permite medir la velocidad y la magnitud de la disolución de un analito en un sistema de ensayo “*in vitro*”, dentro de un periodo de tiempo específico y en un volumen determinado de medio de disolución, en el cual se introduce una cantidad de muestra sólida, posteriormente el medio es agitada bajo condiciones controladas. Durante todo el periodo de ensayo se toman muestras con o sin reposición de otro medio que se encuentra bajo las mismas condiciones.³²

La velocidad de disolución por lo general se expresa como la masa de soluto que aparece en el medio de disolución por unidad de tiempo. La velocidad de disolución está influenciada por las propiedades intrínsecas del estado sólido, tal como el estado cristalino, incluyendo polimorfos y solvatos así como el grado de no cristalinidad. Por otro lado, las propiedades de disolución también se ven influenciadas por factores extrínsecos como el área superficial, la hidrodinámica y las propiedades del medio de disolución, incluyendo el disolvente, la temperatura, la viscosidad del líquido, el tiempo, el pH y concentración de la solución amortiguadora.³³

Actualmente la USP 35, reconoce 7 métodos para el ensayo de disolución: los más utilizados son el método N°1, también referido como el método de la Canastilla y el método N°2 o método de la paleta.

En relación al medio de disolución, típicamente este se puede desarrollar en medios acuosos, pero también se pueden simular condiciones *in vivo* en donde las mediciones se pueden realizar en intervalos fisiológicos de $\text{pH} \pm 0.05$ a $37\text{ }^\circ\text{C} \pm 0.5$. La velocidad típica de rotación puede estar entre 60 y 500 rpm, recomendándose 300 rpm para el disco rotatorio. En relación a los tiempos de muestreo para formas farmacéuticas de liberación inmediata se considera intervalo de 30 - 60 minutos, y para productos de disolución lenta se consideran tiempos mayores a 60 minutos.^{33, 34}

1.4. Ensayos *in vivo*

El uso de animales en experimentación va en paralelo al desarrollo de la medicina, cuyas raíces provienen de la Grecia antigua. Según Baumans (2005) la creciente demanda de modelos animales de calidad, junto con las críticas vertidas sobre el modo en que se utilizan los animales, ha llevado a la aparición de una rama multidisciplinaria de la ciencia denominada ciencia de los animales de laboratorio, que se rige por los principios cardinales de las tres erres: reemplazo, reducción y refinamiento, formuladas por Russell y Burch en 1959.³⁵⁻³⁸

Por otro lado, el uso de animales en la investigación, enseñanza y pruebas, es aceptable solamente si contribuye en forma efectiva a la mejor comprensión de principios biológicos fundamentales, o al desarrollo de conocimientos que, razonablemente, podemos esperar que beneficien a los seres humanos o a los animales.³⁹

1.5. Espectrofotómetro de emisión óptico con plasma inductivamente acoplado ICP – OES

Plasma de acoplamiento inductivo (ICP) es una fuente de ionización que junto a un espectrofotómetro de emisión óptico (OES) constituye el equipo de ICP-OES.

Es una técnica analítica utilizada para la detección de metales trazas. Es un tipo de espectroscopia de emisión que utiliza el plasma acoplado inductivamente para producir átomos excitados e iones que emiten radiación electromagnética en longitudes de onda característica de un determinado elemento. La temperatura de llama se encuentra en un rango de 6,000 a 10 000 °K.^{40, 41} La intensidad de esta emisión es indicativo de la concentración del elemento en la muestra.

Funcionamiento

En esta técnica, la introducción de la muestra líquida en un sistema de nebulización forma un aerosol que es transportado por el Argon a la antorcha del plasma, acoplado inductivamente por radio frecuencia. En el plasma, debido las altas temperaturas generadas, los analitos son atomizados e ionizados generándose los espectros de Emisión atómicos de líneas características.

Los espectros son dispersados por la red de difracción y el detector sensible a la luz se encarga de medir las intensidades de las líneas. La información es procesada por el sistema informático.^{42, 43}

2. ANALISIS DE ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

F. TATEO y col. Realizaron estudios de la composición mineralógico y geoquímico de cuatro arcillas minerales de uso terapéutico. La composición del soluto fue Na > Si > Ca > K > Mg. Además, se reporta que las variaciones de la solución química indican que la elementos menos solubles disminuyen con el tiempo de sedimentación (por ejemplo, Fe, Al, Mn): los elementos alojados en materia orgánica o sulfuros y soluble en medios oxidativo, aumenta con el tiempo (V, Mo, Sb, As). Muchos otros elementos son más bien constantes a muy bajo concentraciones.⁹

C. OFELIA CASTILLO y col., mencionan que los pobladores del altiplano peruano-boliviano consumen una sustancia natural conocida como “chaco”, muy

difundida desde la época precolombina y apreciada por sus propiedades digestivas. Dichos investigadores indican que el mecanismo de acción terapéutico (antiácido) se debe a una acción citoprotectora sobre la mucosa gástrica por mecanismos independientes de la inhibición de la secreción ácida, ya que no posee propiedad antiácida *in vitro*.⁴⁴

M. ISABEL, indica que la arcilla es usado en formulaciones farmacéuticas, como principios activos administrados por vía oral (protectores gastrointestinales, laxantes osmóticos orales, antidiarreicos) o administrado por vía tópica (protectores dermatológicos, cosméticos); y como excipientes (lubricantes, sistemas de entrega, bases inertes, emulsionantes), principalmente debido a su alta área específica y su capacidad de absorción/adsorción, inercia química y baja o nula toxicidad para el paciente.¹

P.S. HOODA y col. Mencionan que a pesar de que los suelos son rico en nutrientes minerales, la ingestión de suelos, accidentales o por medio de geofagia puede reducir potencialmente la absorción de nutrientes ya biodisponibles, en particular los micronutrientes tales como Fe, Cu y Zn *in vitro*. En el trabajo también se menciona que los suelos ingeridos podrían convertirse en fuente de Ca, Mg y Mn.⁷

M. SARA y col. Sugieren que las arcillas (*in vitro*) en general inducen citotoxicidad (con dependencia de la arcilla, la concentración, sistema experimental, etc.) con diferentes mecanismos subyacentes, tales como necrosis/apoptosis, el estrés oxidativo o genotoxicidad. Sin embargo, la mayoría de los experimentos *in vivo* realizados en roedores, no mostraron evidencias claras de toxicidad sistémica incluso a dosis de 5000 mg/kg.¹¹

D. MWALONGO y N.K. MOHAMMED tras un análisis de 100 arcillas de cinco regiones en Tanzania, reportaron que en las muestras se identificaron

elementos esenciales como Fe, Zn, Cu, Se y Mn y elementos tóxicos como As, Pb, Co, Ni, U y Th cuyas concentraciones estaban por encima de los límites permisibles de la OMS en algunas de las muestras. Además, los resultados de este estudio muestran que el hábito de comer tierra está exponiendo a las madres embarazadas y sus hijos a la toxicidad de los metales por lo que podrían producir efectos perjudiciales a su salud.³

CAPITULO III

I. PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

1. TÉCNICAS, INSTRUMENTOS Y MATERIALES DE VERIFICACIÓN

1.1. Instrumentos, materiales y reactivos

Instrumentos y materiales

- Balanza analítica Ohaus Pioneer
- Equipo EASY pure II
- Micropipetas 20, 200 y 1000 uL
- Pipeta de 1, 5 y 10 mL
- Tips
- Tubos Falcon de 15 y 50 mL
- Fiolas de 10, 25, 500 mL
- Papel filtro rápido
- Digestor microondas MARS 6 CEM
- Digestor UV Metrohm
- Espectrofotómetro de emisión óptica con plasma inductivamente acoplado ICP – OES, PerkinElmer
- Equipo de disolución ERWEKA DT 600

Reactivos

- Ácido nítrico suprapuro Merck
- Ácido fosfórico p.a. Merck
- Ácido clorhídrico p.a. Merck

- Ácido acético p.a. Merck
- Hidróxido de sodio p.a. Merck
- Solución estándar de aluminio Merck

1.2. Validación del método en el espectrofotómetro de emisión atómica con plasma inductivamente acoplado

La validación de métodos es considerado como las diferentes actividades que se realizan repetidas veces, a intervalos relativamente infrecuentes, durante la vida útil de un método.⁴⁵

La técnica de espectrofotometría de emisión atómica con plasma inductivamente acoplado es frecuentemente utilizada en la determinación de metales pesados en diferentes matrices.⁴⁶ La principal ventaja es que se trata de una técnica multielemental que combina cualidades como un bajo límite de detección, alta capacidad para determinar en forma simultánea, precisa y en corto tiempo un amplio número de analitos.⁴⁷

Según la información emitida por el EPA 200.7 y con la finalidad de obtener resultados confiables, se verificará la metodología considerando los siguientes parámetros

Linealidad

La linealidad de un método analítico se refiere a la proporcionalidad entre la concentración del analito y su respuesta. Para su determinación se prepara una serie de al menos cinco diluciones de un estándar. Estas diluciones son analizadas y se determina la curva de regresión $Y=bX+a$.

Los valores de a y b son los estimadores del intercepto del origen y la pendiente respectivamente.⁴⁸

Independiente a la apariencia de la recta, resulta conveniente evaluar los estimadores de regresión en un intervalo de confianza dado ($p=0.05$):

- Coeficiente de regresión: se determina para evaluar el ajuste del modelo lineal propuesto, $Y=bX+a$
- Pendiente (b): se determina como parámetro indicativo de la sensibilidad del método o para evaluar la correlación de diferentes métodos.
- Ordenada o intercepto del origen (a): se determina para evaluar la proporcionalidad de la función analítica, es decir, que la recta pase por el origen y que cualquier desviación pueda adjudicarse únicamente a un error aleatorio.⁴⁸

Precisión

Refleja la medida en que los valores de una serie repetida de ensayos analíticos que se realizan sobre una muestra homogénea son semejantes entre sí. Aunque la USP XXII² expresa que la precisión es la expresión del grado de la reproducibilidad, mientras que la Norma Británica¹⁷ incluye la repetibilidad y la reproducibilidad.⁴⁹

Exactitud

También conocido como error sistemático o tendencia, corresponde a la diferencia entre el valor obtenido (muestra enriquecida con una concentración conocida de estándar (1ppm)) y el valor verdadero (concentración conocido del estándar (1ppm)).⁴⁸

Sensibilidad

Método analítico que corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo. Los parámetros a definir al evaluar la sensibilidad son los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC).

El LD hace referencia a la mínima cantidad de analito que se puede detectar en la matriz; mientras que el LC es la mínima cantidad de analito que se puede cuantificar en la matriz.⁴⁸

Según el METHOD 200.7 del EPA relacionado a la “determination of metals and trace elements in water and wastes by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry” para determinar el LD y LC se debe leer el blanco 5 veces, hallar la desviación estándar y multiplicarla por 3 para hallar el LD y por 10 para el LC.⁵⁰

1.3. Metodología

1.3.1. Obtención y caracterización de la arcilla

El chaco se extraerá de alguno de los yacimientos identificados en la región de Puno (Acora, Asillo, Azangaro y Tiquillaca).

Los cuidados durante la extracción de la arcilla implicará el uso de EPP (Equipo de Protección Personal)

En relación a la extracción, manejo y conservación de la arcilla, se requerirá una lampa y pico para realizar este trabajo, además la arcilla a extraer no debe presentar ninguna coloración o manchas en la superficie ni dentro de la estructura de la arcilla.

Caracterización química de la arcilla

Triturar y pesar 200 mg de arcilla, en el vaso de teflón adicionar 2ml de ácido nítrico supra-puro Merck concentrado. Digerir la muestra según el método EPA-3051 estipulada en el digestor Mars 6 cuyas características son:

- Tiempo de calentamiento: 4 minutos y 30 segundos
- Temperatura máxima alcanzado: 175°C
- Tiempo de mantenimiento: 5 minutos y 30 segundos
- Tiempo de enfriamiento: 15 minutos
- Potencia máxima: 400 w

Caracterización física de la arcilla

Realizar una inspección visual de la arcilla descartando aquellas que presenten coloraciones extrañas impropias de la arcilla comestible.

Para medir el pH, pesar 4 gramos de arcilla y añadir 10 mL de agua tamponada a pH neutro. Realizar el análisis granulométrico luego del lavado de la arcilla y obtener tamaños de partículas de 75 μm - 150 μm .

Lavado de la arcilla

Colocar 350 gramos de arcilla en un vaso de precipitados de 500 mL de capacidad, adicionar agua ultrapura y homogenizar, dejar en reposo 24 horas, colectar la fase que contiene la arcilla en suspensión y centrifugar a 6000 rpm por 5 minutos, llevar la masa obtenida a la estufa a 60°C por 24 horas.^{6, 25, 51, 52} Finalmente triturar y tamizar.

1.3.2. Ensayos *in vitro* - perfiles de disolución

Desarrollo del perfil de disolución a pH 1.2

a) Condiciones de ensayo

Aparato: paletas; 250 rpm

Cantidad de muestras: 50, 250, 500 mg

Temperatura: 37 °C

Tiempo: 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 minutos

Medio: solución de pH 1.2; Fluido gástrico simulado USP sin enzima: 900 mL

- Fluido gástrico sin enzimas.- disolver 2.0 gramos de cloruro de sodio en 7 mL de ácido clorhídrico concentrado y cantidad suficiente de agua ultrapura para 1000 mL

Desarrollo del perfil de disolución a pH 4.5

a) Condiciones de ensayo

Aparato: paletas; 250 rpm

Cantidad de muestras: 50, 250, 500 mg

Temperatura: 37 °C

Tiempo: 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 minutos

Medio: solución amortiguadora de acetato de sodio pH 4.5: 900 mL

Desarrollo del perfil de disolución a pH 6.8

a) Condiciones de ensayo

Aparato: paletas; 250 rpm

Cantidad de muestras: 50, 250, 500 mg

Temperatura: 37 °C

Tiempo: 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 minutos

Medio: solución amortiguadora de fosfato de sodio pH 6.8: 900 mL

Desarrollo del perfil de disolución en jugo gástrico simulado

a) Condiciones de ensayo

Aparato: paletas; 250 rpm

Cantidad de muestras: 50, 250, 500 mg

Temperatura: 37 °C

Tiempo: 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 minutos

Medio: jugo gástrico simulado 900 mL

➤ Jugo gástrico simulado: pesar 12.0 g de cloruro de sodio y 19.2 g de pepsina purificada en 18 mL de ácido clorhídrico y agua cantidad suficiente para 6000 mL. Ajustar el pH a 1.45 con ácido clorhídrico

Desarrollo del perfil de disolución en jugo intestinal simulado

a) Condiciones de ensayo

Aparato: paletas; 250 rpm

Cantidad de muestras: 50, 250, 500 mg

Temperatura: 37 °C

Tiempo: 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 minutos

Medio: jugo intestinal simulado 900 mL

- Jugo intestinal simulado: pesar 6.8 g de fosfato monobásico de potasio en 250 mL de agua, agregar 190 mL de hidróxido de sodio 0.2 N y 400 mL de agua. Agregar 10.0 g de pancreatina, ajustar el pH con hidróxido de sodio 0.2 N a $\text{pH } 7.5 \pm 0.1$. enrazar con agua a volumen final de 1000 mL

Tratamiento de las muestras

Extraer alícuotas de 5 mL de cada vaso de disolución a los tiempos antes indicados (con reposición de medio), enrasar a un volumen final de 10 mL con ácido nítrico al 3 % y filtrar con papel filtro rápido. La cantidad de aluminio liberado será determinado en el ICP – OES utilizando como blanco el medio de disolución correspondiente.

1.3.3. Ensayos *in vivo*

Se optará por cumplir con las condiciones mínimas necesarias que garantice el uso adecuado de los animales de experimentación y para la obtención de resultados confiables.

Características del modelo animal

Definir las condiciones de los animales en cuanto a características somáticas, peso, sexo y edad.

Se utilizaran un total de 24 ratas machos albinas Wistar de la especie *Rattus norvegicus* provenientes del Bioterio de la Universidad Católica de Santa María (UCSM). Los animales serán divididos al azar en tres grupos de experimentación (tabla N° 2), además para la estadía de las ratas se diseñaran jaulas individuales de 18 cm de ancho, 25 cm de largo y 20 cm de altura de tal manera que se garantice un espacio adecuado para el libre movimiento de los animales.

Los ratas serán ambientados 15 días antes del desarrollo del ensayo alimentándolos con maíz, trigo y agua *ad libitum*. Además, el diseño en general contará con las siguientes características.

a) *Equipo de investigación (personas que manipularán los animales)*

<i>Nombre</i>	<i>Profesión</i>	<i>Investigador</i>	<i>Cargo</i>	<i>Técnico de apoyo</i>	<i>Experiencia en el uso de animales</i>
Celia Choquenaira	Química farmacéutica	X	Estudiante de posgrado		X
Gonzalo Dávila	Químico farmacéutico	X	Asesor de tesis		X
José Villanueva	Químico farmacéutico	X	Co-asesor		X
José Aita Fuente	Encargado del bioterio de la UCSM		Encargado del bioterio de la UCSM	X	X (2 años)
Justo Aita Aragon	Ex-encargado del bioterio de la UCSM		Ex-encargado del bioterio de la UCSM	X	X (35 años)

b) *Naturaleza de trabajo*

Tesis de maestría

c) *Duración estimada del tiempo de trabajo con los animales: 25 días continuos.*

<i>Características</i>	<i>Días</i>
<i>Tiempo de ambientación</i>	15
<i>Toma de muestra (sangre)</i>	1
<i>Toma de muestra (orina)</i>	4
<i>Total</i>	20

d) *Animales requeridos*

<i>Especie</i>	Rattus norvegicus
<i>Cepa/colonia</i>	Wistar

<i>Sexo</i>	Macho
<i>Edad</i>	6 meses
<i>Peso (g)</i>	225 ± 5
<i>Procedencia</i>	Bioterio de la UCSM

e) *Propuesta y tipo de estudio*

<i>Prueba</i>	
<i>Entrenamiento</i>	
<i>Investigación</i>	X
<i>Producción y crianza de animales</i>	

f) *Procedimientos*

<i>Cirugía menor</i>	
<i>Cirugía mayor</i>	
<i>Múltiples cirugías</i>	
<i>Colección in vivo de sangre</i>	X
<i>Colección de orina</i>	X

g) *Procedimientos experimentales*

<i>Ayuno</i>	X
<i>Restricción hídrica</i>	X
<i>Inmovilización del animal</i>	
<i>Anestesia</i>	
<i>Cirugía</i>	

→ Intervalos cortos de tiempo

h) *Exposición a agentes químicos/ físicos/ biológicos/ mecánicos*

<i>Si</i>	X	<i>No</i>	
-----------	----------	-----------	--

- ¿Cuál?: Arcilla comestible “chaco”
- Dosis: 50 y 500 mg / kg de peso.

- Frecuencia de administración: una vez

i) *Extracción de fluidos*

<i>Si</i>	X	<i>No</i>	
-----------	----------	-----------	--

- ¿Cuál?: sangre
- Vía: plexo venosos retro orbital
- Volumen: 200 µL
- Frecuencia (h): 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 14, 18, 24.

j) *Extracción de órganos*

<i>Si</i>		<i>No</i>	X
-----------	--	-----------	----------

k) *Destino final de los animales*

<i>Eutanasia</i>	
<i>Recuperación de los animales</i>	X

Previo al tratamiento de los animales de experimentación, se determinarán las concentraciones basales de posibles elementos traza en las muestras sanguíneas

Tabla N°2. Grupos de trabajo y tipo de tratamiento

<i>Grupo</i>	<i>Tratamiento</i>
<i>Control negativo</i>	2 mL de agua ultrapura en ayunas
<i>Do 1</i>	50 mg de arcilla por kg de peso en ayunas
<i>Do 2</i>	500 mg de arcilla por kg de peso en ayunas

Con la finalidad de determinar la biodisponibilidad de los elementos traza, se extraerán muestras de sangre en diferentes tiempos como se muestra a continuación.

Tabla N°3. Tiempos de toma de muestra sanguínea

Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tiempo (h)	0	1	2	4	6	8	10	14	18	24

Por otro lado, con la finalidad de determinar la cantidad de analito que se podría estar excretando, se recolectarán muestras de orina a las 24, 48, 72 y 96 horas.

Obtención y tratamiento de muestras biológicas

Sangre

Extraer del plexo venoso retro orbital 200µL de sangre, recolectarlos y rotularlos en envases de polietileno con cierre seguro hermético (Eppendorf). Usar EDTA al 10% como anticoagulante en los tiempos antes mencionados.

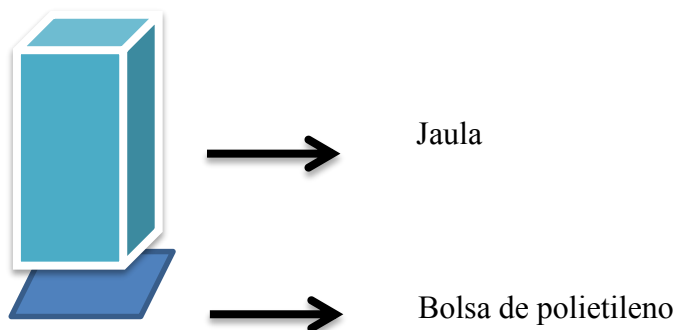
Medir 100 µL de sangre de cada muestra y depositarlos en tubos de cuarzo, posteriormente agregar 20 µL de peróxido de hidrogeno, 100 µL de ácido nítrico y 5 mL de agua ultrapura para continuar con la digestión como se describe a continuación. Colocar la batería de tubos en el sistema de digestión UV, programar el temporizador para 1 hora de digestión, controlar la temperatura para no sobrepasar los 95 °C. Concluida la digestión enrazar las muestras en fiolas de 10 mL con agua ultrapura para su posterior medición por ICP-OES.

Orina

Obtener las muestras de orina mediante el uso de una bolsas de polietileno (colector de orina), el cual será colocada debajo de cada jaula, las muestras de orina que se depositen en el pliego de la bolsa de polietileno, serán recolectadas con una jeringa y colocados en un envases de polietileno con cierre seguro hermético (Eppendorf).

La toma de muestra se realizará cada 5 horas durante el día y cada 12 horas por las noches por un periodo total de 4 días. Para el análisis de las muestras,

medir 200 μ L de orina y enrazar con ácido nítrico suprapuro al 3% hasta un volumen final de 10 mL, filtrar y analizar por ICP-OES.



Diseño de jaula individual con colector de orina

1.3.4. Cálculos y análisis estadísticos

El tratamiento de los datos estadístico se realizarán a través del análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba post-hoc de Tukey HSD.

Para determinar las ecuaciones que describen los perfiles de disolución y biodisponibilidad *in vitro* e *in vivo* se utilizará el software OriginPro 9.0.

Los parámetros cinéticos como el tiempo medio de absorción ($T_{1/2 \text{ abs.}}$), tiempo medio de eliminación ($T_{1/2 \text{ e}}$), constante de absorción ($k_{\text{abs.}}$) y constante de eliminación (k_e), se determinarán a través del método de residuales.

Los parámetros de biodisponibilidad como concentración máxima (C_{max} (mg/L)) y el área bajo la curva (AUC (mg.h/L)), se hallarán por el método de integración de trapecios.

2. CAMPO DE VERIFICACIÓN

2.1. Ubicación espacial

La identificación, cuantificación y estudios toxicológicos se realizarán en el laboratorio H-101, H-202 y el bioterio de la Universidad Católica de Santa María de la ciudad de Arequipa.

2.2. Ubicación temporal

El trabajo de investigación se realizará durante el año 2015 y parte del 2016.

3. ESTRATEGIA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Los datos serán procesados y obtenidos haciendo uso de modelos estadísticos acorde con el tipo de ensayo.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente capítulo se reportarán y discutirán los resultados hallados durante el desarrollo de la metodología descrita en capítulos anteriores.

1. RECOLECCIÓN DE LA ARCILLA

La muestra fue recolectada de uno de los yacimientos identificados a 8 Km de la comunidad de Chacowasi (Chaupi sawacasi – Tawacachi), en la provincia de Azángaro (latitud $14^{\circ}54'27''$ S, longitud $70^{\circ}11'49''$ W), departamento de Puno.



Figura 1. Arcilla extraída

Para la extracción de la arcilla se usaron EPP (Equipo de Protección Personal). En relación a la extracción, manejo y conservación de la arcilla, se requirió lampa y pico para realizar el socavón a 3 metros de profundidad aproximadamente, además, se tuvo cuidado de que la arcilla extraída no presentase ninguna coloración o manchas en la superficie ni dentro de su estructura de la arcilla.

2. CARACTERIZACIÓN DE LA ARCILLA

1.1. Lavado de la arcilla

Luego de analizar y probar diferentes técnicas de lavado, la arcilla fue triturada y se colocó 350 gramos en un vaso de precipitados de 500 mL de capacidad, se adicionó agua ultrapura, se homogenizó y se dejó en reposo durante 24 horas para la separación de las partículas de la arcilla.⁵³

Luego de este tiempo, se observó la formación de dos capas, en seguida se colectó el sobrenadante y se centrifugó^{25, 53} a 6000 rpm por 5 minutos, la masa obtenida se llevó a estufa a 60 °C por 24 horas.^{6, 25, 51, 52}

Finalmente la muestra fue nuevamente triturada y tamizada obteniéndose tamaños de partícula $> 75 \mu < 150 \mu$. (ANEXO 1)

1.2. Caracterización fisicoquímica

En relación a la caracterización física de dicho material, este tiene una apariencia de roca blanquecina, de superficie lisa y se caracteriza por adquirir plasticidad al ser mezclada con agua, además presenta un pH de 6.5 similar resultado se hallaron en trabajos relacionados a la caracterización y evaluación de la actividad terapéutica de arcillas.⁵⁴

En relación a la caracterización química, este se realizó con arcilla directamente extraída de los yacimientos, por lo que para la determinación de los elementos presentes en la tabla 1 se determinó tras la digestión ácida de la arcilla según el

método EPA-3051 del digestor Mars 6, posteriormente la muestra fue filtrada y analizada en el ICP-OES cuya configuración metodológica para la determinación de metales es el EPA 200.7 validada por el área de control de calidad de la Universidad Católica de Santa María.

Tabla 1. Caracterización química de la arcilla

Elementos	mg/L	Elementos	mg/L
Ag 328.068	2.50	Mg 279.077	8760.00
Al 308.215	17345.00	Mn 257.610	1352.50
As 193.696	85.25	Mo 203.845	1.50
B 249.677	17.25	Na 589.592	4197.50
Ba 493.408	646.00	Ni 231.604	0.00
Be 313.107	0.00	P 214.914	0.00
Bi 223.061	3.75	Pb 220.353	39.00
Ca 315.887	8172.50	Sb 206.836	2.75
Cd 228.802	4.50	Se 196.026	0.50
Co 228.616	9.00	Si 251.611	1558.25
Cr 205.560	16.00	Sn 189.927	0.25
Cu 324.752	72.00	Sr 407.771	262.25
Fe 259.939	77875.00	Ti 334.940	264.50
Hg 253.652	6.25	Tl 190.801	0.00
K 766.490	4465.00	V 292.464	22.50
Li 670.784	6.75	Zn 213.857	201.50

X_y : donde X metal; y longitud de onda.

En la tabla 1. Se muestra las concentraciones halladas de 32 elementos, en el cual se evidencian elevadas concentraciones de minerales y micro elementos como magnesio, sodio, calcio, cobre, hierro, manganeso, zinc y selenio. Sin embargo, también se evidencian concentraciones elevadas de otros elementos cuyas funciones benéficas fisiológicas no están documentadas y por el contrario, podrían ocasionar efectos negativos en la salud y el medio ambiente si estos son liberados o se hacen biodisponibles.^{7, 9, 19, 51}

3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO EN EL ESPECTROFOTÓMETRO DE EMISIÓN ATÓMICA CON PLASMA INDUCTIVAMENTE ACOPLADO (ICP OES) PARA LA DETERMINACIÓN DE ALUMINIO

La técnica de espectrofotometría de emisión atómica con plasma inductivamente acoplado es frecuentemente utilizada en la determinación de metales pesados en diferentes matrices.⁴⁶ La principal ventaja es que se trata de una técnica multielemental que combina cualidades como un bajo límite de detección, alta capacidad para determinar en forma simultánea, precisa y en corto tiempo un amplio número de analitos.⁴⁷ Los métodos de preparación de muestras para la determinación de diferentes elementos en ICP-OES, deben tener en cuenta la complejidad y estabilidad de la matriz de la muestra. Estos métodos incluyen digestión por microondas asistida, hot plate - stirrer, y técnicas de pre-concentración, entre otras como digestión UV.⁴⁶ Por otro lado, si bien es cierto que la digestión de las muestras permiten la destrucción de la materia orgánica, es un paso crítico en el análisis elemental, debido al riesgo de contaminación y pérdida de analitos, contribuyendo a un error de análisis sistemático.⁵⁵ Con el fin de obtener resultados confiables y reproducibles, se realizaron ensayos de linealidad, precisión, exactitud, % de recuperación, límite de cuantificación y límite de detección del método en el ICP-OES para la determinación de aluminio. Todo lo anterior se realizó según la información emitida por la EPA 200.7.

Los resultados que se muestran a continuación se obtuvieron según el medio de disolución al cual fue sometida la arcilla (pH 1.2; 4.5; 6.8; jugo gástrico e intestinal simulado) y según el blanco de cada matriz analizado (blancos de matrices sangre y orina).

3.1. Linealidad

La linealidad de la respuesta del equipo, se realizó utilizando el estándar de Al(NO₃) Merck a diferentes concentraciones en solución ácida suprapuro (HNO₃

3%) como se muestra en la Tabla 2 y la Figura 1 considerando la concentración de aluminio como variable independiente (x) y la intensidad como variable dependiente (y).

Tabla 2. Datos para la determinación de la linealidad del método.

[Al] (ppm)	Ia (A)	Ib (A)	Ic (A)	Prom. (A)	DSR
0.1	108970.900	106061.700	106586.900	107206.500	1.446
0.3	133673.900	130738.300	130589.300	131667.167	1.321
0.6	170001.400	165178.700	163914.000	166364.700	1.931
0.9	210908.900	205781.100	203005.900	206565.300	1.941
1.5	280009.200	275521.200	273555.400	276361.933	1.197
2.0	344500.000	337564.600	341717.400	341260.667	1.023

El rango de trabajo se seleccionó tomando en cuenta valores provenientes de las pruebas piloto realizados previamente. Por regresión lineal, a partir de las concentraciones crecientes de estándar de aluminio y los valores promedio de las intensidades, se obtuvo un coeficiente de determinación (R^2) de 0.99968, una pendiente (b) de 122755.257 y un intercepto de (a) de 94424.647.

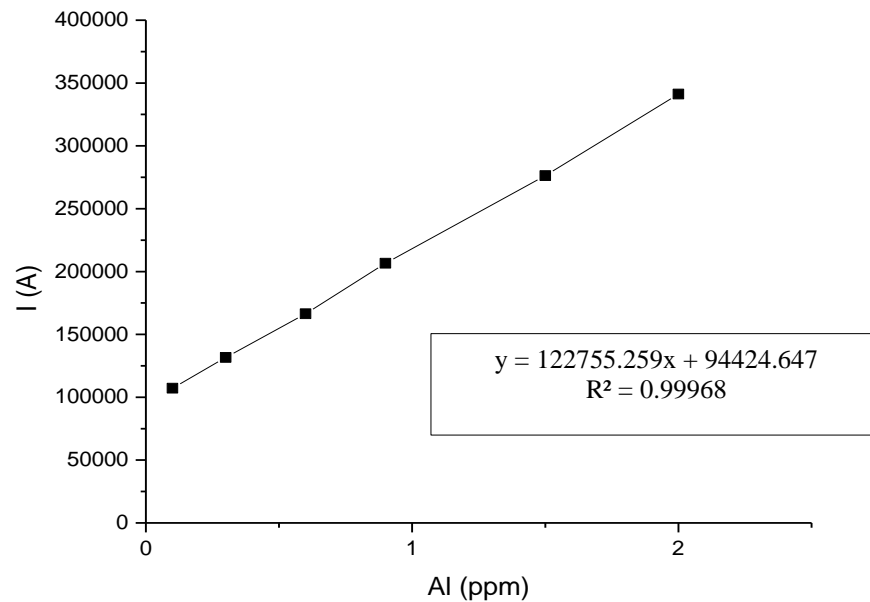


Figura 2. Gráfica de la calibración para aluminio

La pendiente es una medida de la sensibilidad del procedimiento, por lo que mientras mayor es la respuesta del instrumento a un cambio en la concentración del analito, mayor es la sensibilidad del procedimiento.⁴⁵ Por otro lado, el valor del intercepto indica el error sistémico.

El coeficiente de determinación advierte de la relación lineal y no de las variables y el criterio de aceptación se estableció en $R^2 \geq 0.995$,^{45, 56} lo cual implica que el modelo es lineal y explicativo en al menos un 99.5%. Cabe resaltar que el valor hallado para el coeficiente fue mayor al valor impuesto ($R^2 = 0.99968$). (ANEXO 2)

Tabla 3. Determinación de la linealidad para los datos de la gráfica de regresión

<i>Estadística de regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0.99984
Coefficiente de determinación R^2	0.99968
R^2 ajustado	0.99960
Error típico	1781.879
Observaciones	6

Sin embargo, el mejor indicador del modelo lineal no es R^2 , por lo que para corroborar si el modelo es significativo o no, se realizó una análisis de varianza (ANOVA) asumiendo un nivel de confianza del 95 % en donde se comparan las variaciones de la variables dependiente e independiente.⁵⁷

El hecho que la probabilidad de rechazar la hipótesis de no diferencia sea tan baja (3.763E-08) hace que se pueda aceptar la diferencia significativa evaluada por lo tanto el modelo es suficientemente explicativo. Por lo que se puede determinar que en el método existe una relación directamente proporcional entre la concentración del analito y la intensidad en el rango de trabajo que se ha establecido.

Tabla 4. Análisis de varianza para la determinación de la linealidad

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	40083149231.842	40083149231.842	12624.243	3.763E-08
Residuos	4	12700373.142	3175093.285		
Total	5	40095849604.984			

	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95.0%
Intercepción	94424.647	1223.125	77.200	1.687E-07	91028.708	97820.585	91028.708
[Al] ppm	122755.257	1092.540	112.358	3.763E-08	119721.879	125788.635	119721.879

3.2. Precisión

La precisión del método, que se define como la cercanía de concordancia entre los resultados de pruebas independientes entre sí, fue determinada en términos de desviación estándar relativa (RSD) o el coeficiente de variación (%CV)⁴⁵. La precisión del método se evaluó como la repetibilidad y reproducibilidad de los resultados. La Repetibilidad (precisión intraensayo) refleja la precisión de un método, cuando se desarrolla bajo las mismas condiciones, utilizando la misma muestra, analizada por el mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos equipos y reactivos y durante una misma sesión de trabajo en un periodo de tiempo,^{49, 58} es así que este parámetro se halló de los datos obtenidos al realizar 5 repeticiones de 1 ppm de Al(NO₃) en solución ácida (HNO₃ 3%), la muestras se analizaron en el mismo día por un analista.

Tabla 5. Datos para la precisión del método

Elemento	Valor certificado	Valores prácticos	Promedio práctico	RSD
Aluminio	1 ppm	1.085	1.084	0.760
		1.090		
		1.069		
		1.087		
		1.087		

El criterio de aceptación del % CV es de $\pm 2\%$ ^{47, 59} por lo que analizando nuestros resultados podemos indicar que el método propuesto es preciso.

La reproducibilidad no fue analizada porque no se cuenta con otro equipo ICP-OES por el momento.

3.3. Exactitud

La exactitud del método fue determinada al utilizar un estándar de aluminio de concentración conocida. Matemáticamente suele expresarse como desviación relativa porcentual y el porcentaje de recuperación.⁴⁸

Tabla 6. Porcentaje de recuperación de aluminio en los diferentes medios de disolución

		RSD	% Recuperación
Medio de disolución	pH 1.2	1.783	103.18
	pH 4.5	1.505	103.60
	pH 6.8	1.006	102.46
	Jugo gástrico simulado	1.495	102.48
	Jugo intestinal simulado	1.268	101.27
Blanco de matrices	Sangre	1.621	102.32
	Orina	1.573	100.20

Los porcentajes de recuperación fueron determinados para cada medio utilizado en la pruebas in vitro e in vivo, es así que, se eligió una muestra a azar en cada caso y se enriquecido con 1 ppm del estándar de aluminio. La tabla 6 muestra los resultados obtenidos.

Al igual que en la precisión los criterios de aceptación de la RSD es de $\pm 2\%$ ⁴⁷; en relación al porcentaje de recuperación, el rango aceptable es de $100 \pm 5\%$, por lo que analizando nuestros resultados podemos indicar que el método propuesto es exacto.

3.4. Sensibilidad

Para la evaluación de los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se utilizaron blancos de cada medio al cual fue sometida la arcilla (pH 1.2; 4.5; 6.8; jugo gástrico e intestinal simulado) y blancos de cada matriz analizadas (matrices sangre y orina). Los LD se calcularon como 3 veces la desviación estándar, mientras que los LC se hallaron como 10 veces la desviación estándar para las mismas concentraciones traza del analito.^{45, 55, 56, 59-61} Los valores de LD y LC se encuentran un rango entre 0.010–0.034 ppm y 0.034–0.113 ppm respectivamente, es claro que estos valores varían dependiendo de los tipos de blancos que se generaron durante el desarrollo del presente trabajo.

Tabla 7. LD y LC de aluminio en los diferentes medios de disolución

	Medio de disolución	LD (ppm)	LC (ppm)
Medio de disolución	pH 1.2	0.018	0.059
	pH 4.5	0.023	0.077
	pH 6.8	0.030	0.099
	Jugo gástrico simulado	0.026	0.087
	Jugo intestinal simulado	0.034	0.113
Blanco de matrices	Sangre	0.027	0.089
	Orina	0.010	0.034

4. ENSAYOS *In vitro*

La arcilla es una roca natural de granos finos²⁰ o material sólido que contiene uno o más arcillas minerales con trazas de óxidos metálicos y materia orgánica. Algunos trabajos indican que la arcilla debe ser reconocida como el material del siglo 21 debido a su abundancia natural, bajo costo y compatible con el medio ambiente.²¹⁻²³

El consumo de arcilla en el Perú se inició hace más de 500 años y estuvo relacionado con la domesticación de la papa nativa que contienen glucoalcaloides que irritan el tubo digestivo.⁴⁴ La arcilla comestible cuya denominación en lengua quechua es “chaco” y “passa” en lengua aymara, es un tipo de arcilla utilizada desde tiempos precolombinos en forma de suspensión para tratar los síntomas de enfermedades ácido-pépticas principalmente,^{3, 44, 62} sin embargo es importante mencionar otros usos terapéuticos de la arcilla como la disentería, suplemento nutricional, para combatir la anemia, antidiarreico, antimicrobiano y para el tratamiento de parásitos intestinales.^{7-9, 19, 53, 54}

La ingestión de suelo no está científicamente sustentada sin embargo, se cree que el hábito está influenciado por tradiciones, medicinales, culturales, religiosas y creencias psicológicas.^{4, 6} Sin embargo, la arcilla considerada como el primer material utilizado por el hombre con fines terapéuticos no ha recibido suficiente interés en los libros²³ en ese sentido, la concentración de metales consumidos por geofagia individual sigue sin conocerse, es por ello que la cuantificación de elementos esenciales y sobre todo tóxicos es importante para asegurar la seguridad de la práctica geofágica en nuestro país.

Considerando las formas de consumo de la arcilla en estudio, se optó por evaluar la liberación de aluminio de la arcilla utilizando tres medios de disolución similar a como se desarrollan los perfiles de disolución de medicamentos y según lo recomendado por el comité de expertos de la Organización Mundial de la Salud en la sección de preparaciones farmacéuticas (Reporte 937 – Informe 40) entre otros.⁶³ Además, considerando que el consumo de arcilla es principalmente vía oral, adicionalmente se optó por determinar la liberación de aluminio en jugo gástrico e intestinal simulada.^{7, 8, 64}

4.1. Pruebas de disolución

Actualmente la USP 35, reconoce 7 métodos para el ensayo de disolución: los más utilizados son el método N°1, también referido como el método de la Canastilla

y el método N°2 o método de la paleta. Para el desarrollo del presente trabajo se utilizó el método N°2.

En relación al medio de disolución, típicamente este se puede desarrollar en medios acuosos, pero como se trata de simular el efecto de la liberación de aluminio durante la práctica geofágica, se trató de simular las condiciones in vivo en donde las mediciones se pueden realizar en intervalos fisiológicos de $\text{pH} \pm 0.05$ a $37\text{ °C} \pm 0.5$. Además según la USP la velocidad típica de rotación puede estar entre 60 y 500 rpm, recomendándose 300 rpm para el disco rotatorio, en tal sentido, para el desarrollo del presente trabajo se consideró medios de disolución a pH 1.2, 4.5 y 6.8, una temperatura de 37 °C y una velocidad de 250 rpm.

Es importante mencionar que los medios de disolución lo que tratan es de representar o simular los fluidos a los cuales será expuesto la arcilla dentro del tracto gastrointestinal y así poder evaluar la interacción la liberación del aluminio de la arcilla. En tal sentido, en el medio de disolución es importante el ajuste del pH, de modo tal que debe hallarse dentro de las 0.05 unidades de valor indicado en la monografía.³³

En relación a los tiempos de muestreo realizados en el ensayo, para sus determinaciones, se consideraron periodos de estudio de formas farmacéuticas de liberación inmediata (30 y 60 minutos) y productos de disolución lenta (mayor a 60 minutos)^{33, 34}. El periodo de ensayo in vitro fue de 90 minutos y los tiempos de muestreo fueron 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90 minutos. Para la toma de alícuotas, esta se desarrolló en forma manual empleándose jeringas de vidrio de 5 mL conectadas a cánulas de acero inoxidable (muestreo con reposición).

Cabe resaltar que cuando se desarrolló el estudio de disolución, se consideraron cuatro parámetros importantes como los son: la cantidad de arcilla, el tiempo, la temperatura y el pH.

Finalmente como observaciones generales durante el desarrollo del ensayo se incluyeron:

- Distribución regular de partículas por todo el vaso

- Movimiento errático o en giros de las paletas
- Adherencia de las partículas a las paletas

4.1.1. Perfil de disolución a pH 1.2

Considerando que la fisiología gástrica constituye una compleja y dinámica interacción entre estructuras anatómicas, sus secreciones, el ambiente circundante y los factores exógenos aportados por el individuo. Es importante resaltar que la condición del estómago es principalmente ácida, lo cual para fines de estudio de disolución, se puede simular preparando ácido clorhídrico diluido (0.1N) como se indica en la farmacopea. Considerando lo anterior, se obtuvieron datos tras la disolución de diferentes cantidades de arcilla (50 mg, 250 mg y 500 mg) en solución ácida (pH 1.2 ± 0.05) (ANEXO 3) y se elaboró el figura 2 en donde se relaciona la cantidad de aluminio liberado (mg/L) en función del tiempo, se consideraron 13 puntos de muestreo en total.

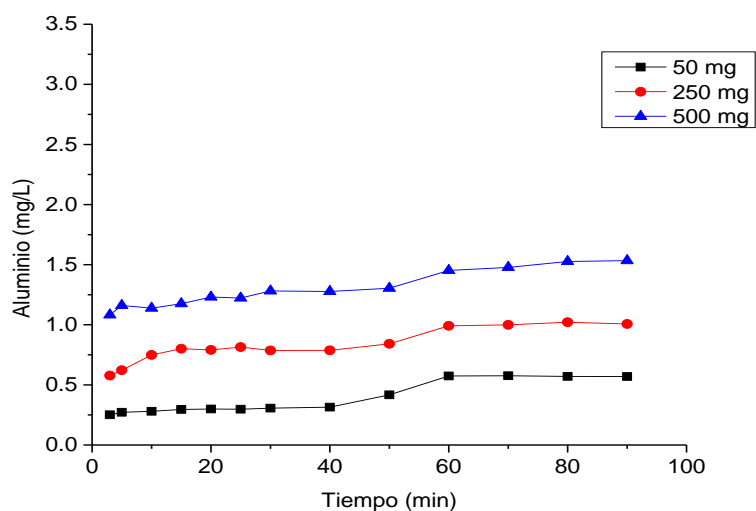


Figura 3. Aluminio liberado a pH 1.2 en función del tiempo y la cantidad de arcilla

En general se observa que la cantidad de aluminio liberado es mayor conforme transcurre el tiempo, analizando la línea de tendencia de la liberación

de aluminio de 250 mg y 500 mg de arcilla, se observa que la cantidad de aluminio liberado es constante los primeros 40 minutos y a partir de los 60 minutos la liberación es ligeramente mayor, sin embargo, la línea de tendencia correspondiente a 500 mg de arcilla evidencia una mayor liberación de aluminio durante todo el proceso en comparación con la cantidades de arcillas anteriores.

Estudios sobre digestión y disolución de aluminosilicatos en medios ácidos ($\text{pH} < 4$), suponen que el aluminio en este medio, podría estar presente en forma de ion estable Al^{+3} el cual va incrementando en función del tiempo;⁶⁵ comportamiento similar se observa en los resultados del Figura 3. Así mismo, en estudios relacionados a la toxicocinética del aluminio en materia de alimentación del lactante y vacunas, en donde se presentaron las propiedades farmacocinéticas y las toxicidades del punto final de aluminio, se postula que el aluminio y sus compuestos tienden a solubilizarse como cationes trivalente Al^{+3} en ambientes ácidos por debajo de $\text{pH} 5$, un fenómeno que hace que las superficies de aluminio exteriores sean inalterables de la lluvia ácida. De la misma manera, se menciona que compuestos de aluminio de la dieta se disocian en el ácido estomacal para convertirse en ligandos libres e iones de aluminio libres que posteriormente se hidratan para formar hexahidrato de aluminio trivalente.⁶⁵

Por otro lado, Yakimova considera que el aluminio es uno de los elementos tóxicos más abundantes con la capacidad de contaminar el suelo, el agua y las cadenas tróficas.⁶⁶ No obstante, las funciones biológicas específicas de aluminio para los animales y las plantas son desconocidos, por lo que no se considera como un nutriente esencial.⁶⁷

En términos de actividad agronómica, la mayor parte de aluminio está limitado a las formas insolubles, tales como aluminosilicatos y / o precipitado como sulfato o hidróxido de aluminio.⁶⁸ Sin embargo el aluminio se solubiliza a partir de silicatos y óxidos (formas no tóxicas) a Al^{3+} que es fitotóxico sólo bajo condiciones de bajo pH .^{69, 70}

Numerosos estudios han informado que hay diversas formas de aluminio en suelos en forma de monómeros, polímeros o en fase sólida, y que su

concentración depende del grado y la duración de la hidrólisis de los compuestos de aluminio, además determinaron que existe una correlación significativa entre el pH bajo y una alta concentración de especies de aluminio fitotóxicos (Al^{+3}). Con todo lo antes mencionado, se considera que el perfil de disolución de la arcilla a $pH\ 1.2 \pm 0.05$, evidencia la liberación de aluminio bajo la forma iónica de Al^{+3} .

En el documento de referencia para el desarrollo de Guías para la calidad del agua potable de la OMS, se indica que el aluminio puede formar especies hidroxiladas, todos basados en iones positivos como Al^{+3} o aluminatos hidroxilados. Además, se mencionan que se pueden formar complejos con diversos compuestos orgánicos (ácidos húmicos o fúlvicos por ejemplo) y ligandos inorgánicos (por ejemplo, fluoruro, cloruro y sulfato), en donde la mayoría, pero no todos, son solubles. La química de aluminio en el agua es compleja, y muchos parámetros químicos, incluyendo el pH, determinan qué especies de aluminio están presentes en soluciones acuosas. En agua pura, el aluminio tiene una solubilidad mínima en el intervalo de $pH\ 5,5 - 6,0$; además, se indica que concentraciones de aluminio disuelto total incrementan a valores de pH altas o bajas.⁷¹

Además es importante mencionar que tras el análisis de los datos (correspondiente a 500 mg de arcilla) con el software OriginPro 9.0, la ecuación que describe la liberación de aluminio tiene las siguientes características

Tabla 8. Características de la ecuación que describe la liberación de aluminio de 500 mg de arcilla a pH 1.2

Model	Log2P2		
Equation	$y = \ln(a+b*x)$		
Ecuación	$y = \ln(2.961 + 0.019*x)$		
Reduced Chi-Sqr	0.001		
Adj. R-Square	0.956		
		Value	Standard Error
Al liberado	a	2.961	0.050
	b	0.019	0.001

Claramente se evidencia que la ecuación que describe la liberación de aluminio a pH 1.2 es de primer orden, esta ecuación nos permitirá predecir la liberación de aluminio en tiempos diferentes a los ensayados.

4.1.2. Perfil de disolución a pH 4.5

En el sistema digestivo, el duodeno es la parte del intestino delgado que conecta el estómago con el yeyuno. El duodeno está situado en la parte posterior y superior del abdomen, en el retroperitoneo, siendo la única porción del intestino delgado que se encuentra fijo, y está formado totalmente por músculo liso. El duodeno comienza en el píloro, la abertura de la parte inferior del estómago por la que vacía su contenido en el intestino y termina en la flexura duodeno-yeyunal, que lo separa del yeyuno.⁷² Considerando la fisiología del tubo gastrointestinal y las variaciones de pH a lo largo de tubo como se muestra en la figura 4, se consideró realizar las pruebas de disolución de la arcilla a $\text{pH } 4.5 \pm 0.05$ a manera de simular el medio duodenal tal y como se realizan en los perfiles de disolución de medicamentos indicados en la farmacopea.

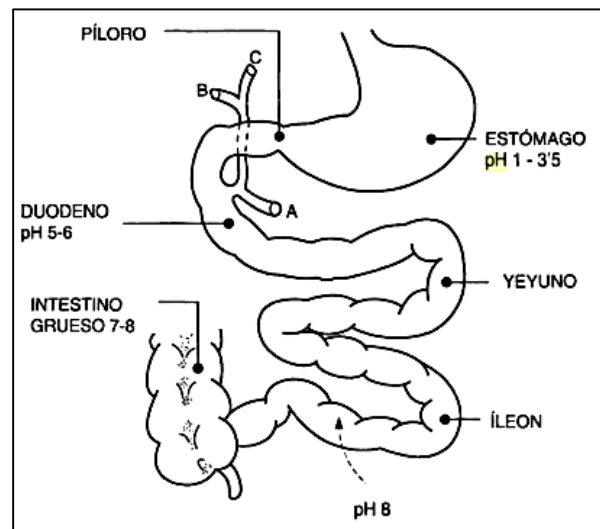


Figura 4. Variaciones del pH a lo largo del tubo gastrointestinal⁷³

Con los datos obtenidos tras la disolución de diferentes cantidades de arcilla (50 mg, 250 mg y 500 mg) en buffer acetato de sodio ($\text{pH } 4.5 \pm 0.05$) (ANEXO 3) se elaboró el figura 5 en donde se relaciona la cantidad de aluminio liberado (mg/L) en función del tiempo (13 puntos de muestreo).

Se evidencia una mayor desorción de aluminio cuando la cantidad de arcilla es mayor, además, cuando se trabaja con 250 mg y 500 mg de arcilla, la liberación de aluminio es constante en los primeros 15 minutos y a partir de los 30 minutos se evidencia un ligero incremento en dicha liberación. Por otro lado, la línea de tendencia de la liberación de aluminio cuando se ensaya con 500 mg de arcilla evidencia un incremento en la desorción de dicho metal a partir de los 5 minutos haciéndose constante luego de los 30 minutos en adelante.

Realizando una comparación visual de las figuras 3 y 5, se evidencia una mayor liberación de aluminio a $\text{pH } 4.5 \pm 0.05$.

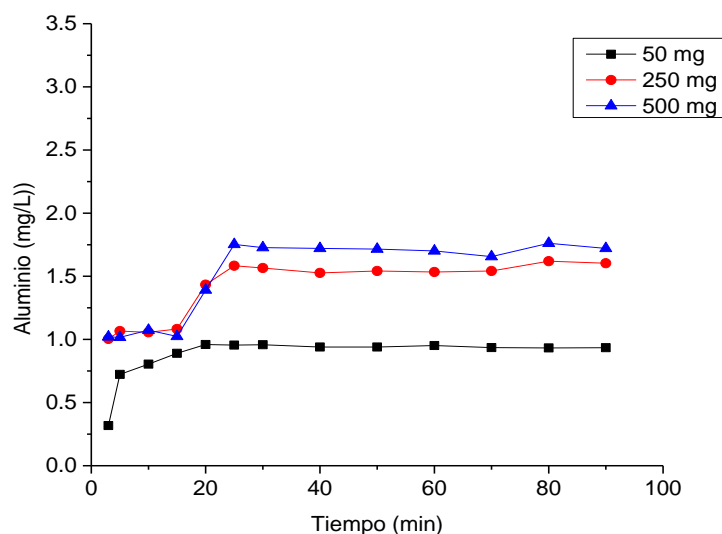


Figura 5. Aluminio liberado a pH 4.5 en función del tiempo y la cantidad de arcilla

En un trabajo de investigación sobre el estudio experimental de la formación de complejos de acetato de aluminio, se realizaron pruebas de

solubilidad de bayerita y boehmita en función del pH y temperaturas de 60°C a 200°C, para determinar las estequiometrías y constantes de estabilidad de complejos de aluminio-acetato. El análisis de estos datos de solubilidad indican que los tres complejos de aluminio-acetato que se forman significativamente son: AlAcO^{+2} , Al(OH)AcO^{+} , y Al(AcO)^{+2} . Los cálculos termodinámico indicados en el trabajo de investigación, demuestran que el acetato puede mejorar notablemente la solubilidad de dichos minerales que contienen aluminio a $\text{pH} < 5$, pero tienen poco efecto en soluciones que tienen valores de pH más altos, el trabajo concluye resaltando en que la formación del complejo aluminio-acetato es muy importante en la solubilidad de los hidróxidos de aluminio a pH bajos ($\text{pH} < 5$).⁷⁴

Bajo las condiciones de trabajo en el que se desarrolló el perfil de disolución de la arcilla, se puede mencionar que la liberación del aluminio de la arcilla, se favorece por la formación de complejos de aluminio con el acetato, evidenciándose así la presencia de aluminio en el medio de disolución. Sin embargo, no se encontró información que pueda precisar cuál de las tres formas de complejos entre el aluminio y el acetato se ve favorecida al pH y la temperatura ensayada.

Por otro lado, otras bibliografías indican que entorno a un pH 4.2, la movilización de Al^{+3} alcanza su máximo valor, debido a que el acetato se desprotona y se favorece la unión del aluminio a ella pudiéndose formar los complejos antes mencionados, además se menciona que el complejo AlAcO^{+} prevalece sobre el Al^{+3} e Al(OH)_3 en un rango de pH de 1 – 3.5.^{74, 75}

Es importante mencionar que tras analizar los datos con el software OriginPro 9.0, la ecuación que describe la liberación de aluminio tiene las siguientes características

Cabe mencionar que la ecuación modelo Boltzman, se ajusta a los datos correspondientes a la liberación de aluminio cuando se ensayó con 500 mg de arcilla.

Tabla 9. Características de la ecuación que describe la liberación de aluminio de 500 mg de arcilla a pH 4.5

Model	Boltzmann		
Equation	$y = A2 + (A1-A2)/(1 + \exp((x-x0)/dx))$		
Ecuación	$y=1.719+(1.033-1.719)/(1+\exp((x-19.997)/ 0.030))$		
Reduced Chi-Sqr	0.001		
Adj. R-Square	0.990		
		Value	Standard Error
Al liberado	A1	1.033	0.016
	A2	1.719	0.012
	x0	19.997	438329.401
	dx	0.030	4.97E+06

4.1.3. Perfil de disolución a pH 6.8

Centrándonos nuevamente en el figura 4, y continuando con los cambios de pH a lo largo del tracto digestivo, con la finalidad de simular las condiciones del yeyuno, se realizó el perfil de liberación del aluminio a $\text{pH } 6.8 \pm 0.05$. Los parámetros de ensayo se consideraron según el proyecto de tesis.

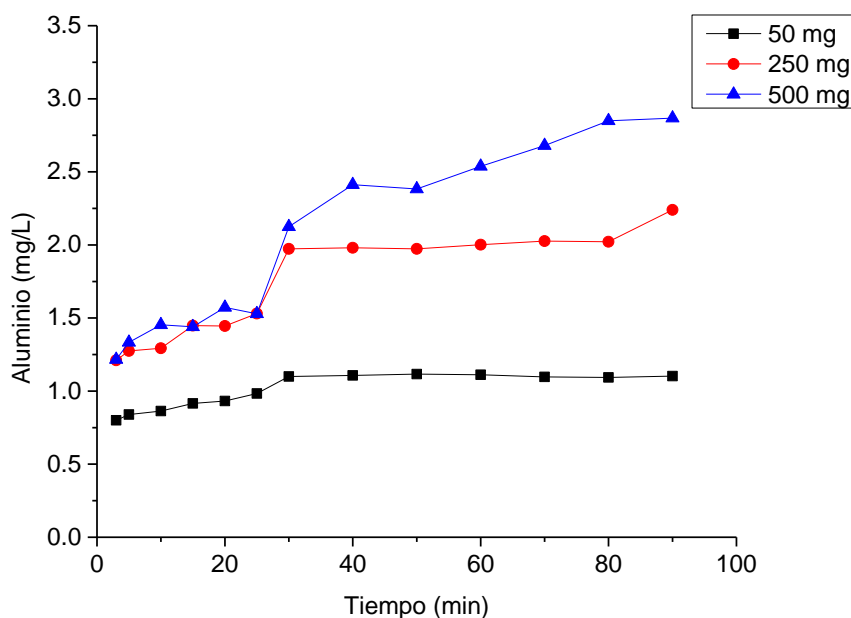


Figura 6. Aluminio liberado a pH 6.8 en función del tiempo y la cantidad de arcilla

Los datos obtenidos tras la disolución de diferentes cantidades de arcilla (50 mg, 250 mg y 500 mg) en buffer fosfato pH 6.8 ± 0.05 se muestran en el ANEXO 3, además con esos mismos datos se elaboró el figura 6 en donde se relaciona la cantidad de aluminio liberado (mg/L) en función del tiempo (13 puntos de muestreo).

La cantidad de aluminio liberado es mayor cuando la cantidad de arcilla puesta en disolución es mayor. En las tres líneas de tendencia se observa que la mayor cantidad de aluminio liberado se evidencia a partir de los 30 minutos haciéndose constante en adelante para el caso de 50 mg y 250 mg. Además, realizando una comparación visual de la liberación de aluminio en pH 1.2 ± 0.05 ; 4.5 ± 0.05 y 6.8 ± 0.05 , se evidencia una mayor liberación a pH 6.8.

Cabe mencionar que en el cuerpo humano, los fluidos extracelulares contienen aproximadamente 2 mmol de fosfato total por litro a pH 7,4 y el fluido intracelular tiene alrededor de 10 mmol de fosfato total por litro. A pH 6.6. El Al^{+3} forma una sal insoluble con fosfato, a menudo designado como $AlPO_4$, o a veces como $AlPO_4 \cdot 2H_2O$, que corresponde a la composición del mineral variscita.

En 0,16 mol / L los valores de pKa para las sucesivas desprotonaciones de $H_3PO_4 \rightarrow H_2PO_4^- \rightarrow HPO_4^{2-} \rightarrow PO_4^{3-}$ son 2.0; 6.77 y 11.6. Así el PO_4^{3-} es la especie dominante de fosfato a pH > 11.6, mientras que el Al^{+3} es la especie dominante a pH < 5.5. Por lo tanto cantidades significativas de ambos Al^{+3} y PO_4^{3-} son incompatibles en solución a cualquier pH. Si buscamos el complejo neutro global por la que existe compatibilidad, la especie $H_2PO_4^-$ es el dominante a un intervalo de pH de 2 - 6.8. Por otro lado el $Al(OH)_2$ es la principal especie a pH 5.5 – 6; a efectos de la solución química, es ventajoso escribir $AlPO_4 \cdot 2H_2O$ como $Al(OH)_2 \cdot H_2PO_4$.⁷⁶

En un trabajo de investigación titulado la química del aluminio y su relación con la biología y la medicina, se menciona que la distribución de las especies de aluminio en solución acuosa siguen las siguientes características: el hexahidrato octaédrico $Al(H_2O)_6^{+3}$ predomina a pH < 5, y el aluminio tetraédrico

como $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ predomina a $\text{pH} > 6.2$, mientras que existe una mezcla de especies en un intervalo de pH de 5-6.4⁷⁶

El ion aquo Al^{+3} forma complejos de solución con aniones como el sulfato, fosfato y nitrato. Cuando la solubilidad de Al^{+3} es controlada por la gibbsita, todos los complejos excepto $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ pueden contribuir significativamente a total de aluminio en solución dependiendo de la actividad de los aniones. Por ejemplo, cuando la actividad de SO_4^{-2} es igual a $10^{-3.5}$, las actividades de AlSO_4^+ y Al^{+3} son iguales. Por otro lado, los complejos fosfato, y particularmente AlHPO_4^+ , son significativos y cambia con la actividad del fosfato.⁷⁷

Al analizar los datos con el programa OriginPro 9.0, la ecuación que describe la liberación de aluminio tiene las siguientes características

Tabla 10. Características de la ecuación que describe la liberación de aluminio de 500 mg de arcilla a pH 6.8

Model	Holliday1		
Equation	$y = a/(a + b*x + c*x^2)$		
Ecuación	$y = 1.232/(1.232 - 0.014*x + 8.78E-05* x^2)$		
Reduced Chi-Sqr	0.02278		
Adj. R-Square	0.94084		
		Value	Standard Error
Al liberado	a	1.232	0.066
	b	-0.014	0.001
	c	8.78E-05	1.48E-05

La ecuación que describe la liberación de aluminio a pH 6.8, es el modelo Holliday 1 y es una ecuación de segundo orden con tres variables.

Por otro lado es importante mencionar que durante el desarrollo del presente trabajo de investigación, además de determinar los perfiles de disolución del aluminio y cuyos resultados fueron mostrados, también se optó por determinar la liberación de dicho metal en otros dos medios como lo son el jugo gástrico simulado y el jugo intestinal simulado cuyas características se asemejan a los medios fisiológicos.

A nivel fisiológico, el jugo gástrico es una mezcla de secreciones de varias células epiteliales especializadas tanto superficiales como de las glándulas gástricas. Su composición química consiste en agua, ácido clorhídrico, trazas de cloruro de potasio, cloruro de sodio, bicarbonato, enzimas y mucus. Por otro lado, la principal enzima del jugo gástrico es la pepsina, si bien existen otras enzimas importantes para funciones específicas, sus cantidades son mucho menores. Además, es importante mencionar que la actividad catalítica de la pepsina es la de una endoproteasa, que rompe preferentemente los enlaces peptídicos que involucran aminoácidos aromáticos (p.ej. phe, try, tyr) y un aminoácido adyacente, generando productos de digestión fragmentados de muy diversos tamaños.^{78, 79} En tal sentido y como se especifica en la farmacopea, el jugo gástrico simulado fue preparado considerando como parte del medio la pepsina y ajustada a $\text{pH } 1.4 \pm 0.1$.

En relación al jugo intestinal, es una sustancia producida por la mucosa del intestino delgado, y con cuya acción culmina el proceso de degradación de nutrientes para pasar luego a ser absorbidos, en la farmacopea se indica que para preparar este jugo fisiológico, esta debe contener la enzima pancreatina y el pH debe ser ajustado a 7.5 ± 0.1 .

4.1.4. Perfil de disolución en jugo gástrico simulado

La liberación de aluminio en jugo gástrico simulado (ANEXO 3), sigue un comportamiento similar a las desarrolladas anteriormente en solución a pH 1.2. En el figura 7 se puede observar una mayor liberación del metal cuando se trabaja con 500 mg de arcilla y una menor liberación cuando con trata con 50 mg de arcilla.

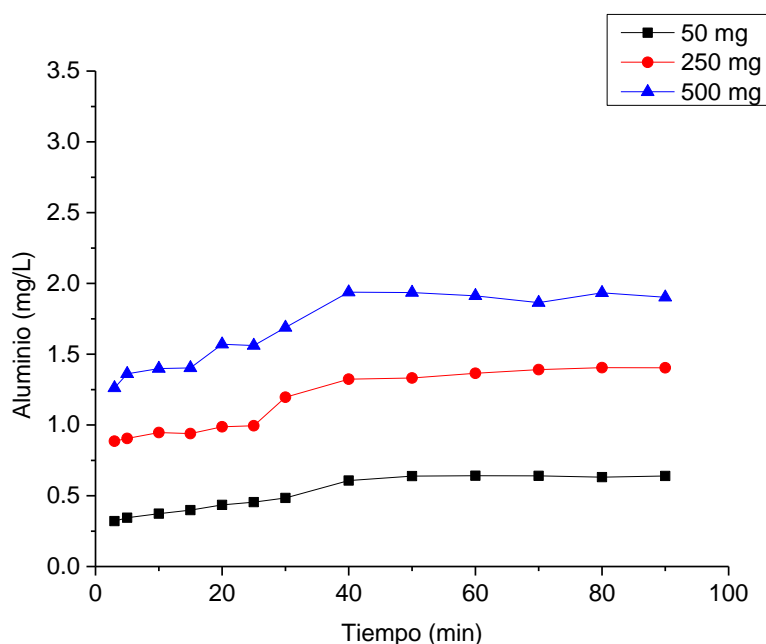


Figura 7. Aluminio liberado en jugo gástrico simulado en función del tiempo y la cantidad de arcilla

La liberación de aluminio es exponencial hasta los 40 minutos y posteriormente se hace constante. Al realizar una comparación visual del perfil de liberación de aluminio a pH 1.2 y medio jugo gástrico simulado, se observa una mayor liberación de aluminio en el medio simulado, llegando a una concentración máxima de 1.938 ± 0.026 mg/L frente a una concentración de 1.533 ± 0.019 mg/L a pH 1.2. Además, es importante mencionar que la máxima cantidad de aluminio en medio jugo gástrico simulado se alcanzó a los 40 minutos, mientras que en solución a pH 1.2 la máxima cantidad de aluminio liberado fue a los 90 minutos. Considerando que ambos medios se encuentran a un pH ácido, es probable que la enzima pepsina presente solo en el jugo gástrico simulado, de alguna manera favorezca la mayor liberación del aluminio de la arcilla en un periodo de tiempo más corto. Algunas reportes indican la actividad farmacológica de ciertos antiácidos compuestos por sales de aluminio y magnesio, se unen a la pepsina, inactivando y reduciendo sus efectos dañinos contribuyendo así al control del reflujo gastroesofágico.⁸⁰ Esta unión del

aluminio a la pepsina podría explicar por qué se evidencia una mayor liberación de aluminio en un medio que contiene dicha enzima. Al analizar los datos con el programa OriginPro 9.0, la ecuación que describe la liberación de aluminio tiene las siguientes características.

Tabla 11. Características de la ecuación que describe la liberación de aluminio de 500 mg de arcilla en jugo gástrico simulado

Model	DoseResp		
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((\text{LOG}x0-x)*p)})$		
Ecuación	$y = 1.300 + (1.921 - 1.300)/(1 + 10^{((24.770 - x) * 0.064)})$		
Reduced Chi-Sqr	0.003		
Adj. R-Square	0.958		
		Value	Standard Error
Al liberado	A1	1.300	0.058
	A2	1.921	0.025
	LOGx0	24.770	2.126
	p	0.064	0.020

4.1.5. Perfil de disolución en jugo intestinal simulado

La liberación de aluminio en jugo intestinal simulado (ANEXO 3), sigue un comportamiento similar a la desarrollada en medio a pH 6.8. En el figura 8 se puede observar una mayor liberación de aluminio cuando se ensaya con 500 mg de arcilla, además la liberación del metal sigue un comportamiento exponencial durante los primeros 20 minutos, a partir del cual la liberación de hace constante.

Realizando una comparación visual del perfil de liberación de aluminio a pH 6.8 y medio jugo intestinal simulado, se observa una mayor liberación de aluminio en el medio simulado, llegando a una concentración máxima de 3.057 ± 0.019 mg/L frente a una concentración de 2.867 ± 0.041 mg/L a pH 6.8. Además, es importante mencionar que la máxima cantidad de aluminio en medio jugo gástrico simulado se alcanzó a los 80 minutos, mientras que en solución a pH 6.8 la máxima cantidad de aluminio liberado fue a los 90 minutos.

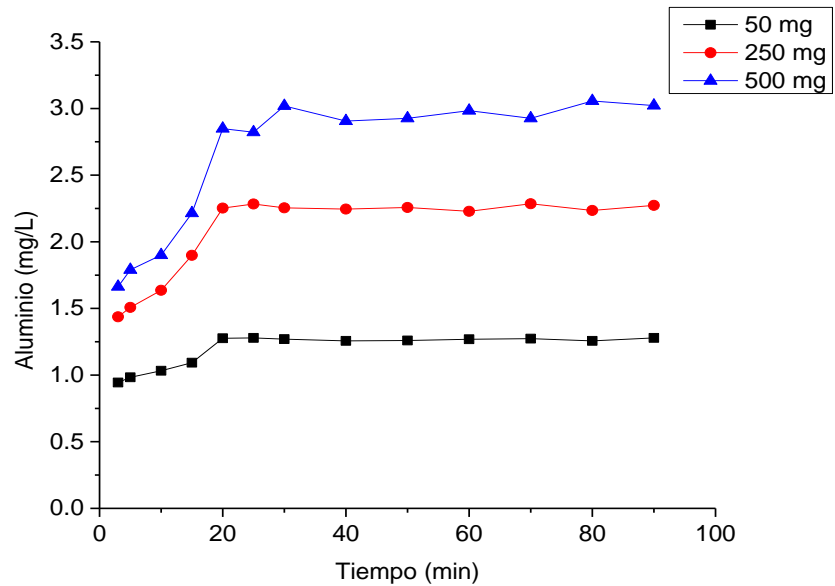


Figura 8. Aluminio liberado en jugo intestinal simulado en función del tiempo y la cantidad de arcilla

Considerando que ambos medios se encuentran a un pH similar es probable que la enzima pancreatina, presente solo en el jugo intestinal simulado, de alguna manera favorezca la mayor liberación del aluminio de la arcilla en un periodo de tiempo relativamente menor.

Analizando los datos con el programa OriginPro 9.0, la ecuación que describe la liberación de aluminio tiene las siguientes características.

Tabla 12. Características de la ecuación que describe la liberación de aluminio de 500 mg de arcilla en jugo intestinal simulado

Model	DoseResp		
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((\text{LOG}x0-x)*p)})$		
Ecuación	$Y=1.727+(2.9868-1.727)/(1+10^{((15.695-x)*0.170)})$		
Reduced Chi-Sqr	0.00585		
Adj. R-Square	0.9787		
		Value	Standard Error
[A1]	A1	1.727	0.059
	A2	2.968	0.028
	LOGx0	15.695	0.658
	p	0.170	0.040

La ecuación que describe la liberación de aluminio en jugo intestinal simulado es de primer orden y está representada por cuatro variables.

Como se ha podido analizar con anterioridad, la liberación de aluminio a partir de la arcilla en los diferentes medios de disolución, parecen seguir comportamientos similares, en tal sentido, a continuación se muestran figuras comparativos de la liberación de aluminio en los diferentes medios de disolución con la finalidad de establecer semejanzas o diferencias entre ellos teniendo como constante la cantidad de arcilla.

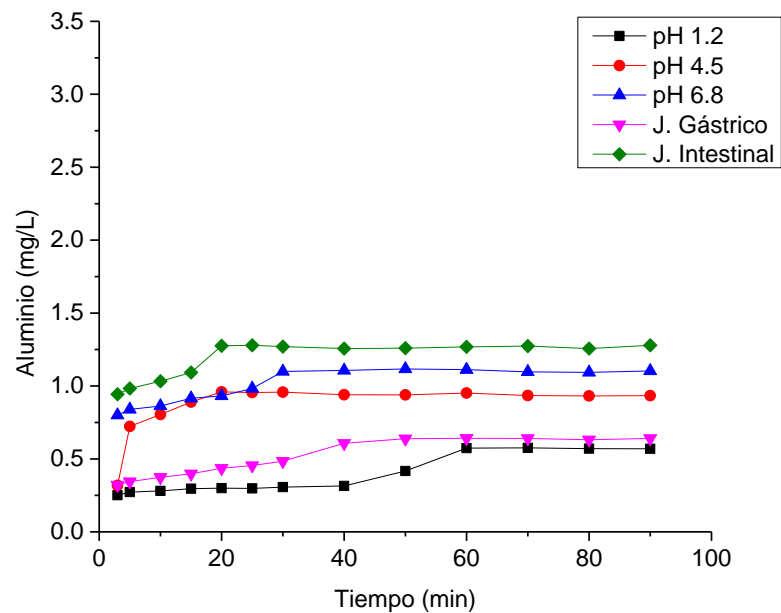


Figura 9. Aluminio liberado de 50 mg de arcilla en diferentes medios

En el figura 9 se muestran las líneas de tendencia comparativas de la liberación de aluminio de 50 mg de arcilla en diferentes medios de disolución, en ella se evidencia que la liberación de aluminio es mayor cuando la arcilla es sometida en jugo intestinal simulado, solución a pH 6.8, solución a pH 4.5, jugo gástrico simulado y solución a pH 1.2 respectivamente. Es importante mencionar que la máxima cantidad de aluminio liberado en jugo intestinal simulado es de

1.279 mg/L de arcilla cuando se trabaja con 50 mg de arcilla total. Además, la liberación de aluminio en todos los casos se hace constante minutos antes de finalizar los 90 minutos.

En el figura 10 se muestran las líneas de tendencia de la liberación del aluminio de 250 mg de arcilla en los diferentes medios de disolución, se puede observar que la mayor cantidad de aluminio liberado se produce cuando la arcilla es colocada en jugo intestinal simulado, solución a pH 6.8, solución a pH 4.5, jugo gástrico simulado y solución a pH 1.2 respectivamente.

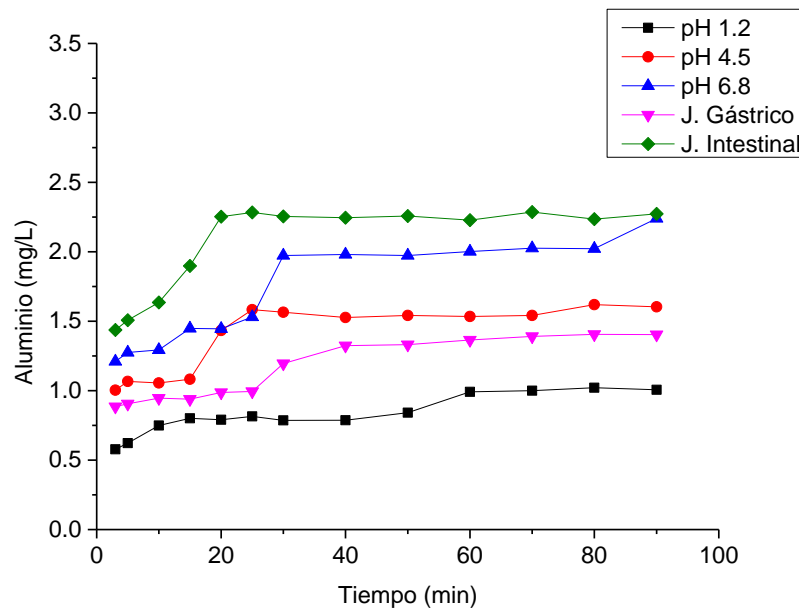


Figura 10. Aluminio liberado de 250 mg de arcilla en diferentes medios

La máxima cantidad de aluminio liberado en jugo intestinal simulado es de 2.286 mg/L de arcilla cuando se ensaya con 250 mg de arcilla total. La liberación de aluminio se hace constante minutos antes de finalizar los 90 minutos.

En el figura 11 se muestran las líneas de tendencia de la liberación del aluminio de 500 mg de arcilla en los diferentes medios de disolución, se puede observar que la mayor cantidad de aluminio liberado se produce cuando la arcilla

es colocada en jugo intestinal simulado, solución a pH 6.8, jugo gástrico simulado, solución a pH 4.5 y solución a pH 1.2 respectivamente.

La máxima cantidad de aluminio liberado en jugo intestinal simulado es de 3.057 mg/L de arcilla cuando se ensaya con 500 mg de arcilla total. Al igual que en el caso anterior, la liberación de aluminio se hace constante minutos antes de finalizar los 90 minutos.

Es importante mencionar que la máxima liberación de aluminio durante todo el ensayo se produce a los 30 minutos, en medio jugo intestinal simulado y cuando se trabaja con 500 mg de arcilla.

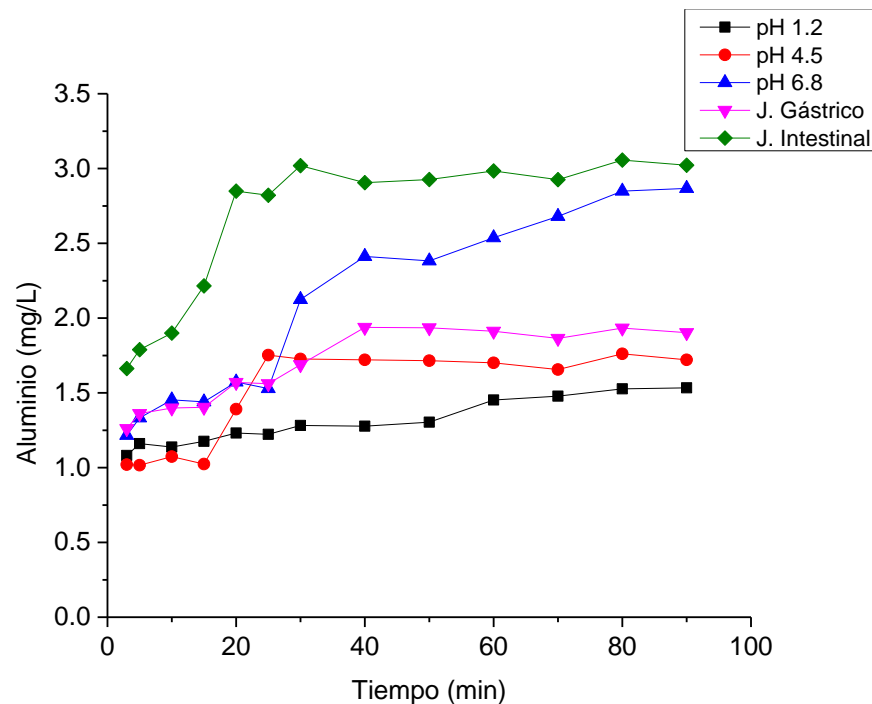


Figura 11. Aluminio liberado de 500 mg de arcilla en diferentes medios

Con la finalidad de determinar si existe o no diferencia significativa en la cantidad de aluminio liberado de las diferentes cantidades de arcilla (50 mg, 250 mg y 500 mg), se realizó un análisis de varianza de las cantidades de aluminio liberado (mg/L) en los diferentes medios de disolución (pH 1.2, pH 4.5, pH 6.8, jugo gástrico simulado y jugo intestinal simulado).

En la tabla 13 se muestra los resultados del análisis de varianza (ANOVA) de una vía realizada a las cantidades de aluminio liberado de 50 mg, 250 mg y 500 mg de arcilla en los diferentes medios de disolución. Considerando los valores de probabilidad y los valores de F, se puede mencionar que existe diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre las cantidades de aluminio liberado en los diferentes medios de disolución a diferentes tiempos y los en las tres cantidades ensayadas.

Tabla 13. Análisis de varianza de la cantidad de aluminio liberado en diferentes medios de disolución

Tiempo (min)	F (50 mg)	F (250 mg)	F (500 mg)	Valor crítico para F	Prob. (50 mg)	Prob. (250 mg)	Prob. (500 mg)
3	8603.772	3202.608	788.285		1.241E-17	1.731E-15	1.890E-12
5	2050.156	1501.223	807.792		1.606E-14	7.611E-14	1.673E-12
10	7049.933	3588.524	662.451		3.358E-17	9.806E-16	4.493E-12
15	13870.774	2237.326	3721.978		1.140E-18	1.038E-14	8.171E-16
20	3859.364	3699.090	2760.646		6.818E-16	8.427E-16	3.635E-15
25	9957.541	6901.380	3273.931		5.977E-18	3.735E-17	1.551E-15
30	5634.888	10420.718	9507.802	3.478	1.029E-16	4.762E-18	7.530E-18
40	3328.412	2827.287	2307.879		1.428E-15	3.227E-15	8.893E-15
50	11165.696	5295.254	1267.568		3.372E-18	1.404E-16	1.770E-13
60	1948.754	2785.753	7869.411		2.069E-14	3.474E-15	1.938E-17
70	1485.403	3621.981	2313.096		8.024E-14	9.362E-16	8.793E-15
80	2655.839	1658.975	2532.786		4.410E-15	4.622E-14	5.589E-15
90	2572.098	2623.208	2297.828		5.176E-15	4.691E-15	9.089E-15

Para determinar entre que subgrupos de los analizados anteriormente se evidencia diferencias o semejanzas, se realizó la prueba post-hoc de Tukey HSD para cada caso en estudio, los resultados se detallan en los ANEXOS 4

Caracterización del modelo de disolución

Para caracterizar el proceso de disolución se determinó la eficiencia de disolución o liberación (EF %), el tiempo medio de disolución (MDT) y la constante de disolución (K_d) de las máximas cantidades liberadas de aluminio en los

diferentes medios de disolución. Para determinar la eficiencia de liberación del aluminio, se trabajó con los datos que representan la máxima liberación de aluminio en los diferentes medios (500 mg de arcilla) ANEXO 5

La eficiencia de liberación porcentual, se calculó a partir de las curvas acumulativas de aluminio liberado mediante la ecuación siguiente.⁸¹

$$EF(\%) = \frac{AUC_0^T}{Q_{100} \times T} \times 100$$

El tiempo medio de disolución se calculó a partir de las curvas acumulativas de la cantidad de aluminio liberado en función del tiempo mediante la siguiente ecuación.

$$MDT = \frac{\sum[t_i \times \Delta Q_i]}{Q_\infty}$$

La constante de disolución se determinó con los logaritmos naturales de la cantidad de fármaco remanente en el lugar de disolución $[\ln(Q_T - Q)]$, en seguida se hace la regresión lineal de $[\ln(Q_T - Q)]$ frente al tiempo en donde la pendiente es la constante de disolución.

Tabla 14. Eficiencia de liberación y tiempo medio de disolución del aluminio en los diferentes medios

Medios	EF%	MDT (min.)	K_d (min⁻¹)
pH 1.2	76.18	21.44	0.014
pH 4.5	85.71	12.86	0.036
pH 6.8	89.08	8.80	0.012
J. Gástrico	87.96	8.74	0.031
J. Intestinal	89.21	8.01	0.107

La arcilla presenta mayor eficiencia de liberación de aluminio cuando se ensaya en medio Jugo intestinal simulado, pH 6.8, jugo gástrico simulado, pH 4.5 y pH 1.2 respectivamente.

En relación al tiempo medio de liberación de aluminio, se evidencia un mayor MDT cuando se ensaya en medio pH 1.2, pH 4.5, pH 6.8, jugo gástrico simulado y Jugo intestinal simulado respectivamente.

5. RESULTADOS DE ENSAYOS *In vivo*

Tras los resultados obtenidos de las pruebas *in vitro*, es evidente la necesidad de desarrollar ensayos toxicológicos *in vivo* con la finalidad de determinar si existe la posibilidad de que el aluminio liberado por la arcilla pasa a circulación lo cual podría producir una intoxicación crónica en los consumidores, además es importante determinar la cantidad de aluminio que podría ser eliminado.

El uso de animales en experimentación va en paralelo al desarrollo de la medicina, cuyas raíces provienen de la Grecia antigua. Según Baumans (2005) la creciente demanda de modelos animales de calidad, junto con las críticas vertidas sobre el modo en que se utilizan los animales, ha llevado a la aparición de una rama multidisciplinaria de la ciencia denominada ciencia de los animales de laboratorio, que se rige por los principios cardinales de las tres erres: reemplazo, reducción y refinamiento, formuladas por Russell y Burch en 1959.³⁵⁻³⁸



Figura 12. Extracción de sangre

Por otro lado, el uso de animales en la investigación, enseñanza y pruebas, es aceptable solamente si contribuye en forma efectiva a la mejor comprensión de principios biológicos fundamentales, o al desarrollo de conocimientos que, razonablemente, podemos esperar que beneficien a los seres humanos o a los animales.³⁹

Considerando que el animal de laboratorio es “cualquier especie animal que se mantiene bajo condiciones determinadas y se utiliza con fines científicos”,⁸²⁻⁸⁴ para el desarrollo del presente trabajo de investigación, se utilizaron un total de 24 ratas machos albinas Wistar de la especie *Rattus norvegicus* provenientes del Bioterio de la Universidad Católica de Santa María. Los animales fueron ambientados 15 días antes del desarrollo del ensayo alimentándolos con maíz, trigo y agua *ad libitum* tal y como se indica en muchos trabajos de investigación desarrollados con este tipo de animales.⁸⁵⁻⁸⁷ Además, estos fueron albergados en jaulas individuales como se describió en el proyecto de investigación.

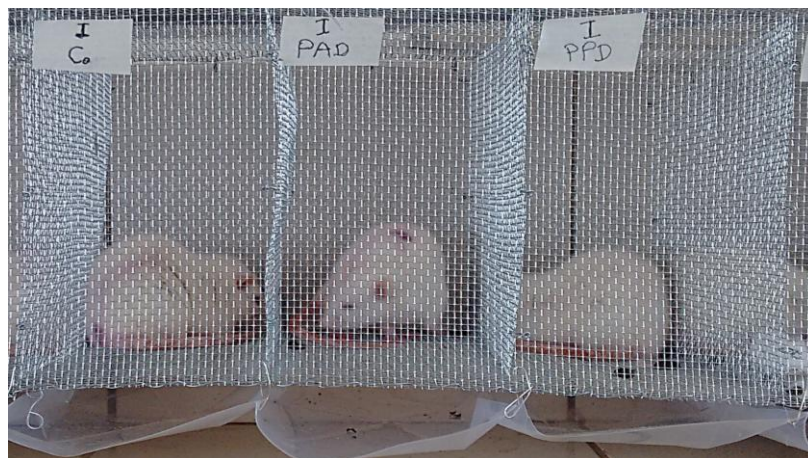


Figura 13. Diseño de jaulas

Así mismo, los pesos promedio de las ratas fueron de 225 ± 5 gramos (ANEXO 6) y el total de ellos fueron distribuidos al azar en tres grupos de trabajo los cuales fueron tratadas de la siguiente manera.

Tabla 15. Grupos de trabajo y tipos de tratamientos

Grupo	Tratamiento
Control negativo	2 mL de agua ultra pura en ayunas
Do 1	50 mg de arcilla por kg de peso en ayunas
Do 2	500 mg de arcilla por kg de peso en ayunas

Cabe señalar que durante el desarrollo de la investigación, se hizo todo lo posible por cumplir con las 3 R formuladas por Russell y Burch en 1959 en relación al uso de animales en laboratorio, además no se registraron problemas o decesos en los animales durante el periodo experimental.

5.1. Resultados de ensayo *in vivo* en muestras de sangre

No hay evidencias que indiquen que el aluminio cumpla una función esencial en animales o humanos y no se ha podido identificar ningún síntoma asociado a la deficiencia de aluminio. Sin embargo algunos trabajos en animales indicarían una posible función biológica que necesita ser estudiada más a fondo. Es interesante notar que, debido a su abundancia en la naturaleza, es difícil diseñar experimentos donde no haya contaminaciones con trazas de aluminio. Por esta razón es difícil identificar síntomas asociados con una deficiencia en aluminio. La mayor parte de los compuestos de aluminio son sumamente estables y muy pocas de las formas que se encuentran en la naturaleza son asimilables por el organismo. Consistentemente con estas características, los problemas asociados con la exposición al aluminio se han incrementado sustancialmente desde principios del siglo XX y se los considera consecuencia de que en este período ha crecido rápidamente la actividad de las industrias que usan compuestos de aluminio de mayor biodisponibilidad.

De las tres vías por las que una sustancia puede entrar al organismo (oral, dérmico y respiratorio) las características químicas de los compuestos de aluminio hacen que la vía dérmica sea la menos importante. La principal población de riesgo

para la exposición por vía respiratoria está formada por los trabajadores de fundiciones de aluminio y otras industrias relacionadas. El aluminio contenido en el aire de estos ambientes de trabajo usualmente está en forma de partícula e ingresa por los pulmones donde tiende a acumularse.⁸⁸

Además, se considera que la principal vía de exposición al aluminio para la población general es la oral (alimentos y algunos medicamentos). El aluminio que ingresa por esta vía se absorbe a nivel intestinal. Si bien aún no han sido totalmente aclarados los mecanismos de esta absorción se sabe que el proceso es fuertemente dependiente de la forma química en la que se lo encuentra y de la presencia de sustancias capaces de complejarlo (por ejemplo el citrato) que, al formar estructuras solubles aumentan la absorción del metal a nivel celular.^{65, 88, 89}

Considerando las principales vías de ingreso del aluminio, es que tras la administración de las dos dosis de la arcilla vía oral (ayunas), las muestras de sangre fueron extraídas del plexo venoso retro-orbital durante un periodo de 24 horas extendidas en: 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 14, 18 y 24 horas; posteriormente las muestras fueron digeridas y analizadas por triplicado en el ICP-OES.

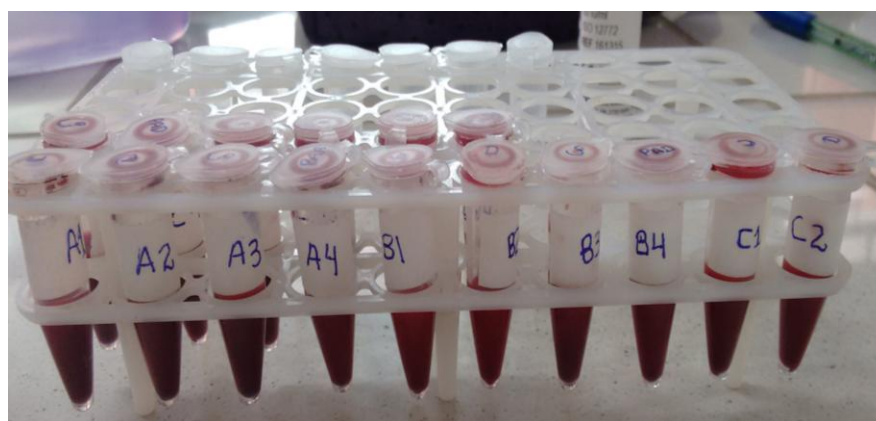


Figura14. Muestras de sangre

En el ANEXO 7 se muestran resultados promedio de las concentraciones de aluminio en sangre y en el figura 15 se muestran las líneas de tendencia comparativas de dichos resultados.

Tabla 16. Anova del control negativo de muestras sanguíneas

<i>F</i>	<i>Valor crítico para F</i>	<i>Probabilidad</i>
0.466	2.017	0.893

En la tabla 16 se muestran datos del control negativo al cual se les realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía determinándose que no existía diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) en las concentraciones de aluminio a los diez tiempos ensayados, lo cual indica que no hay evidencia de variabilidad de los datos producida por factores internos y/o externos durante el periodo experimental.

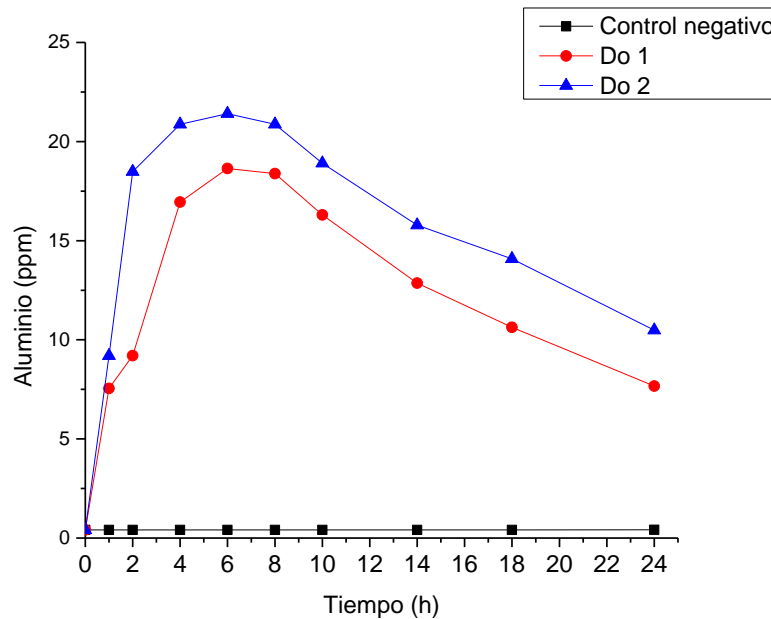


Figura 15. Aluminio en sangre de los tres grupos de estudio

En el figura 15 se observa las tres líneas de tendencia correspondientes de los tres grupos de trabajo. En el grupo control negativo se evidencia que las concentraciones

de aluminio no varían conforme pasa el tiempo, lo cual es un indicativo de que no hubieron influencias internas y/o externas que afectaron el desarrollo del ensayo.

En relación a las líneas de tendencia correspondiente a los tratamientos Do1 y Do2, se observan un incremento exponencial de la concentración de aluminio en las primeras 6 horas, a partir de las 8 horas, se evidencia el decaimiento de ambas líneas de tendencia lo cual indica que la concentración de aluminio en sangre disminuye en función del tiempo. Además, se observa que a mayor dosis de arcilla administrada, mayor es la cantidad de aluminio liberado y por ende mayor es la cantidad detectada en sangre. Así mismo, después de 24 horas de administrada la arcilla, las cantidades de aluminio decrecen.

Hasta hace poco tiempo se consideraba al aluminio como un elemento inerte con relación al hombre. En la actualidad no se le atribuye ninguna función positiva en la fisiología humana. A pesar de la abundancia y ubicuidad de este elemento en el ambiente se encuentra en concentraciones muy pequeñas en diversos tejidos del organismo, lo que demuestra la existencia de barreras fisiológicas de protección a sus efectos.⁹⁰

Es importante mencionar que en el presente trabajo de investigación, la administración de la arcilla a los animales de experimentación fue vía oral y en ayunas, dado que, se ha supuesto que la presencia de alimentos en el estómago inhibe la absorción de aluminio, debido a la asociación de aluminio con ligandos orgánicos presentes en los alimentos. Sólo unos pocos estudios han apoyado directamente esta hipótesis.⁸⁹ Por otro lado, Walton y colaboradores llevaron a cabo un ambicioso estudio para evaluar los efectos de bebidas y alimentos en la absorción de aluminio por vía oral. Sus resultados muestran un aumento de la concentración sérica máxima de aluminio y la excreción urinaria de aluminio tras la coadministración con zumo de naranja, y en menor medida, el café y el vino. Por otro lado, se menciona que la carne y productos a base de carbohidratos y cereales podrían disminuir la absorción de aluminio^{89, 91}.

En relación a la influencia de factores biológicos en la absorción de aluminio administrado vía oral, algunas investigaciones sugieren que la uremia parece

aumentar la absorción del aluminio mediante el aumento de la permeabilidad del intestino de la vía paracelular.⁹² El argumento de que la absorción de aluminio se ve reforzada en el estado urémico se apoya en el trabajo de investigación relacionada a la absorción gastrointestinal de aluminio en ratas urémicas, en donde para investigar la posibilidad de mejorar la absorción gastrointestinal de aluminio en estado urémico, se midió la excreción urinaria de aluminio de ratas después de una carga oral de 11 mg y 15 mg de aluminio vía endovenosa, se determinó que las ratas urémicas excretan significativamente menos aluminio durante las primeras 24 horas por lo que se asume que la absorción gastrointestinal de aluminio se aumenta en ratas urémicas.⁹³

Aunque los alimentos comprenden la fuente primaria de aluminio para el ser humano, existen muy pocos datos sobre la biodisponibilidad oral de aluminio de alimentos o bebidas que no sean agua. Por otro lado, es probable que tras un consumo crónica de la arcilla, la acumulación de aluminio pueda efectuarse, debido no solo a la excreción disminuida o a la absorción aumentada del intestinal, sino también al solo hecho de consumir en forma continua productos que contienen dicho metal como es la arcilla. En tal sentido es importante mencionar que la exposición a altos niveles de aluminio, puede causar serios problemas para la salud.^{94, 95} es así que existen numerosos estudios que han examinado el potencial del aluminio para inducir efectos tóxicos en los seres humanos expuestos a través de la inhalación, exposición cutánea o vía oral. La mayoría de estos hallazgos están respaldados por un gran número de estudios en animales de laboratorio y estudios de exposición en el trabajo. Los estudios en animales sugieren que los pulmones y el sistema nervioso pueden ser los objetivos más sensibles de toxicidad tras la exposición por inhalación.⁹⁶

Hay una extensa base de datos sobre la toxicidad oral de aluminio en animales. Estos estudios identifican claramente al sistema nervioso como el objetivo más sensible de la toxicidad del aluminio y la mayoría de los estudios en animales se han centrado en la neurotoxicidad y la toxicidad del desarrollo neurológico. Otros efectos adversos que han sido observados en los animales expuestos a aluminio por

vía oral incluyen eritropoyesis deteriorada en ratas expuestas a 230 mg de aluminio/kg/día, el daño de los eritrocitos se evidencia por la disminución de la hemoglobina, el hematocrito, eritrocitos con fragilidad osmótica, y eritrocitos alterados morfológicamente. Además, se reporta retrasos en la maduración de las crías tras la exposición de ratas a 53 mg de aluminio/kg/día, y la disminución de la ganancia de peso corporal de las crías de ratas y ratones expuestos a 103 mg de aluminio/kg/día.⁹⁶

Por otro lado, la enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurodegenerativo, que se manifiesta clínicamente como un deterioro progresivo de la memoria y la cognición. Las características neuropatológicas primarios de la enfermedad de Alzheimer son la pérdida neuronal y la formación de ovillos neurofibrilares, placas seniles con depósitos de amiloide y los hilos del neuropilo, y la deposición amiloide cerebrovascular.⁹⁷ La etiología de la enfermedad de Alzheimer es compleja, con la genética juegan un papel crítico; también hay pruebas de que el medio ambiente puede modificar el riesgo.

La posible asociación entre el aluminio y la enfermedad de Alzheimer se propuso hace más de 40 años; un gran número de estudios evidencian la relación entre el aluminio y la enfermedad de Alzheimer.⁹⁷ Estos estudios incluyen elevados niveles de aluminio en el cerebro de las personas con enfermedad de Alzheimer.

Tabla 17. Anova de muestras sanguíneas de los tres grupos de ensayo

<i>Tiempo (h)</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico para F</i>	<i>Probabilidad</i>
0	0.059		0.942
1	4771.827		1.220E-28
2	2006.007		1.057E-24
4	1642.824		8.506E-24
6	2380.148		1.770E-25
8	1722.771	3.467	5.181E-24
10	3309.195		5.636E-27
14	3166.846		8.929E-27
18	3940.686		9.054E-28
24	2855.705		2.635E-26

Es importante mencionar que ciertos estudios indican que los metales desempeñan un papel catalizador importante en la producción de radicales libre, y la atención se ha centrado en el papel de muchos metales en la enfermedad de Alzheimer, incluyendo hierro, aluminio, mercurio, cobre y zinc.^{98, 99}

Además, se realizó el análisis de varianza a todos los datos de los tres grupos de experimentación (tabla 17). Los valores de F indican que no existe diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) en las concentraciones de aluminio en el tiempo 0 (basal) entre los tres grupos de ensayo, sin embargo se evidencian diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en las concentraciones de aluminio en el resto de tiempos de ensayo entre los tres grupos.

Para determinar entre que subgrupos de los analizados anteriormente se evidencia diferencias o semejanzas, se realizó la prueba post-hoc de Tukey HSD para cada caso en estudio, los resultados se detallan en los ANEXOS 8

Analizando los datos en el programa OriginPro 9.0, la ecuación que describe la absorción de aluminio tiene las siguientes características (tabla 18). La ecuación que describe la cantidad de aluminio que pasa a la sangre por unidad de tiempo, corresponde a una ecuación de primer orden.

Tabla 18. Características de la ecuación que describe la absorción de aluminio en animales de experimentación

Model	Nelder		
Equation	$y = (x + a) / (b_0 + b_1 * (x+a) + b_2 * (x+a)^2)$		
Ecuación	$y = (x + 0.009) / (0.079 + 0.014 * (x+0.009) + 0.003 * (x+0.009)^2)$		
Reduced Chi-Sqr	1.013		
Adj. R-Square	0.978		
		Value	Standard Error
	a	0.009	0.078
[Al]	b0	0.079	0.012
	b1	0.014	0.004
	b2	0.003	3.41E-04

5.2. Resultados de ensayos *in vivo* en muestras de orina

El aluminio, una vez absorbido, se distribuye en la mayoría de los órganos dentro del cuerpo, con la acumulación que se produce principalmente en el hueso a dosis altas. En un grado limitado, pero aún no determinado, el aluminio pasa a la sangre - barrera del cerebro y también se distribuye en el feto. El aluminio se elimina de manera efectiva en la orina (OMS, 1997). Considerando la toxicocinética del aluminio y sus principales vías de eliminación (orina)⁷¹, se tomaron muestras de orina a las 24, 48, 72 y 96 horas. Las muestras fueron diluidas en HNO₃ al 3 % y posteriormente analizadas por triplicado en ICP-OES.

En el ANEXO 9 se muestran resultados promedio de las concentraciones de aluminio en orina con los cuales se realizó la figura 16, en donde se observan tres líneas de tendencia correspondientes a los tres grupos de trabajo. En el grupo control negativo se observa que las concentraciones de aluminio en muestras de orina no varían conforme transcurre el tiempo, lo cual es un indicativo de que no hubieron influencias internas y/o externas que afectaron el desarrollo del ensayo.

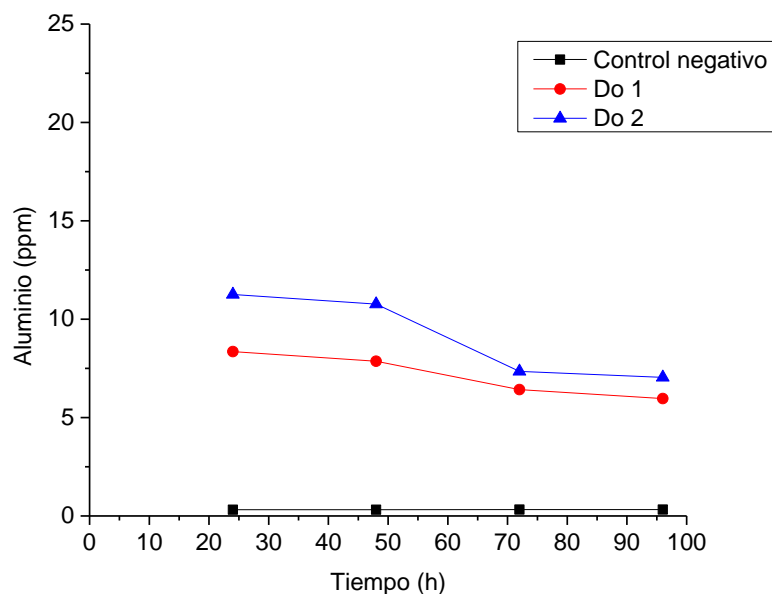


Figura 16. Aluminio en orina de los tres grupos de estudio

En relación a las líneas de tendencia correspondiente a los tratamientos Do1 y Do2, se observa un incremento exponencial de la concentración de aluminio a las 48 horas, posteriormente se observa el decaimiento de ambas líneas de tendencia lo cual indica que la eliminación del aluminio por orina disminuye en función del tiempo.

Además, se observa que a mayor dosis de arcilla administrada, mayor es la cantidad de aluminio excretado vía urinaria. Es importante mencionar que las concentraciones finales de aluminio de los tratamientos Do1 y Do2 a las 96 horas, no logran alcanzar concentraciones similares a las del grupo control, esto indica que la totalidad del aluminio no fue eliminado por lo que podría existir la acumulación de una parte de este metal en los órganos blancos.

Considerando que la principal vía de excreción del aluminio es la vía renal, la función renal reducida aumenta el riesgo de acumulación del aluminio lo cual podría conllevar a una toxicidad en el ser humano.⁸⁹

En algunos estudios se ha observado un aumento de la acumulación progresiva de los metales en la orina y tejidos de ratas en el siguiente orden: riñón, hígado, corazón y cerebro.¹¹ por otro lado, se estima que el riñón es capaz de eliminar hasta 500 µg de aluminio (18 µmol) por día.⁹⁰

Algunos datos adicionales relacionados a la excreción del aluminio vía renal se detallan más adelante.

Para determinar la variabilidad de las concentraciones de aluminio en las muestras de orina del control negativo durante el periodo experimental, se realizó un análisis de varianza en donde no se reportó diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) de dichas concentraciones durante el periodo experimental. Por lo que se puede afirmar que no hubo influencias externas y/o internas que pudieran afectar los datos.

Tabla 19. Anova del control negativo de muestras de orina

<i>F</i>	<i>Valor crítico para F</i>	<i>Probabilidad</i>
0.200	2.947	0.895

Además, se realizó el análisis de varianza de los datos urinarios de los tres grupos de experimentación (tabla 20). Los valores de F evidencian diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en las concentraciones de aluminio en orina entre los tres grupos de ensayo como se observa en el figura 16.

Tabla 20. Anova de muestras urinarias de los tres grupos de ensayo

<i>Tiempo (h)</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico para F</i>	<i>Probabilidad</i>
24	5553.203		2.490E-29
48	4473.135	3.467	2.401E-28
72	2876.575		2.442E-26
96	2002.443		1.077E-24

Para determinar entre que subgrupos de los analizados anteriormente se evidencian diferencias o semejanzas, se realizó la prueba post-hoc de Tukey HSD para cada caso en estudio, los resultados se detallan en los ANEXOS 10

6. TOXICOCINÉTICA DEL ALUMINIO

Entendiéndose por toxicocinética el estudio cuantitativo de los procesos que experimenta un xenobiótico, en función del tiempo, en un organismo vivo, es que en forma general los xenobióticos, y en este caso el aluminio, sufren un conjunto de procesos una vez ingeridos.

Dentro de este conjunto de acciones se encuentran la absorción, distribución, metabolismo y excreción, cuyos datos una vez adquiridos, son susceptibles de un tratamiento cinético o evaluación matemática con relación al tiempo.⁷³

Como parte del estudio de la absorción del aluminio proveniente de la arcilla, con los datos obtenidos del ensayo *in vivo*, se determinaron algunos parámetros de biodisponibilidad como concentración máxima (C_{max}), tiempo máximo (T_{max}) y área bajo la curva (AUC), en donde se evidencia una relación directamente proporcional entre la cantidad de arcilla administrada y el incremento de los parámetros de absorción. Además de determinaron parámetros toxicocinéticos como la constante

de absorción (K_{abs}), tiempo medio de absorción ($T_{1/2\ abs}$), constante de eliminación (K_e) y tiempo medio de eliminación ($T_{1/2e}$).

Tabla 21. Parámetros de biodisponibilidad y toxicocinéticos del aluminio.

	Do 1 (50mg/kg)	Do 2 (500mg/kg)
C_{max} (mg/L)	18.644 ± 0.876	21.406 ± 0.968
T_{max} (h)	6	6
AUC (mg.h/L)	466.856	708.663
K_{abs}	0.051	0.568
$T_{1/2\ abs}$	13.555	1.220
K_e	0.501	0.040
$T_{1/2e}$	1.383	17.493

En relación a la absorción, esta se define como su entrada en el torrente circulatorio, lo que es diferente de ingestión o inhalación. Recordemos que las membranas celulares, al estar constituida por una elevada porción de lípidos, significan una gran barrera para el agua y los productos hidrosolubles. Por el contrario, las sustancias liposolubles se difunden a través de la membrana con tanta mayor facilidad cuanto mayor es su coeficiente de partición lípido-agua, dentro de unos límites.⁷³

En relación al aluminio, una pequeña fracción de este se convierte en sistémica a través de procesos que aún no se han dilucidado, pero se cree que involucran mecanismos paracelulares pasiva o difusión transcelular.

Por otro lado, se cree que un mecanismo mediado por ácido carboxílico mejora la absorción en el tracto gastrointestinal del aluminio. En algunos trabajos llevados a cabo en animales de experimentación, refieren la siguiente absorción relativa de compuestos de aluminio en ratas: citrato > lactato > sulfato de sacarosa > cloruro > hidróxido > glicinato > borato.¹⁰⁰

Otras publicaciones mencionan que cationes de aluminio trivalentes pueden bloquear la absorción de fósforo trivalente bioesencial o aniones fosfato.^{101, 102}

La absorción gastrointestinal de aluminio también puede estar influida, entre otros factores, por el metabolismo del hierro. Ambos elementos parecen compartir

una serie de propiedades comunes tales como la utilización conjunta de la transferrina como proteína transportadora plasmática, los depósitos conjuntos de hierro y aluminio en los lisosomas de la médula ósea y la afinidad similar por determinados quelantes.^{94, 103}

Es importante mencionar que el pH puede influir mucho en la especiación de aluminio, y, presumiblemente en la biodisponibilidad de este tal y como se evidenció en los resultados hallados en los ensayos in vitro.

Cabe resaltar que la capacidad de citrato para incrementar la biodisponibilidad oral de aluminio ha recibido mucha atención. Greger y colaboradores,^{71, 92, 104} han propuesto tres mecanismos principales: a) el citrato mejora la solubilidad del aluminio en el intestino, b) el citrato transporta el aluminio dentro de las células de la mucosa y c) el citrato apertura las uniones estrechas epiteliales. Por otro lado, según las investigaciones de Taylor y colaboradores los diferentes tiempos de picos de aluminio sérica máxima y citrato después del consumo de citrato de aluminio sugieren que el aluminio no se libera en la sangre como citrato de aluminio.¹⁰⁵ Otros estudios llevados a cabo sugieren que el aumento de la absorción de aluminio después de la administración de aluminio citrato se produce en el intestino proximal a través de la ruta paracelular, debido a la apertura de las uniones estrechas celulares.¹⁰⁶

Finalmente, se postula que cuando los cationes de aluminio se encuentran con las secreciones alcalinas tamponadas del intestino, este precipita como hidróxidofosfato de aluminio y no está disponible para su absorción. sin embargo, el citrato y la disponibilidad de otros aniones orgánicos (ascorbato, gluconato, lactato, malato, oxalato y tartrato) pueden formar complejos con el aluminio para formar compuestos que son solubles a pH alcalino y por lo tanto disponible para su absorción.¹⁰⁷

En relación a la distribución del aluminio, se estima que el aluminio sistémico se une a las proteínas séricas o aniones y se distribuye rápidamente a otros tejidos en todo el cuerpo. Aproximadamente, 89% del aluminio de llegar a la sangre se une con la transferrina, y el resto se une principalmente al citrato.^{99, 108} Una vez que el

aluminio se encuentra en el torrente sanguíneo, se distribuye ampliamente a los diversos tejidos del cuerpo en un patrón que pueden ser paralelas a la densidad de la transferrina de receptores dentro de los tejidos. En un trabajo de investigación en donde el hidróxido de aluminio inyectado por vía intramuscular en conejos, se halló el siguiente patrón de redistribución en tejido: riñón > bazo > hígado > corazón > linfático > cerebro.^{109, 110} Además, el modelo en ratas sigue el mismo patrón, y la adición de análisis de aluminio en huesos mostraron que la deposición ósea es muy superior a la de los riñones, con un valor que se duplicó en ratas urémicas.¹¹¹ Sobre la base de estos los estudios, se afirma que el hueso es el principal reservorio a largo plazo del aluminio sistémico ya sea después de la ingestión o inyección en humanos.¹⁰²

Finalmente, en relación a la distribución de aluminio, se ha evidenciado que en pacientes con niveles bajos de hierro y ferritina elevada, se produce un incremento de la unión del aluminio a la transferrina, lo que resulta en un incremento de la cantidad total de aluminio a pesar de niveles plasmáticos normales o poco elevados. De esa forma el aluminio puede dar lugar a problemas en la utilización de hierro o interferir en la biodisponibilidad de las reservas de hierro para la eritropoyesis. Secundariamente, eso puede inducir aumento de las resistencias a EPO.⁹⁵

En relación a la excreción del aluminio se puede mencionar que la retención de este metal se ve directamente afectado por la excreción, tanto en ratas como en seres humanos. En ese sentido, Xu y colaboradores determinaron que el 66-70% de aluminio inyectado se excreta en 24 horas.¹¹²

Por otro lado, es importante resaltar que la observación a largo plazo de las concentraciones de aluminio en excretas y el cuerpo, reveló excreciones de aluminio > 50% durante las primeras 24 horas, 85% a los 13 días, y el 96% en 1178 días posteriores. Además, se sugiere que la eliminación del aluminio sigue una función de potencia que ofrece una liberación inicial rápida seguida de componentes sucesivamente a más largo plazo. El resultado podría sugerir una acumulación lenta global de aluminio en el cuerpo durante toda la vida.¹⁰²

Estas referencias sobre la excreción del aluminio vía renal, confirman nuestros hallazgos, ya que como se observa en la figura 16 la concentración de aluminio en la orina a las 24 horas, cuando se ensaya con la Do 1, es de 8.351 ± 0.298 mg/L, el cual comparada con la máxima concentración de aluminio en sangre de este mismo grupos, representa el 44.79%, este valor representa el porcentaje de aluminio excretado vía urinaria en las primeras 24 horas en el grupo Do 1. En relación al grupo Do 2, la máxima concentración de aluminio excretado vía renal es de 11.257 ± 0.358 mg/L que representa un porcentaje de eliminación del 52.59% en las primeras 24 horas.

Además, como parte del análisis de excreción de aluminio por la orina, en el presente trabajo de investigación, se determinó los volúmenes urinarios (ANEXO 11) y se determinó el clearance renal para cada grupo de estudio.

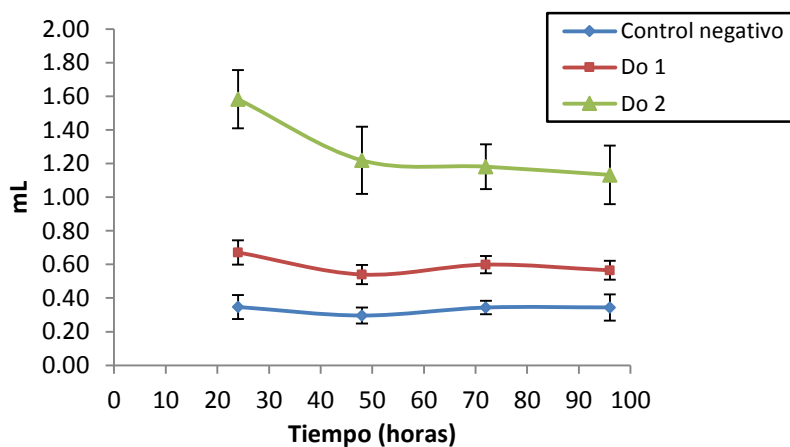


Figura 18. Volumen urinario

En el figura 18 se evidencia que el volumen urinario (mL) es mayor en el grupo de ratas que fueron tratadas con la Do 2 seguida del grupo de Do1. Además se evidencia que el volumen urinario decrece paulatinamente en función del tiempo.

Como parámetros cinéticos de excreción de aluminio se determinó el clearance renal con la siguiente ecuación.⁷³

$$CL = \frac{U \times V}{P}$$

Dónde:

U = Concentración de aluminio en orina

V = volumen urinario por minuto

P = concentración plasmática de aluminio

Considerando las máximas concentraciones de aluminio hallados en muestras de sangre y orina, se determinó que el clearance renal para el control negativo, Do 1 y Do 2 fue de 0.278 mL/min, 0.407 ml/min y 1.181 mL/min respectivamente. Por lo que es evidente una mayor depuración o funcionamiento renal cuando se ensaya con mayores cantidades de arcilla o como es lo mismo, cuando existe mayor concentración de aluminio en circulación sanguínea. Por otro lado, es importante mencionar que algunos reportes indican que el riesgo de intoxicación por aluminio aumenta fuertemente si hay una disfunción renal.^{65, 89}

Por otro lado, se determinó la cantidad de aluminio excretado por orina cuyos valores numéricos estas en el ANEXO 12 y se muestran en la figura 19.

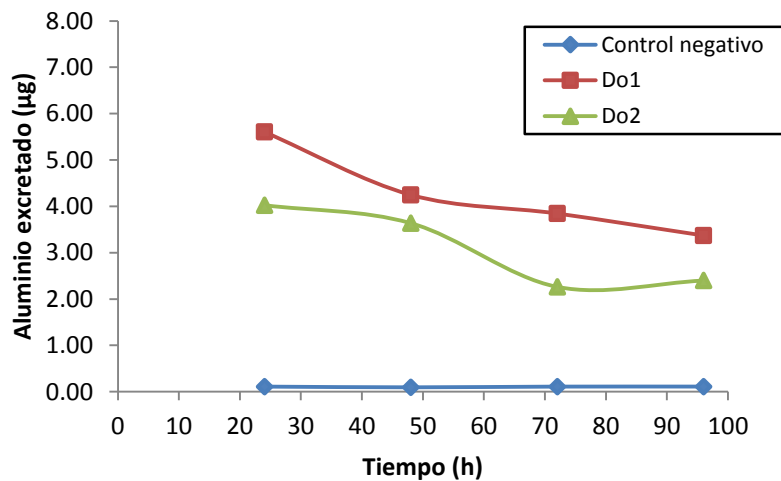


Figura 19. Cantidad excretada de aluminio

Considerando que la principal vía de exposición al aluminio para la población general es la oral. El aluminio que ingresa por esta vía se absorbe a nivel intestinal. Si bien aún no han sido totalmente aclarados los mecanismos de esta absorción se sabe que el proceso es fuertemente dependiente de la forma química en la que se lo encuentra y de la presencia de sustancias capaces de complejarlo (citrato) que, al formar estructuras solubles aumentan la absorción del metal a nivel celular. Algunos autores mencionan que menos del 1 % del aluminio ingerido es absorbido en el intestino y pasa a circulación constituyendo este órgano la primera barrera protectora.⁷¹ Además, se indica que, la mayor parte del aluminio absorbido por el tracto intestinal es excretado por orina (segunda barrera protectora).⁸⁸

En individuos con riñones funcionalmente normales un incremento en la ingesta de aluminio (por ejemplo por consumir algunos antiácidos) genera un aumento tanto en la absorción intestinal como en la excreción urinaria manteniéndose relativamente estables los niveles plasmáticos (no se conocen bien los mecanismos que permiten esta regulación). En cambio un porcentaje importante del aluminio que ingresa por vía respiratoria (usualmente en forma particulada) permanece en los pulmones.

Como ya se mencionó la principal población de riesgo de intoxicación por aluminio está formada por los pacientes con disfunción renal. Según la OMS el elevado valor de la DL50 del aluminio (500mg/kg) indica que su toxicidad aguda es baja. La cantidad de aluminio que debería ingerir una persona sana en una sola dosis para intoxicarse gravemente es muy alta y es muy difícil lograrla. Y esto se refleja en los datos epidemiológicos: si bien en ciertos casos algunos compuestos de aluminio pueden causar dermatitis por contacto, la intoxicación aguda asociada con aluminio es sumamente rara.⁸⁸ Sin embargo, la principal preocupación respecto a los efectos que la exposición al aluminio puede tener sobre la salud de la población en general, se centra en los casos en los que el ingreso al organismo es excesivo. Estos casos están circunscriptos a las personas que ingieren en forma habitual grandes cantidades de compuestos de aluminio (consumo regular de antiácidos o hábitos geofágicos que puede resultar en una acumulación), en un periodo relativamente corto o pequeñas

cantidades de compuestos de aluminio en un periodo de tiempo largo por lo que es posible que se produzca una intoxicación crónica.^{44, 53, 88}

Entre otros datos, no se han encontrado evidencias que indiquen que el aluminio sea cancerígeno o mutagénico. Sin embargo algunos estudios realizados con animales han demostrado que tiene propiedades embriotóxicas. Los efectos dependen de las dosis, de la vía de administración y del estadio de desarrollo del embrión al momento de la exposición. Sin embargo es importante tener en cuenta que no se han observado efectos nocivos sobre el feto con mujeres que consumieron durante el embarazo antiácido conteniendo aluminio.⁸⁸

Por otro lado, los datos publicados sobre la biodisponibilidad oral de especies de aluminio presentes en las drogas incluyen hidróxido de aluminio; el antiácido sucralfato; lactato de aluminio, que se utiliza en los productos dentales para dientes sensibles; y de aluminio en presencia de citrato, muestran que los antiácidos/quelantes de fosfato tienen el potencial de producir un mayor incremento de absorción de aluminio de todas las fuentes. Esto presenta un problema cuando estos productos, que por lo general contienen hidróxido de aluminio, se consumen en grandes cantidades por personas cuya función renal está deteriorado.⁸⁹

Tabla 22. Concentraciones de aluminio en ensayos *in vivo* – *in vitro*.

Datos <i>in vivo</i>		Datos <i>in vitro</i>		
Tiempo	[Al]	Tiempo	[Al]	f'(X)
minutos	mg/L	minutos	mg/L	dx/dt
0	0.41	3	1.663	0.003
60	9.194	5	1.789	0.007
120	18.481	10	1.900	0.043
240	20.869	15	2.215	0.119
360	21.406	20	2.849	0.064
480	20.869	25	2.822	0.012
600	18.906	30	3.019	0.002
840	15.788	40	2.905	4.00E-05
1080	14.081	50	2.926	7.204E-7
1440	10.488	60	2.984	1.440E-8
		70	2.926	2.879E-10
		80	3.057	5.757E-12
		90	3.022	1.151E-13

Es importante mencionar que los aspectos toxicológicos asociados al consumo de aluminio contenido en los alimentos son menos claros. No hay suficiente información como para establecer una dosis máxima recomendable para la ingesta de aluminio presentes en alimentos.

Finalmente, y como parte del análisis global de los resultados, se realizó una análisis de *correlación in vivo in vitro* (IVIVC) con los datos que representan la mayor liberación de aluminio tanto *in vitro* (medio jugo intestinal simulado) como *in vivo* (Do2: 500mg/kg). En ambos casos y con fines comparativos, se uniformizaron unidades y se halló la primera derivada de los datos *in vitro*.

De los tres niveles de correlación existentes, se decidió utilizar el nivel A por representar una relación punto a punto entre la disolución “*in vitro*” y la velocidad de absorción “*in vivo*”. En tal sentido, la comparación IVIVC se realizó considerando los siguientes aspectos.

- Analizando el grado de superposición de las curvas
- Determinando la descripción matemática para ambas curvas

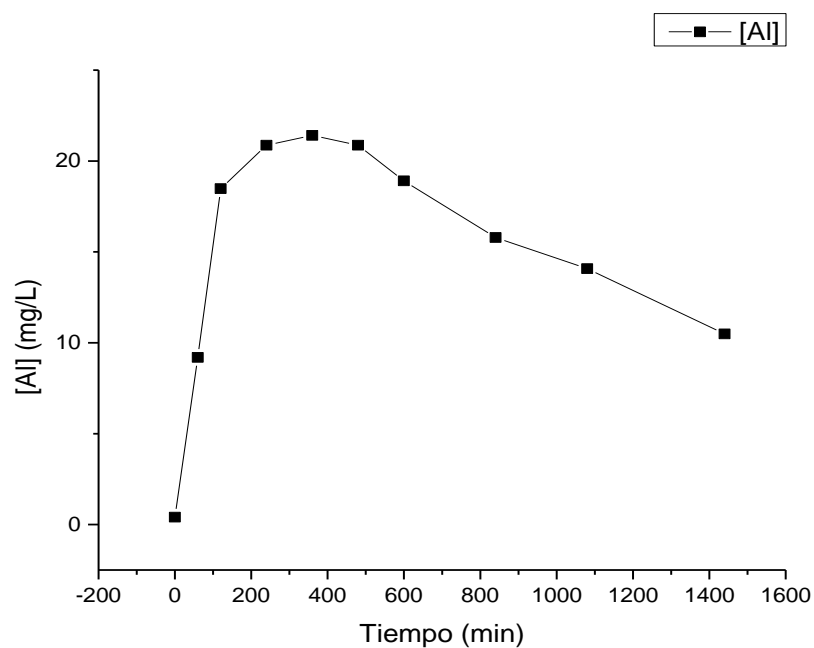


Figura 20. Concentraciones de aluminio *in vitro*

La ecuación matemática que describe los datos *in vivo* de liberación de aluminio es el modelo *Rational-Nelder* (R=0.978), cuyas valores y características se describen a continuación.

$$y = \frac{(x + 0.535)}{(4.702 + 0.014 * (x + 0.535) + 5.12E - 5 * (x + 0.535)^2)}$$

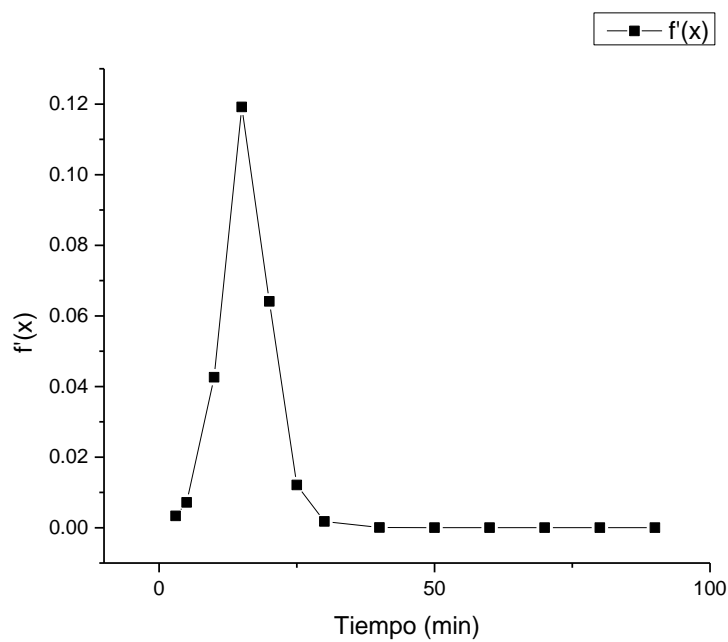


Figura 21. Primera derivada de las concentraciones de aluminio in vitro

La ecuación matemática que describe la primera derivada $f'(x)$ de los datos *in vitro* de la liberación de aluminio es el modelo *GaussAmp* (R=0.997), cuyas valores y características se describen a continuación.

$$y = 0.001 + 0.119 * \exp \left[-0.5 * \left(\frac{x - 15.637}{3.950} \right)^2 \right]$$

Tras analizar el grado de superposición de las curvas (figura 22), es evidente que no existe una IVIVC de nuestros datos.

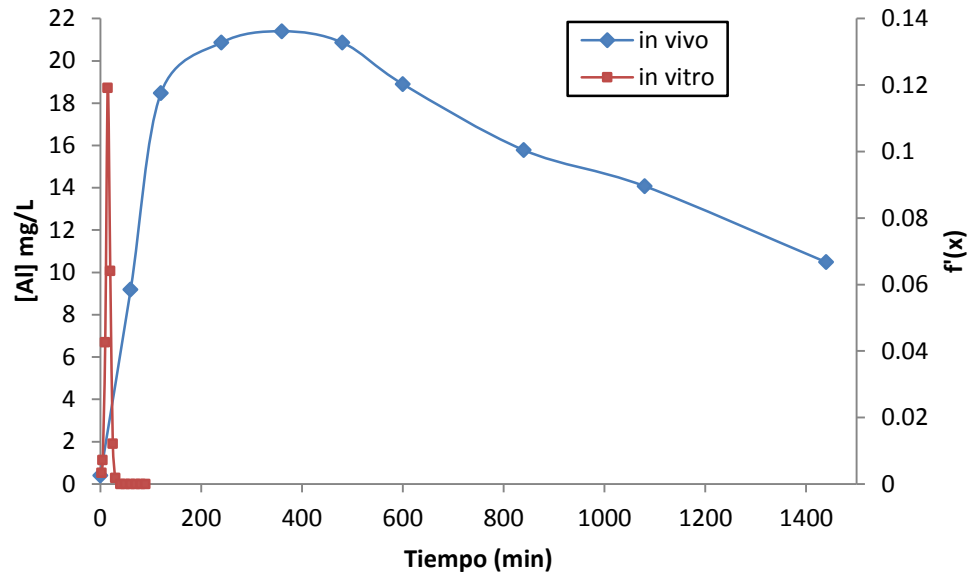


Figura 22. Superposición de curvas in vivo e in vitro

Por otro lado, analizando las ecuaciones que describen los procesos *in vivo* e *in vitro*, se tratan de ecuaciones totalmente distintas por lo que es evidente que no existe una IVIVC.

CONCLUSIONES

- 1) El “chaco” es una arcilla comestible cuyo pH en agua neutra es de 6.5, además el análisis de la arcilla en ICP-OES, determinó que la composición química es multielemental incluyendo micro-elementos como el selenio, cobre, hierro, cromo y zinc, hasta elementos considerados tóxicos para la salud como el plomo, cadmio, titanio, aluminio, etc.
- 2) El método de ICP-OES para la determinación de aluminio es exacto, preciso y sensible.
- 3) Los resultados *in vitro* evidencian que se produce una mayor liberación de aluminio cuando se ensaya con una mayor cantidad de arcilla (500m g), además la cantidad de aluminio disuelto *in vitro*, depende del tipo de medio de disolución observándose así, una mayor liberación de aluminio en jugo intestinal simulado a pH 7.2.
- 4) Los resultados *in vivo* determinan que la administración de Do1 (50mg/kg) y Do2 (500 mg/kg), producen un incremento exponencial de la concentración de aluminio en las primeras 6 horas alcanzando concentraciones máximas de 18.644 ± 0.976 y 21.406 ± 0.968 mg/L respectivamente. En relación a las muestras de orina, la concentración de aluminio a las 24 horas, cuando se ensaya con la Do 1, es de 8.351 ± 0.298 mg/L, el cual representa el 44.79% de aluminio excretado vía urinaria.. En relación al grupo Do2, la máxima concentración de aluminio excretado vía renal es de 11.257 ± 0.358 mg/L que representa un porcentaje de eliminación del 52.59%.

SUGERENCIAS

- 1) Realizar estudios similares con otros metales tóxicos liberados por la arcilla.
- 2) Analizar la posible acumulación del aluminio en los principales órganos.
- 3) Determinar la cantidad de aluminio que podría ser ingerido y que no represente un riesgo para la salud

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Carretero, M. I., Gomes, C. S. F., and Tateo, F. (2013) Clays, Drugs, and Human Health, *5*, 711-764.
- [2] Desideri, D., Meli, M., Roselli, C., and Feduzi, L. (2016) Simulation of the digestive process in the evaluation of radionuclide availability in pharmaceutical clays for internal use, *Microchemical Journal* *124*, 111-115.
- [3] Slamova, R., Trckova, M., Vondruskova, H., Zraly, Z., and Pavlik, I. (2011) Clay minerals in animal nutrition, *Applied Clay Science* *51*, 395-398.
- [4] Ketch, L. A., Malloch, D., Mahaney, W. C., and Huffman, M. A. (2001) Comparative microbial analysis and clay mineralogy of soil eaten by chimpanzees (*Pan troglodytes* and *troglodytes*) in Tanzania, *Soil Biology & Biochemistry*.
- [5] Parry, J., and Parry, B. (1992) Pica: symptom or eating disorder? A historical assessment, *British Journal of Psychiatry* *160*, 341-354.
- [6] Mwalongo, D., and Mohammed, N. K. (2013) Determination of essential and toxic elements in clay soil commonly consumed by pregnant women in Tanzania, *Radiation Physics and Chemistry* *91*, 15-18.
- [7] Hooda, P. S., Henry, C. J., Seyoum, T. A., Armstrong, L. D., and Fowler, M. B. (2004) The potential impact of soil ingestion on human mineral nutrition, *The Science of the total environment* *333*, 75-87.
- [8] Carretero, M. I. (2002) Clay mineral and their beneficial effects upon human health. A review, *Applied Clay Science* *21*, 155-163.
- [9] Tateo, F., Summa, V., Giannossi, M., and Ferraro, G. (2006) Healing clays: Mineralogical and geochemical constraints on the preparation of clay-water suspension ("argillic water"), *Applied Clay Science* *33*, 181-194.
- [10] Bhattacharyya, K., and Gupta, S. (2011) Removal of Cu(II) by natural and acid-activated clays: An insight of adsorption isotherm, kinetic and thermodynamics, *Desalination* *272*, 66-75.
- [11] Maisanaba, S., Pichardo, S., Puerto, M., Gutierrez-Praena, D., Camean, A. M., and Jos, A. (2015) Toxicological evaluation of clay minerals and derived nanocomposites: a review, *Environmental research* *138*, 233-254.
- [12] Reeuwijk, N. M., Talidda, A., Malisch, R., Kotz, A., Tritscher, A., Fiedler, H., Zeilmaker, M. J., Kooijman, M., Wienk, K. J., Traag, W. A., and Hoogenboom, R. L. (2013) Dioxins (polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzo-furans) in traditional clay products used during pregnancy, *Chemosphere* *90*, 1678-1685.
- [13] Broadwater, K., Meeker, J. D., Luksemburg, W., Maier, M., Garabrant, D., Demond, A., and Franzblau, A. (2014) Evaluation of the release of dioxins and PCBs during kiln-firing of ball clay, *Chemosphere* *94*, 70-75.
- [14] Selinus, O., Centeno, J., Finkelman, R., Fuge, R., Lindh, U., and Smedley, P. (2005) Essentials of Medical Geology: Impacts of the Natural Environment on Public Health., *Elsevier Academic Press*, 1024.

- [15] Centeno, J. A., Finkelman, R. B., and Selinus, O. (2005) Medical geology: impacts of the natural environment on public health., *Actas da XIV Semana de Geoquímica /VIII Congreso de Geoquímica dos Países de Língua Portuguesa, 1*, 15–22.
- [16] De sousa, C., and Baptista, J. (2007) Minerals and clay minerals in medical geology, *Applied Clay Science* 36, 4–21.
- [17] Abrahams, P., Follansbee, M., Hunt, A., Smith, B., and Wragg, J. (2006) Iron nutrition and possible lead toxicity: An appraisal of geophagy undertaken by pregnant women of UK Asian communities, *Applied Geochemistry* 21, 98-108.
- [18] Owumi, S. E., and Oyelere, A. K. (2015) Determination of metal ion contents of two antiemetic clays use in Geophagy, *Toxicology Reports* 2, 928-932.
- [19] Kikouama, J., Konan, K., Katty, A., Bonnet, J., Balde, L., and Yagoubi, N. (2009) Physicochemical characterization of edible clays and release of trace elements, *Applied Clay Science* 43, 135-141.
- [20] Volzone, C., and Ortiga, J. (2011) SO₂ gas adsorption by modified kaolin clays: influence of previous heating and time acid treatments, *Journal of environmental management* 92, 2590-2595.
- [21] Ding, M., Zuo, S., and Qi, C. (2015) Preparation and characterization of novel composite AlCr-pillared clays and preliminary investigation for benzene adsorption, *Applied Clay Science* 115, 9-16.
- [22] Roca, M., Vieira, R., Azevedo, D., Baschini, M., and Sapag, K. (2013) Improvement in the adsorption of thiabendazole by using aluminum pillared clays, *Applied Clay Science* 71, 55-63.
- [23] Gomes, C., and Silva, J. (2007) Minerals and clay minerals in medical geology, *Applied Clay Science* 36, 4-21.
- [24] Cai, J., Shen, B., Li, Z., Chen, J., and He, C. (2014) Removal of elemental mercury by clays impregnated with KI and KBr, *Chemical Engineering Journal* 241, 19-27.
- [25] Elmoubarki, R., Mahjoubi, F. Z., Tounsadi, H., Moustadraf, J., Abdennouri, M., Zouhri, A., El Albani, A., and Barka, N. (2015) Adsorption of textile dyes on raw and decanted Moroccan clays: Kinetics, equilibrium and thermodynamics, *Water Resources and Industry* 9, 16-29.
- [26] Fadil-Djenabou, S., Ndjigui, P., and Mbey, J. (2015) Mineralogical and physicochemical characterization of Ngaye alluvial clays (Northern Cameroon) and assessment of its suitability in ceramic production, *Journal of Asian Ceramic Societies* 3, 50-58.
- [27] Manahan, S. (2007) Introducción a la química ambiental, *Ed. Reveté Universidad Nacional Autónoma de México*.
- [28] Rodriguez, M. S., Sanchez, M. J., Andrades, M. S., and Sanchez, M. (2007) Modification of clay barriers with a cationic surfactant to improve the retention of pesticides in soils, *Journal of hazardous materials* 139, 363-372.
- [29] Callo, A. (2013) Remoción de arsénico con arcillas naturales “chacco” de ecosistemas contaminados, . *Universidad Católica de Santa María*.

- [30] Odilon, J., Konan, K., Katty, A., Bonnet, J., Baldé, L., and Yagoubi, N. (2009) Physicochemical characterization of edible clays and release of trace elements, *Applied Clay Science* 43, 135-141.
- [31] Maisanaba, S., Prieto, A. I., Pichardo, S., Jorda-Beneyto, M., Aucejo, S., and Jos, A. (2015) Cytotoxicity and mutagenicity assessment of organomodified clays potentially used in food packaging, *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 29, 1222-1230.
- [32] Dávila, G. (2009) Texto de Farmacia y Farmacocinética *Universidad Católica de Santa María*.
- [33] XXXV, U. (2012) Farmacopea de los Estados Unidos de América y Formulario Nacional, *USP35-NF30* 2.
- [34] Centro de Evaluación e Investigación de Farmacod, C. (2000) Extensión de los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia in vivo para formas posológicas orales sólidas de liberación inmediata en base a un sistema de clasificación de biofarmacéuticas. , *Departamento de salud y servicios humanos de los Estados Unidos*
- [35] Mrad, A. (2006) Ética en la investigación con modelos animales experimentales. Alternativas y las 3 RS de Russel., *Redalyc* 1, 163-183.
- [36] Rivera, E. A. (2002) Ética na experimentação animal, *SciELO*
- [37] Vinardell, M. P. (2007) Alternativas a la Experimentación Animal en Toxicología: Situación Actual, *SciELO Acta Bioethica*
- [38] Comité Asesor de Bioética, F.-C. (2009) “Aspectos Bioéticos de la Experimentación Animal”.
- [39] CCPA, M. (1998) Principios Éticos de la Investigación con Animales, *III*, CCPA, Manual.
- [40] Stefánsson, A., Gunnarsson, I., and Giroud, N. (2007) "New methods for the direct determination of dissolved inorganic, organic and total carbon in natural waters by Reagent-Free Ion Chromatography and inductively coupled plasma atomic emission spectrometry", *Anal. Chim. Acta*, 69–74.
- [41] Mermet, J. M. (2005) "Is it still possible, necessary and beneficial to perform research in ICP-atomic emission spectrometry?", *Anal. At. Spectrom* 20, 11-16.
- [42] Marcano, E., Gómez, C., Benzo, Z., and Laine, J. (2010) Estudio preliminar sobre la determinación de elementos traza en cervezas venezolanas por ICP-OES, *Quim. Nova* 33, 653-655.
- [43] Dos, E., Beatriz, A., Olkuszewski, J., Saint, T., and Curtius, A. (2005) Determination of Trace Metals in Electrolytic Copper by ICP OES and ICP-MS. , *BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY* 48, 681-687.
- [44] Castillo, O., and Frisancho, O. (2014) El "chaco": Arcilla medicinal comestible del altiplano peruano y sus propiedades en la patología digestiva, *Gastroenterol Peru* 35, 97-99.
- [45] Zagal, E., and Sadzawka, A. (2007) Implementación del sistema para la validación de los métodos de análisis y mediciones de laboratorio en suelos y lodos, *Comisión de Normalización y Acreditación de la Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo, por encargo del Servicio Agrícola y Ganadero*.

- [46] Dimpe, K. M., Ngila, J. C., Mabuba, N., and Nomngongo, P. N. (2014) Evaluation of sample preparation methods for the detection of total metal content using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) in wastewater and sludge, *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C* 76-78, 42-48.
- [47] Larrea, M. T., Pomares, M. S., Gómez, M., Sánchez, F. J., and de la Rocha, S. (2010) Validation of an ICP-OES method for macro and trace element determination in Laminaria and Porphyra seaweeds from four different countries, *Journal of Food Composition and Analysis* 23, 814-820.
- [48] Quattrocchi, O. A., S., A., and S., L. (1992) Introducción a la HPLC Aplicacion y Práctica, 10, 301-327.
- [49] Castillo, B., and González, R. (1996) Protocolo de validacion de metodos analiticos para la cuantificación de fármacos, *Revista Cubana de Farmacia* 30.
- [50] 200.7, M. Determination of metals and trace elements in water and wastes by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry., *Environmental monitoring systems laboratory office of research and development. U.S. environmental protection agency Cincinnati, OHIO* 45268.
- [51] Boulingui, J. E., Nkoumbou, C., Njoya, D., Thomas, F., and Yvon, J. (2015) Characterization of clays from Mezafe and Mengono (Ne-Libreville, Gabon) for potential uses in fired products, *Applied Clay Science* 115, 132-144.
- [52] Eloussaief, M., Jarraya, I., and Benzina, M. (2009) Adsorption of copper ions on two clays from Tunisia: pH and temperature effects, *Applied Clay Science* 46, 409-413.
- [53] Mirhoseini, P., Astaraei, A., Karimi, A., Moshiri, M., Etemad, L., Zeinali, M., and Karimi, G. (2015) Efficacy of orally administered montmorillonite for acute iron poisoning detoxification in rat, *Applied Clay Science* 103, 62-66.
- [54] Dario, G. M., da Silva, G. G., Goncalves, D. L., Silveira, P., Junior, A. T., Angioletto, E., and Bernardin, A. M. (2014) Evaluation of the healing activity of therapeutic clay in rat skin wounds, *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 43, 109-116.
- [55] Khan, N., Jeong, I. S., Hwang, I. M., Kim, J. S., Choi, S. H., Nho, E. Y., Choi, J. Y., Kwak, B. M., Ahn, J. H., Yoon, T., and Kim, K. S. (2013) Method validation for simultaneous determination of chromium, molybdenum and selenium in infant formulas by ICP-OES and ICP-MS, *Food chemistry* 141, 3566-3570.
- [56] Servant, R., Zaretsky, A., and Farias, S. (2010) Validación de un procedimiento para la determinación de boro, magnésio, molibdeno y vanadio mediante ICP-OES en aguas de zonas mineras a restituir, *Simposio de Metrología*
- [57] Gómez, S. M., Martínez, J. A., and Martínez, F. (2010) Validación de un método analítico empleando cromatografía líquida de alta eficacia para la determinación de ibuprofeno en medios biorrelevantes, *Quim. Nova* 33, 1794-1799.
- [58] Capena, A. C., Escribano, E., and Fernandez, C. (1997) Validación de métodos analíticos, *Farm Clin* 7, 749-758.
- [59] Stoving, C., Jensen, H., Gammelgaard, B., and Sturup, S. (2013) Development and validation of an ICP-OES method for quantitation of elemental impurities in

- tablets according to coming US pharmacopeia chapters, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 84, 209-214.
- [60] Environmental Monitoring Systems Laboratory Office of Research and Development U. S. Environmental Protection Agency Cincinnati, O. (EPA) Determination of Metals and Trace Elements In Water And Wastes By Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry, *Revision 4.4 EMMC Version METHOD 200.7*.
- [61] The fitness for purpose of analytical methods. (1998) A laboratory Guide to Method Validation and Related Topic *EURACHEM Guide*.
- [62] Pascual, E., and Villanueva, H. (1993) Efecto citoprotector del chaco sobre la mucosa gástrica en ratas albinas sometidas a stress por restricción hipotérmica *Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica*.
- [63] Iannicelli-Zubiani, E. M., Cristiani, C., Dotelli, G., Gallo Stampino, P., Pelosato, R., Mesto, E., Schingaro, E., and Lacalamita, M. (2015) Use of natural clays as sorbent materials for rare earth ions: Materials characterization and set up of the operative parameters, *Waste management* 46, 546-556.
- [64] Tateo, F., and Summa, V. (2007) Element mobility in clays for healing use, *Applied Clay Science* 36, 64-76.
- [65] Kith, L. S., Jones, D. E., and Chou, C. (2001) Aluminum toxicokinetics regarding infant diet and vaccinations, *Vaccine - ELSEVIER* 20, S13-S17.
- [66] Yakimova, E. T., Kapchina, V. M., and Weltering, E. (2007) Signal transduction events in aluminum-induced cell death in tomato suspension cells, *Plant Physiol* 164, 702 - 708.
- [67] Poschenrieder, C., Gunsé, B., Corrales, I., and Barceló, J. (2008) A glance into aluminum toxicity and resistance in plants., *Sci. Total Environ.* 400, 356 - 368.
- [68] Takahashi, T., Ikeda, Y., Nakamura, H., and Nanzyo, M. (2006) Efficiency of gypsum application to acid Andosols estimated using aluminum release rates and plant root growth., *Soil Sci. Plant Nutr* 52, 584 - 592.
- [69] Gergichevich, C., Alberdi, M., Ivanov, A. G., and Reyes, M. (2006) Al³⁺ - Ca²⁺ Interaction in Plants Growing in Acid Soils: Al-Phytotoxicity Response to Calcareous Amendments, *Center of Plant- Soil Interaction and Natural Resources Biotechnology, Scientific and Technological Bioresource Nucleus (BIOREN)*.
- [70] Delhaize, E., and Ryan, P. R. (1995) Aluminum toxicity and tolerance in plants. , *Plant Physiol.* 107, 315 - 321.
- [71] WHO Guidelines for Drinking-water Quality. (1998) Aluminium in Drinking-water, *Originally published in Guidelines for drinking-water quality, 2nd ed. Addendum to Vol. 2*.
- [72] Richard, L., and Drake, M. (2006) Gray's Anatomy para Estudiantes, *Elsevier*.
- [73] Repetto, M., and Repetto, G. (2009) Toxicología Fundamental 59-113.
- [74] Benezeth, P., Castet, S., Dandurand, J., Gout, R., and Schott, J. (1994) Experimental study of aluminum-acetate complexing between 60 and 200°C, *Geochimica et Cosmochimica Acta* 58, 4561-4571.

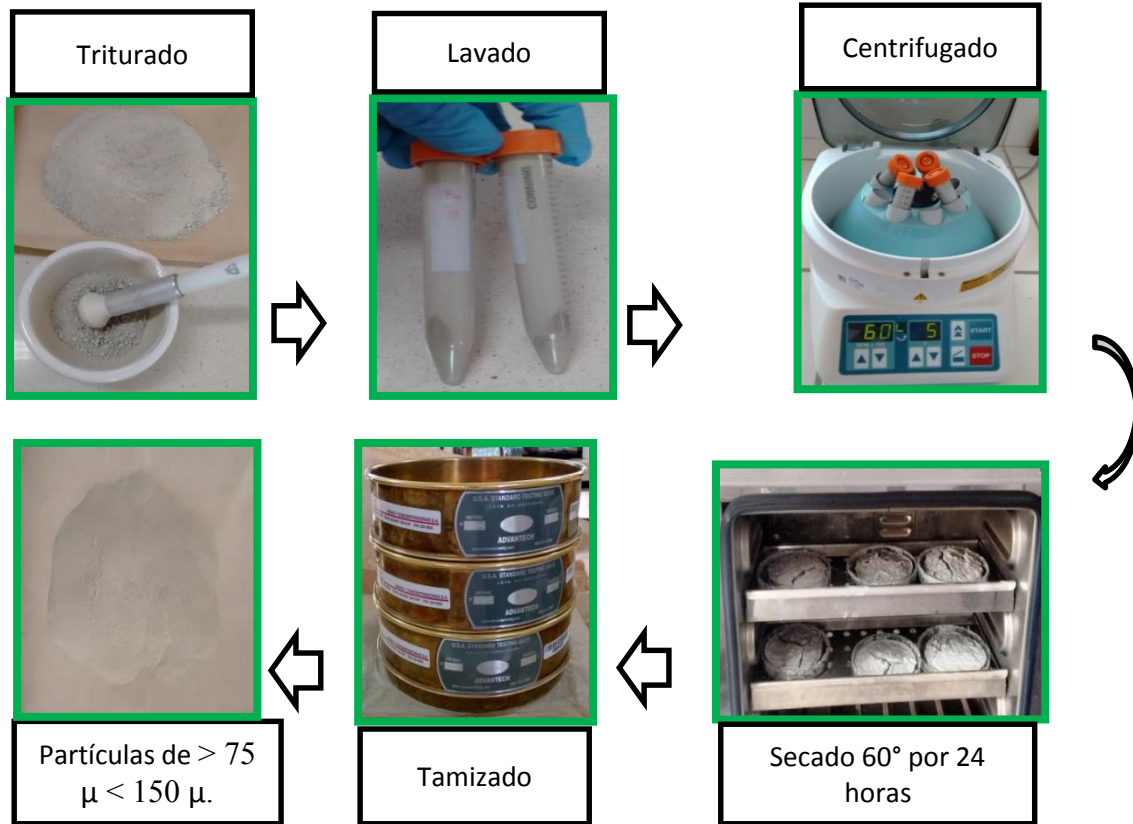
- [75] HEM, D., and ROBERSON, C. E. (2000) Form and Stability of Aluminum Hydroxide Complexes in Dilutor Solution *GEOLOGICAL SURVEY WATER-SUPPLY*.
- [76] Martin, B. (2001) The Chemistry of Aluminum as Related to Biology and Medicine, *CLIN. CHEM.* , 1797-1806
- [77] Garrison, P. (2000) The Environmental Chemistry of Aluminum, *Department of Environmentak Science, Policy, and Management University of California Berkely Second Edition*, 340-350.
- [78] Araiza, M., and Girón, A. (2007) Fisiología gastrointestinal, *McGraw-Hill*, 2007 6.
- [79] Gal, B., Lopez, M., and Lopez, Y. (2007) Bases de la fisiología *II edición*
- [80] Tiziani, A. (2011) Fármacos en Enfermería *Cuarta Edición - Havard*.
- [81] Aguilar, A., Caamaño, M., Martin, F., and Montejo, M. (2008) Biofarmacia y Farmacocinética *ELSEVIER* 3-58, 107 - 139.
- [82] Hernández, S. (2006) El modelo animal en las investigaciones biomédicas *Biomedicina 2*, 252-256.
- [83] Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio. (2002) Institute of laboratory animals National Research Council, *Academia Nacional de Medicina*, 148.
- [84] Zuñiga, J., Tur, M., Milocco, S., and Piñeiro, R. (2001) Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal., *McGraw-Hill Interamericana*, 682.
- [85] Hassan, H., Serage, H., and Gad, W. (2015) Black berry juice attenuates neurological disorders and oxidative stress associated with concurrent exposure of aluminum and fluoride in male rats, *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences 2*, 281-288.
- [86] Silva, A. F., Aguiar, M. S., Carvalho, O. S., Santana Lde, N., Franco, E. C., Lima, R. R., Siqueira, N. V., Feio, R. A., Faro, L. R., and Gomes-Leal, W. (2013) Hippocampal neuronal loss, decreased GFAP immunoreactivity and cognitive impairment following experimental intoxication of rats with aluminum citrate, *Brain research 1491*, 23-33.
- [87] Sivakumar, S., Khatiwada, C. P., and Sivasubramanian, J. (2014) Studies the alterations of biochemical and mineral contents in bone tissue of mus musculus due to aluminum toxicity and the protective action of desferrioxamine and deferiprone by FTIR, ICP-OES, SEM and XRD techniques, *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy 126*, 59-67.
- [88] Varsavsky, A. (2002) ¿Es Toxico el Aluminio? , *FUNDACION NEXUS*.
- [89] Robert, A., and Patrick, J. (2001) Aluminium Toxicokinetics: An Updated MiniReview, *Pharmacology & Toxicology* 88, 159–167.
- [90] Fernández, M. D., and Márquez, M. A. (2005) Procedimiento recomendado para la determinación del aluminio en muestras biológicas y otros especímenes de interés clínico. , *Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Comisión de Elementos Traza 24*, 46-54.
- [91] Walton, J., G. . (2004) Hams & D. Wilcox: Bioavailability of aluminium from drinking water: Co-exposure with foods and beverages., *Urban Water Research Association of Australia*, 4-9.

- [92] Greger, J. L., and Sutherland, J. E. (2001) Aluminum exposure and metabolism., *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 439–474.
- [93] Ittel, T., Buddington, B., Miller, N., and Alfrey, A. (1987) Enhanced gastrointestinal absorption of aluminum in uremic rats, *Kidney International* 32, 821-826.
- [94] Marin, J., and Del Mar, B. (2001) Niveles de Aluminio Plasmático en Hemodiálisis según el Método de Extracción, *Centro de Hemodilisis "Los Llanos" (Friat) Móstoles. Madrid.*
- [95] Daurgidas, J. T., and Blake, P. G. (2008) Manual de diálisis., *Ed Wolters Kluwe 4ª Ed*, 702-712.
- [96] Relevance to Public Health. (2009) Health effects of Aluminum.
- [97] Zhang, Q., Zhang, F., Ni, Y., and Kokot, S. (2015) Effects of aluminum on amyloid-beta aggregation in the context of Alzheimer's disease, *Arabian Journal of Chemistry.*
- [98] Bitra, V., Rapaka, D., Mathala, N., and Akula, A. (2014) Effect of wheat grass powder on aluminum induced Alzheimer's disease in Wistar rats, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 7, S278-S281.
- [99] Mujika, J. I., Rezabal, E., Mercero, J. M., Ruiperez, F., Costa, D., Ugalde, J. M., and Lopez, X. (2014) Aluminium in biological environments: a computational approach, *Computational and structural biotechnology journal* 9, e201403002.
- [100] Yokel, R. A., and McNamara, P. (2003) Influence of renal impairment, chemical form and serum protein binding on intravenous and oral aluminum kinetic in the rabbit., *Toxicol Appl Pharmacol*, 32-43.
- [101] Handbook of chemistry and physics. (2000) Boca Raton, 80 ed.
- [102] Keith, L. S., Jones, D. E., and Chou, C. (2002) Aluminum toxicokinetics regarding infant diet and vaccinations, *Vaccine - ELSEVIER* 20, S13-S17.
- [103] Abreo, K., Brown, S., Sella, M., and Trapp, G. (2009) Application of an erythrocyte aluminium assay in the diagnosis of aluminium -associated microcytic anemia in patients undergoing dialysis and response to desferoxamine therapy., *J Lab Clin Med*, 50-57.
- [104] Jouhanneau, P., Raisbeck, G., Yoïou, F., Lacour, B., Banide, H., and Drueke, T. (1997) Gastrointestinal absorption, tissue retention, and urinary excretion of dietary aluminum in rats determined by using ²⁶Al, *Clinical Chemistry* 43:6, 1023–1028.
- [105] Taylor, G. A., Moore, I. N., Ferrier, S. P., and A., E. J. (1998) Gastrointestinal absorption of aluminium and citrate in man., *Inorg. Biochem* 20, 181–195.
- [106] Froment, D., Molitoris, B., Buddington, B., Miller, N., and Alfrey, A. (1989) Site and mechanism of enhanced gastrointestinal absorption of aluminum by citrate, *Kidney International* 36, 978-984.
- [107] Nolan, C., Califano, J., and Butzin, C. (1990) Influence of calcium acetate or calcium citrate on intestinal aluminum absorption, *Kidney International* 38, 937-941.
- [108] Ohman, L.-O., and Martin, R. B. (2004) Citrate as de main small molecule binding Al³⁺ in serum., *Clin Chem.*, 598-601.

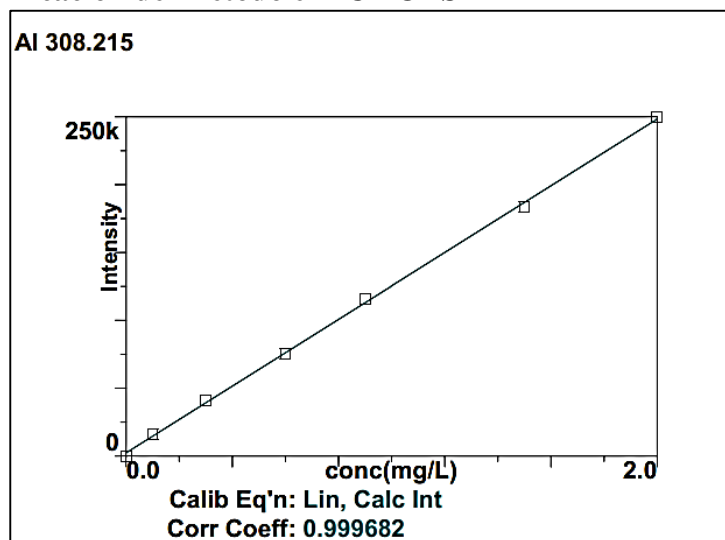
- [109] Farend, R., Hem, S., White, J., Elmore, D., Suckow, M., and Rudy, A. (2000) In vivo absorption of aluminum-containing vaccine adjuvants using Al. vaccine, *15*, 1314.
- [110] Richard, E., Stanley, L., Joe, L., David, E., Mark, A., Anita, C., Euphemie, A., and (1997) In vivo absorption of aluminium containing vaccine adjuvants using ^{26}Al , *Vaccine. ELSEVIER 15*, 1314-1318.
- [111] Walker, V., Sutton, R., Meirav, O., Sossi, V., Johnson, R., and Klein, J. (1998) Tissue disposition of Al in rats measured by accelerator mass spectrometry, *Clin Invest Med 17*, 420–425.
- [112] Xu, Z. X., Pai, S. M., and Melethil, S. (1999) Kinetics of aluminum in rats. Part II: dose-dependent urinary and biliary excretion., *J Pharm Sci 10*, 946–951.

ANEXOS

ANEXO 1 Tratamiento de la arcilla



ANEXO 2 Verificación del método en ICP OES



ANEXO 3

Cantidad de aluminio liberado (mg/L) de 50 mg de arcilla en los diferentes medios de disolución

Tiempo	pH 1.2		pH 4.5		pH 6.8		J. gástrico		J. intestinal	
	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS
3	0.251	0.002	0.318	0.005	0.800	0.005	0.321	0.005	0.944	0.010
5	0.272	0.003	0.723	0.012	0.840	0.014	0.345	0.005	0.983	0.018
10	0.281	0.001	0.805	0.004	0.863	0.013	0.374	0.005	1.033	0.003
15	0.296	0.003	0.890	0.006	0.916	0.007	0.398	0.001	1.093	0.006
20	0.300	0.002	0.959	0.001	0.932	0.012	0.436	0.005	1.276	0.022
25	0.298	0.002	0.955	0.003	0.983	0.010	0.455	0.007	1.279	0.009
30	0.307	0.003	0.958	0.018	1.100	0.005	0.484	0.007	1.270	0.007
40	0.315	0.003	0.940	0.009	1.107	0.013	0.607	0.002	1.257	0.020
50	0.417	0.001	0.939	0.006	1.116	0.010	0.638	0.001	1.259	0.005
60	0.574	0.009	0.952	0.006	1.112	0.014	0.641	0.013	1.268	0.014
70	0.576	0.002	0.935	0.011	1.097	0.013	0.641	0.011	1.273	0.021
80	0.570	0.010	0.932	0.010	1.093	0.004	0.632	0.005	1.256	0.016
90	0.569	0.008	0.934	0.009	1.103	0.002	0.640	0.007	1.279	0.019

Cantidad de aluminio liberado (mg/L) de 250 mg de arcilla en los diferentes medios de disolución

Tiempo	pH 1.2		pH 4.5		pH 6.8		J. gástrico		J. intestinal	
	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS
3	0.578	0.006	1.004	0.006	1.210	0.013	0.885	0.010	1.437	0.013
5	0.622	0.011	1.066	0.017	1.275	0.015	0.905	0.009	1.508	0.021
10	0.749	0.008	1.056	0.005	1.293	0.006	0.947	0.006	1.636	0.018
15	0.801	0.003	1.083	0.009	1.448	0.020	0.939	0.004	1.899	0.029
20	0.791	0.006	1.433	0.013	1.445	0.024	0.987	0.017	2.253	0.013
25	0.815	0.011	1.583	0.015	1.531	0.013	0.995	0.009	2.283	0.011
30	0.786	0.008	1.565	0.004	1.973	0.012	1.196	0.015	2.254	0.009
40	0.787	0.008	1.527	0.023	1.981	0.029	1.324	0.013	2.246	0.009
50	0.841	0.016	1.542	0.022	1.974	0.007	1.332	0.006	2.257	0.006
60	0.991	0.011	1.534	0.021	2.002	0.019	1.365	0.009	2.228	0.019
70	1.000	0.014	1.542	0.010	2.026	0.019	1.391	0.013	2.286	0.016
80	1.021	0.008	1.620	0.010	2.022	0.034	1.405	0.024	2.235	0.014
90	1.007	0.015	1.603	0.023	2.240	0.015	1.404	0.010	2.273	0.026

Cantidad de aluminio liberado (mg/L) de 500 mg de arcilla en los diferentes medios de disolución

Tiempo	pH 1.2		pH 4.5		pH 6.8		J. gástrico		J. intestinal	
	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS
3	1.082	0.019	1.020	0.004	1.216	0.017	1.261	0.017	1.663	0.017
5	1.161	0.015	1.017	0.017	1.333	0.021	1.362	0.024	1.789	0.007
10	1.138	0.005	1.073	0.012	1.453	0.015	1.399	0.027	1.900	0.036
15	1.176	0.004	1.023	0.005	1.440	0.017	1.403	0.018	2.215	0.014
20	1.231	0.020	1.391	0.023	1.573	0.025	1.570	0.009	2.849	0.024
25	1.222	0.008	1.753	0.024	1.529	0.017	1.561	0.010	2.822	0.026
30	1.282	0.003	1.727	0.005	2.124	0.014	1.689	0.016	3.019	0.014
40	1.277	0.014	1.721	0.023	2.412	0.033	1.938	0.026	2.905	0.010
50	1.304	0.007	1.715	0.026	2.383	0.042	1.935	0.025	2.926	0.038
60	1.452	0.015	1.701	0.004	2.538	0.009	1.912	0.018	2.984	0.009
70	1.478	0.020	1.656	0.008	2.679	0.031	1.865	0.016	2.926	0.031
80	1.526	0.013	1.761	0.035	2.849	0.028	1.933	0.016	3.057	0.019
90	1.533	0.019	1.720	0.029	2.867	0.041	1.902	0.007	3.022	0.009

ANEXO 4

4.1 Prueba post-hoc (Tukey HSD) 50 mg

	Tiempos	Grupos homogéneos			
pH 1.2	3	X			
	5	X			
	10	X			
	15	X			
	20	X			
	25	X			
	30	X			
	40	X			
	50	X			
	60		X		
70		X			
80		X			
90		X			
pH 4.5	3	X			
	5		X		
	10			X	
	15				X
	20				X
	25				X
	30				X
	40				X
	50				X
	60				X
70				X	
80				X	
90				X	
pH 6.8	3		X		
	5			X	
	10			X	
	15			X	

	20				X				
	25				X				
	30								X
	40								X
	50								X
	60								X
	70								X
	80								X
	90								X
Jugo gástrico simulado	3	X							
	5	X							
	10	X							
	15	X							
	20	X							
	25	X							
	30	X							
	40		X						
	50		X						
	60		X						
	70		X						
	80		X						
	90		X						
Jugo intestinal simulado	3				X				
	5				X				
	10					X			
	15						X		
	20							X	
	25								X
	30								X
	40								X
	50								X
	60								X
	70							X	
	80							X	
	90							X	

4.2 Prueba post-hoc (Tukey HSD) 250 mg

	Tiempos	Grupos homogéneos							
pH 1.2	3	X							
	5	X							
	10	X							
	15	X							
	20	X							
	25	X							
	30	X							
	40	X							
	50	X							
	60	X							
pH 4.5	70	X							
	80	X							
	90	X							
	3	X							
	5	X							
	10	X							
	15	X							
	20		X						
	25			X					
	30			X					
pH	40			X					
	50			X					
	60			X					
	70			X					
pH	80			X					
	90			X					
pH	3		X						
	5			X					

	10			X			
	15			X			
	20			X			
	25				X		
	30					X	
	40					X	
	50					X	
	60					X	
	70					X	
	80					X	
	90						X
Jugo gástrico simulado	3	X					
	5	X					
	10	X					
	15	X					
	20	X					
	25	X					
	30		X				
	40			X			
	50			X			
	60			X			
	70		X				
	80		X				
	90		X				
Jugo intestinal simulado	3						
	5				X		
	10				X		
	15					X	
	20						X
	25						X
	30						X
	40						X
	50						X
	60						X
	70					X	
	80					X	
	90					X	

4.3 Prueba post-hoc (Tukey HSD) 500 mg

	Tiempos	Grupos homogéneos	
pH 1.2	3	X	
	5	X	
	10	X	
	15	X	
	20	X	
	25	X	
	30	X	
	40	X	
	50	X	
	60	X	
	70	X	
	80	X	
	90	X	
	pH 4.5	3	X
		5	X
10		X	
15		X	
20		X	
25			X
30			X
40			X
50			X
60			X
70		X	
80		X	
90		X	

pH 6.8	3	X							
	5	X							
	10	X							
	15	X							
	20	X							
	25	X							
	30				X				
	40						X		
	50						X		
	60							X	
70								X	
80								X	
90								X	
Jugo gástrico simulado	3	X							
	5	X							
	10	X							
	15	X							
	20	X							
	25	X							
	30		X						
	40			X					
	50			X					
	60			X					
70			X						
80			X						
90			X						
Jugo intestinal simulado	3		X						
	5		X						
	10			X					
	15				X				
	20								X
	25								X
	30								X
	40								X
	50								X
	60								X
70								X	
80								X	
90								X	

ANEXO 5

Áreas bajo la curva y

Tiempo (min)	Áreas bajo la curva (ABC) en los diferentes medios				
	pH 4.5	J. Gástrico	pH 1.2	J. Intestinal	pH 6.8
3	1.623	1.530	1.824	1.892	2.495
5	2.243	2.037	2.549	2.623	3.452
10	5.748	5.225	6.965	6.903	9.223
15	5.785	5.240	7.233	7.005	10.288
20	6.018	6.035	7.533	7.433	12.660
25	6.133	7.860	7.755	7.828	14.178
30	6.260	8.700	9.133	8.125	14.603
40	12.795	17.240	22.680	18.135	29.620
50	12.905	17.180	23.975	19.365	29.155
60	13.780	17.080	24.605	19.235	29.550
70	14.650	16.785	26.085	18.885	29.550
80	15.020	17.085	27.640	18.990	29.915
90	15.295	17.405	28.580	19.175	30.395
ABC_0^T	118.254	139.402	196.556	155.592	245.082
T_{max}	90.000	90.000	90.000	90.000	90.000
Q_{100}	1.533	1.761	2.867	1.938	3.057
$(Q_{100} \times T_{max})$	137.970	158.490	258.030	174.420	275.130
EF%	85.710	87.956	76.175	89.205	89.078
MDT	12.861	8.744	21.442	8.009	8.799

ANEXO 6

Pesos de los animales de experimentación

	Control negativo	Do 1	Do 2
	225.000	224.000	237.000
	221.000	226.000	221.000
	228.000	223.000	224.000
	226.000	222.000	223.000
	224.000	230.000	226.000
	230.000	221.000	228.000
	222.000	225.000	225.000
	222.000	221.000	225.000
Promedio	224.750	224.000	226.125
DS	3.151	3.024	4.853
RSD	1.402	1.350	2.146

ANEXO 7

Cantidad de aluminio liberado (ppm) en muestras de sangre

Hora	Control negativo		Do 1		Do 2	
	[Al] ppm	DS	[Al] ppm	DS	[Al] ppm	DS
0	0.411	0.009	0.412	0.010	0.410	0.010
1	0.410	0.010	7.550	0.320	9.194	0.291
2	0.407	0.018	9.200	0.458	18.481	0.917
4	0.409	0.007	16.950	0.830	20.869	1.025
6	0.413	0.010	18.644	0.876	21.406	0.968
8	0.412	0.011	18.381	0.890	20.869	1.007
10	0.412	0.010	16.300	0.766	18.906	0.887
14	0.409	0.007	12.863	0.616	15.788	0.720
18	0.411	0.008	10.631	0.521	14.081	0.655
24	0.414	0.012	7.669	0.374	10.488	0.515

ANEXO 8

Prueba post-hoc (Tukey HSD) a muestras de sangre

	Tiempo	Grupos homogéneos					
Control negativo	0	X					
	1	X					
	2	X					
	4	X					
	6	X					
	8	X					
	10	X					
	14	X					
	18	X					
	24	X					
Do 1	0	X					
	1		X				
	2			X			
	4				X		
	6					X	
	8					X	
	10				X		
	14			X			
	18				X		
	24		X				
Do 2	0	X					
	1		X				
	2					X	
	4						X
	6						X
	8						X
	10					X	
	14				X		
	18				X		
	24			X			

ANEXO 9

Concentración de aluminio (ppm) excretado en orina

	Horas	[Al] ppm	DS
Control negativo	24	0.318	0.015
	48	0.320	0.014
	72	0.321	0.015
	96	0.322	0.015
Do 1	24	8.351	0.298
	48	7.866	0.312
	72	6.423	0.238
	96	5.966	0.290
Do 2	24	11.257	0.358
	48	10.769	0.338
	72	7.348	0.308
	96	7.041	0.341

ANEXO 10

Pruebas post-hoc a muestras de orina

	Tiempo (h)	Grupos homogéneos		
Control negativo	24	X		
	48	X		
	72	X		
	96	X		
Do 1	24			X
	48			X
	72	X		
	96	X		
Do 2	24			X
	48			X
	72		X	
	96		X	

ANEXO 11**Volumen urinario del grupo control negativo**

Tiempo (h)	24	48	72	96
	Volumen (mL)	Volumen (mL)	Volumen (mL)	Volumen (mL)
	0.400	0.250	0.350	0.250
	0.350	0.350	0.380	0.300
	0.450	0.350	0.350	0.500
	0.250	0.250	0.350	0.280
	0.245	0.245	0.345	0.345
	0.400	0.345	0.345	0.400
	0.350	0.300	0.250	0.350
	0.330	0.280	0.380	0.330
Promedio	0.347	0.296	0.344	0.344
Ds	0.072	0.047	0.041	0.078

Volumen urinario del grupo Do 1

Tiempo (h)	24	48	72	96
	Volumen (mL)	Volumen (mL)	Volumen (mL)	Volumen (mL)
	0.550	0.600	0.550	0.500
	0.700	0.500	0.650	0.520
	0.750	0.450	0.500	0.650
	0.590	0.500	0.600	0.580
	0.650	0.600	0.620	0.500
	0.700	0.600	0.650	0.550
	0.750	0.520	0.600	0.600
	0.680	0.550	0.620	0.620
Promedio	0.671	0.54	0.59875	0.565
Ds	0.072	0.057	0.051	0.057

Volumen urinario del grupo Do 2

Tiempo (h)	24	48	72	96
	Volumen (mL)	Volumen (mL)	Volumen (mL)	Volumen (mL)
	1.500	1.400	0.900	1.250
	1.500	0.950	1.200	1.000
	1.360	1.250	1.250	1.200
	1.450	1.200	1.200	1.250
	1.800	1.250	1.100	1.360
	1.800	1.350	1.200	0.900
	1.500	0.900	1.350	1.200
	1.750	1.450	1.250	0.900
Promedio	1.583	1.219	1.181	1.133
Ds	0.173	0.200	0.133	0.175

ANEXO 12

Cantidad de aluminio excretado por orina (μg)

Grupos	Tiempo (h)	Promedio [Al] ppm	DS	Volumen urinario	DS	Cantidad de aluminio excretada (μg)	DS
Control negativo	24	0.318	0.015	0.347	0.072	0.110	0.001
	48	0.320	0.014	0.296	0.047	0.095	0.001
	72	0.321	0.015	0.344	0.041	0.110	0.001
	96	0.322	0.015	0.344	0.078	0.111	0.001
Do 1	24	8.351	0.298	0.671	0.072	5.605	0.021
	48	7.866	0.312	0.540	0.057	4.248	0.018
	72	6.423	0.238	0.599	0.051	3.845	0.012
	96	5.966	0.290	0.565	0.057	3.371	0.016
Do 2	24	11.257	0.358	1.583	0.173	4.025	0.566
	48	10.769	0.338	1.219	0.200	3.637	0.412
	72	7.348	0.308	1.181	0.133	2.263	0.364
	96	7.041	0.341	1.133	0.175	2.398	0.386

ANEXO 13

Dictamen del Comité de Ética Institucional de Investigación de la Universidad Católica de Santa María

COMITÉ DE ÉTICA INSTITUCIONAL DE INVESTIGACIÓN UCSM



DICTAMEN COMITÉ DE ETICA DE INVESTIGACION UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA

Arequipa, 07 abril 2016

Dr. Gonzalo Dávila
Vicerrector de la Universidad Católica de Santa María
Presente. -

De mi especial consideración.

Me dirijo a usted para hacerle llegar el resultado de la evaluación del proyecto de tesis y dictamen del Comité Institucional de Ética de Investigación de la UCSM de la investigación “Caracterización fisicoquímica de arcilla comestible “chaco” y la liberación de aluminio en ensayos in vitro - in vivo – Arequipa 2015”, proyecto de tesis presentado por la bachiller Celia Choquenaira Quispe, para optar el grado de Magister en Química del Medio Ambiente, Universidad Católica de Santa María, Arequipa.



UCSM En cuanto al diseño, se trata de un estudio experimental, prospectivo y longitudinal

El estudio tiene como objetivo: Caracterizar fisicoquímicamente la arcilla comestible “chaco” y la liberación de aluminio en ensayos in vitro - in vivo.

En cuanto a la evaluación de riesgos de procedimientos, se trata de una investigación experimental en dos tiempos, una primera de extracción y análisis del chaco proveniente de yacimientos identificados en la región de Puno. Un segundo tiempo para realizar un análisis toxicológico con animales de experimentación, por lo tanto, se utilizarán modelos animales, en el proyecto.

COMITÉ DE ÉTICA INSTITUCIONAL DE INVESTIGACIÓN UCSM

En la página 18 indica la autora: “Para el desarrollo del presente trabajo de investigación, se utilizaron un total de 24 ratas machos albinas Wistar de la especie *Rattus norvegicus* provenientes del Bioterio UCSM” esto está redactado en tiempo pasado y en el siguiente párrafo indica: “Los animales serán divididos al azar en tres grupos de experimentación” esto está redactado en tiempo futuro. Debe la autora mejorar la redacción y dar coherencia con el tiempo de los procedimientos.

En cuanto a los procedimientos con animales de experimentación, la autora indica que realizará: Colección in vivo de sangre, colección de orina, ayuno, restricción hídrica a intervalos cortos de tiempo, ingesta de chaco, análisis toxicológico y al final se indica que se realizará la recuperación de los animales.

RECOMENDACIONES:

El protocolo no representa riesgos mayores para los animales, se recomienda, sin embargo, cumplir con las buenas prácticas de laboratorio y manejo de animales de experimentación.

Mejorar la redacción el proyecto tiene varias faltas de ortografía

DICTAMEN:

FAVORABLE




Dra. AGUEDA MUÑOZ DEL CARPIO TOIA
Presidenta del Comité Institucional de Ética de la Investigación
Universidad Católica de Santa María

Comité Institucional de Ética de la
Investigación UCSM



Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por Turnitin. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: Celia Choquenaira Quispe
Título del ejercicio: TRABAJO
Título de la entrega: "CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMI...
Nombre del archivo: RESULTADOS_Y_DISCUSION.docx
Tamaño del archivo: 28.59M
Total páginas: 107
Total de palabras: 24,292
Total de caracteres: 127,372
Fecha de entrega: 11-abr-2016 11:34 a.m.
Identificador de la entrega: 657758334

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
ESCUELA DE POST GRADO
MAESTRÍA EN QUÍMICA DEL MEDIO AMBIENTE



"CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA Y LIBERACION DE
ALUMINIO, *in vitro* - *in vivo*, DE LA ARCILLA (CHACO) - 2015"

TESIS PRESENTADA POR LA
BACHILLER:
Celia Choquenaira Quispe

PARA OPTAR EL GRADO DE MAGISTER
EN QUÍMICA DEL MEDIO AMBIENTE

ASESOR:
Dr. Gonzalo División Del Corpa

AREQUIPA - PERÚ
2016

“CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y LIBERACION DE ALUMINIO, in vitro - in vivo, DE LA ARCILLA (CHACO) – 2015”

INFORME DE ORIGINALIDAD

20%

INDICE DE SIMILITUD

18%

FUENTES DE INTERNET

8%

PUBLICACIONES

9%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTE QUE CONTIENE COINCIDENCIAS

2

Submitted to Universidad Católica de Santa María

Trabajo del estudiante

1%

1%

★ Submitted to Universidad Católica de Santa María

Trabajo del estudiante

EXCLUIR CITAS ACTIVO
EXCLUIR BIBLIOGRAFÍA ACTIVO

EXCLUIR COINCIDENCIAS

APAGADO