Imagen de portada adaptada de *Atomic Spectroscopy Press. Vol 41. N°6*

EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE ELEMENTOS POTENCIALMENTE TÓXICOS EN CABELLO HUMANO Y SU CORRELACIÓN CON LA APLICACIÓN DE TINTAS CAPILARES

Alejandra S. Galizia

INFORME de PASANTÍA
LBH

Orientador: Dr. Ignacio Machado
Co-orientador: Dra. Fiorella Iaquinta

BIOESP - Laboratorio de Química Analítica
DEC, Facultad de Química

Montevideo, 2021

FACULTAD DE CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA URUGUAY

FACULTAD DE QUÍMICA

ÍNDICE DE CONTENIDO

Índice de contenido …… 1
Resumen …… 2
1. Introducción …… 3
1.1. El cabello como tejido …… 3
1.2. Tintas capilares …… 4
1.3. Toxicidad …… 6
1.4. El cabello como biomarcador …… 8
1.5. Espectrometría de absorción atómica …… 9
1.6. Validación de métodos analíticos …… 11
1.7. Objetivos …… 11
2. Materiales y métodos …… 12
2.1. Reactivos y equipos …… 12
2.2. Recolección de muestras de cabello …… 14
2.3. Descontaminación de materiales …… 15
2.4. Preparación de muestras …… 15
2.5. Determinaciones analíticas …… 17
2.5.1. Validación de metodologías …… 17
2.5.2. Detección y cuantificación de los analitos …… 18
2.6. Análisis estadísticos …… 18
3. Resultados y discusión …… 19
3.1. Parámetros de desempeño …… 19
3.2. Niveles de elementos evaluados …… 19
3.3. Concentraciones medias obtenidas …… 20
3.4. Cabellos tratados versus control …… 21
3.5. Análisis de correlaciones …… 22
3.6. Comparación entre marcas comerciales de tinta …… 26
3.7. Limitaciones del estudio …… 26
3.8. Comparación contra valores internacionales …… 27
4. Conclusiones …… 29
Referencias bibliográficas …… 30
Agradecimientos …… 34
ANEXOS
A1. Materiales para voluntarios …… 35
A2. Tablas de resultados …… 37
A3. Test estadísticos …… 38

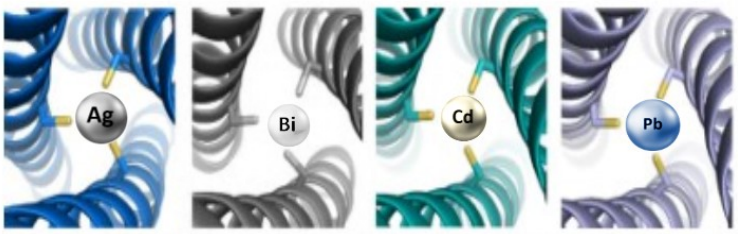
Resumen

El cabello humano tiene la capacidad de almacenar, lo que lo convierte en un biomarcador útil para monitorear la exposición a elementos potencialmente tóxicos. Las tintas capilares en su formulación pueden contener sales metálicas, siendo las más empleadas las sales de plata (Ag), de bismuto (Bi), de cadmio (Cd) y de plomo (Pb). Estos elementos podrían acumularse en la fibra capilar y ser absorbidos por el cuero cabelludo. El plomo, por ejemplo, es reconocido como un disruptor epigenético, basado en su capacidad para impulsar cambios en el contexto del desarrollo neuronal y la plasticidad sináptica. La exposición crónica es responsable de intoxicaciones disimuladas que no siempre es posible evaluar con las matrices biológicas tradicionales.

El objetivo de este estudio fue evaluar los niveles de Ag, Bi, Cd y Pb en muestras de cabello humano (n=61) provenientes de un grupo de voluntarios con cabellos tratados con tintas capilares y un grupo de voluntarios con cabellos sin tratar (control), para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

El muestreo se realizó en la ciudad de Montevideo y contó con el aval de la Comisión de Ética en Investigación en Seres Humanos de Facultad de Química. La preparación de las muestras se llevó a cabo mediante digestión ácida asistida por microondas, y las determinaciones analíticas fueron realizadas por espectrometría de absorción atómica electrotérmica. Los métodos se validaron siguiendo los lineamientos de la Guía Eurachem de la Unión Europea.

Los límites de cuantificación calculados según el criterio 10 s (n=10) fueron: 0,034 μg g^{-1} (Ag), 0,18 μg g^{-1} (Bi), 0,011 μg g^{-1} (Cd) y 0,0080 μg g^{-1} (Pb). El 96.7% de las muestras presentaron niveles cuantificables de Pb. Este elemento presentó una concentración media de 2.09 ± 3,06 μg g^{-1} en el grupo de cabellos tratados, y 0.99 ± 1.06 μg g^{-1} en el grupo control. Para todos los elementos evaluados el valor de la media de concentración resultó mayor en el grupo de muestras provenientes de cabellos tratados con tintas respecto al grupo control, sin embargo los test estadísticos no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos, a un nivel del 95% de confianza.



Palabras clave: absorción atómica, queratina, cadmio, plomo, tintes, trazas, biomonitoreo.

1. Introducción

En los seres humanos, aunque el cabello no desempeña una función biológica vital, tiene una alta importancia a nivel psicológico al ser parte fundamental en el desarrollo e identificación de la imagen corporal. El color del cabello es el fenotipo humano más visible que juega un papel significante en el aspecto físico y en la autopercepción de las personas. [1, 2, 3]

Desde épocas remotas se han desarrollado productos destinados a cambiar y mejorar la apariencia del cabello, incluyendo tintes de origen vegetal, orgánico, e inorgánico. La creación de las tintas capilares como las conocemos hoy en día se debe al Químico Eugène Schueller, quien comenzó a usar la parafenilendiamina en la Francia de principios del siglo XX, patentando una fórmula de color [4].

Según datos de la Confederación de Consumidores y Usuarios de Europa, más del 60% de las mujeres y entre el 5 y 10% de los varones se tiñen el cabello, con un promedio de 7 veces al año [4]. En Estados Unidos, se estima que un 75% de las mujeres han usado tinta capilar al menos una vez, y varias con regularidad, mientras que a nivel mundial una de cada tres mujeres se tiñe [5].

Un tinte capilar cosmético es un producto capaz de transformar el color natural del cabello. Durante varias décadas, el Programa de Revisión de Ingredientes Cosméticos (CIR) ha evaluado la seguridad de varios de los compuestos utilizados en las tintas, sin embargo no se ha documentado una revisión exhaustiva de los ingredientes de estos tintes y el riesgo de exposición [6].

1.1. El cabello como tejido

El cabello es una extensión del cuero cabelludo. Está compuesto principalmente por fibras de queratina tipo I y II, sintetizadas por los queratinocitos, células que se producen a razón de hasta un millón por día en los folículos pilosos [7].

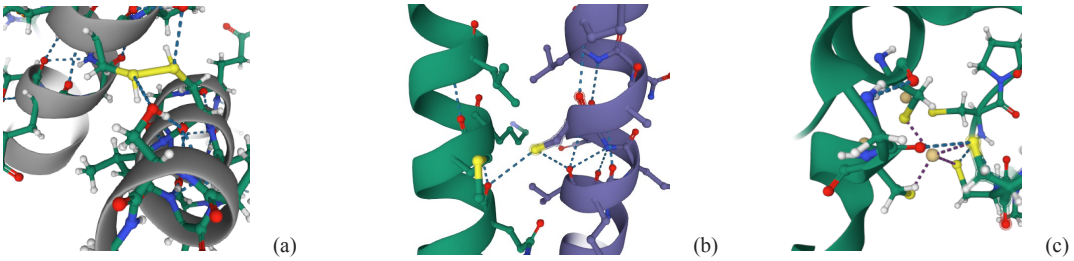


Figura 1. Modelos del *Protein Data Bank* para la molécula de queratina y sus interacciones **(a)** Estructura del heterocomplejo entre las proteínas de filamento intermedio humano queratina 1 (KRT1) y queratina 10 (KRT10), mostrando un enlace disulfuro intercatenario (amarillo). **(b)** Cisteína con azufre libre (amarillo) que podría dar lugar a la formación de quelatos. Código KRT1 **(c)** Residuos de cisteína como ligandos en interacción con cadmio (beige). La cisteína, un quelante polidentado, puede formar compuestos de coordinación.

Las queratinas del cabello son particularmente ricas en cisteínas (hasta un 20 % del número total de residuos) lo que les confiere la capacidad de formar un gran número de puentes disulfuro intramoleculares e intermoleculares, e incluso coordinarse con metales incorporados exógenamente (Figura 1), ya que la L-cisteína posee alta afinidad por iones metálicos como el Cd^{2+}, Pb^{2+} y Ag^{+}, para formar quelatos. [1, 8, 9]

La composición del cabello lo hace una matriz biológica compleja, que además de estar formada por un alto porcentaje de proteínas estructurales, contiene agua, lípidos, pigmentos y oligoelementos; esta composición puede variar entre individuos [10].

En su crecimiento el cabello va incorporando elementos endógenos, provenientes de la circulación sanguínea, como se observa en la Figura 2b, y al mismo tiempo, adquiere elementos exógenos por deposición [10]. Los folículos pilosos funcionan como reservorios y portales para sustancias aplicadas tópicamente [11]. Esta capacidad de almacenar y retener elementos, ya sea endógenos o de fuentes exógenas, durante un período de tiempo prolongado, hacen al cabello útil como indicador de exposición a elementos potencialmente tóxicos [12].

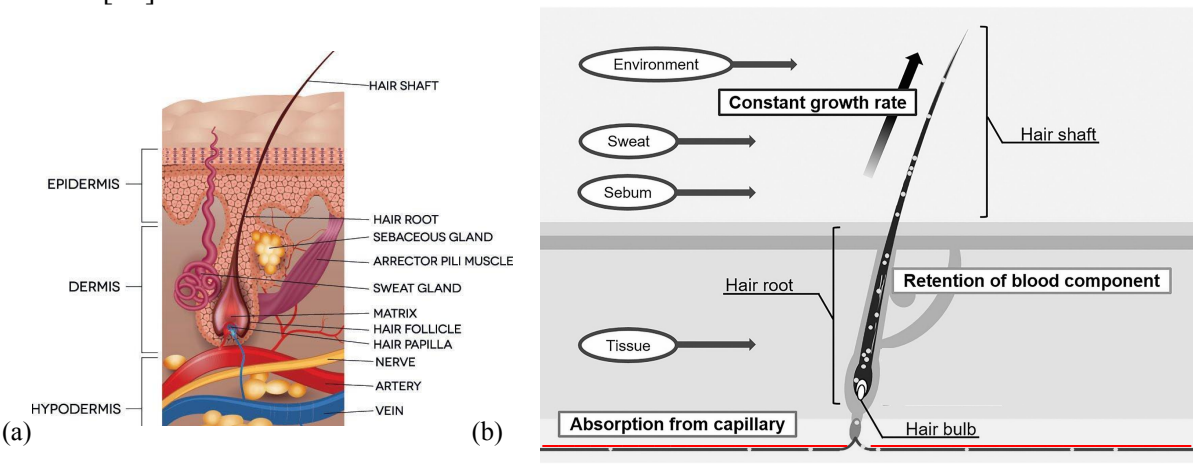


Figura 2. (a) Anatomía capilar del cabello. **(b)** Crecimiento del cabello y retención de elementos incorporados a la fibra capilar. La papila pilosa en la punta del bulbo piloso interactúa con los capilares, y a través de ellos los elementos de la circulación sanguínea migran a la raíz del cabello, acumulándose en la fibra capilar a través de la papila pilosa. Imagen adaptada de Journal of Bioscience and Bioengineering.

1.2. **Tintas capilares**

Las tintas capilares se clasifican en temporales, semipermanentes, y permanentes, según la duración de la coloración sobre el cabello.

Hoy en día, las tintas permanentes son las más utilizadas, siendo dominantes en el mercado. Estas tienen una durabilidad suficiente para que el usuario solamente requiera una aplicación al mes. En su formulación generalmente utilizan los denominados colorantes oxidativos para el cabello. Estos productos químicos a menudo se denominan intermediarios, porque la mayoría son incoloros y producen compuestos coloreados a través de un proceso de

condensación oxidativa, cuando se mezclan con productos oxidantes justo antes de su uso. De hecho, el color del cabello se forma cuando un precursor del colorante (denominado base o intermediario primario) es oxidado por el agente oxidante (también conocido como revelador) para producir una imina, que reacciona rápidamente con el llamado modificador (también conocido como acoplador) [13].

Además las tintas se clasifican en función del origen de los activos cosméticos utilizados, en tinta de origen natural, sintético, o mineral. En este último caso la formulación se basa en sales metálicas, que atraviesan la cutícula capilar y se introducen en el córtex, donde se oxidan y se enlazan a la queratina para modificar el color capilar.

Las sales metálicas pueden ser acumuladas en la fibra capilar, e incluso absorbidas por el cuero cabelludo, lo que puede resultar en efectos nocivos para la salud, ya que algunas de las sales empleadas son potencialmente tóxicas [11, 14].

Estas sales determinan el tipo de coloración y el mecanismo de acción de los preparados, pero por sí mismas no colorean el cabello, sino que requieren de otra sustancia que las transforme en compuestos colorantes. Para esto se utiliza un activador, siendo el más empleado el pirogalol (1,2,4-trihidroxibenceno). Se trata de un agente reductor que, al reaccionar con la sal metálica, forma el óxido del metal correspondiente. Las sales y el activador suelen ser incompatibles entre sí, por lo que se envasan por separado y solamente se mezclan antes de la aplicación de la tinta. [15]

No obstante, más allá de la popularidad de las tintas, no siempre se toma en cuenta que las sales utilizadas en su formulación son potencialmente tóxicas. Además, los reductores empleados en las tintas para romper los puentes de azufre de la queratina y dar lugar al nuevo enlace, pueden llegar a liberar los iones metálicos de las sales, con el riesgo de ser absorbidos y producir efectos tóxicos. Por ese motivo, la legislación cosmética establece ciertas restricciones en su concentración [16].

Las sales más empleadas son las de Ag, de Pb y de Bi, siendo el nitrato de plata, el acetato de plomo y el citrato de bismuto los principios activos más comunes, que reaccionan con el azufre presente en la queratina capilar para formar sulfuros insolubles de color oscuro. En ocasiones, para variar los tonos, se adicionan sales de otros metales, como cobre, hierro, níquel o cadmio [15].

Los metales pueden entrar en la circulación general a través de las capas de la piel y transportarse a varios órganos dentro del cuerpo. Esta permeación puede ocurrir a través de glándulas y folículos pilosos [10, 11]. Los metales no son biodegradables, y generalmente no

sufren metabolizaciones, tienen una vida media prolongada lo que les permite permanecer en los seres humanos y en el medio ambiente durante muchos años [17].

1.3. **Toxicidad**

Elementos potencialmente tóxicos son aquellos que no poseen funciones biológicas conocidas y que resultan tóxicos para los seres humanos. Dentro de este grupo se encuentran los elementos previamente mencionados Pb, Cd, Ag y Bi.

Plomo: Debido al impacto negativo del Pb sobre la salud descrito en las últimas décadas, y la multiplicidad de fuentes de exposición, el monitoreo de la exposición humana a este elemento mediante la determinación de sus niveles en muestras biológicas se ha convertido en un objetivo importante de la toxicología moderna.

Para que se desarrolle una intoxicación por plomo no es necesaria una exposición aguda importante ya que el organismo lo acumula. Afecta a todos los órganos del cuerpo, siendo el sistema nervioso el blanco más sensible en la toxicidad por plomo, Figura 3. [18]

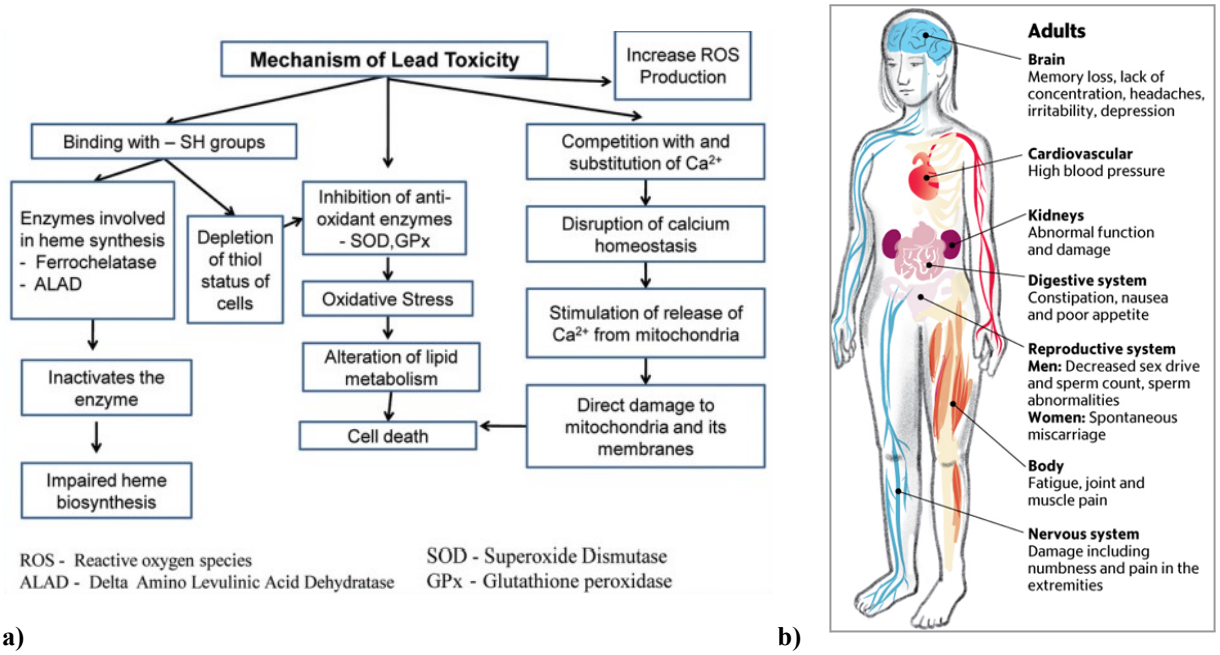


Figura 3. (a) Esquema de uno de los mecanismos postulados en la toxicidad del plomo. La base bioquímica de su toxicidad es la capacidad de unirse a moléculas biológicamente importantes interfiriendo en sus funciones [19]. **(b)** Algunos efectos de la exposición a plomo en adultos. La exposición continua a bajos niveles de plomo resulta en bioacumulación y deterioro de la salud en humanos, sin dar síntomas visibles hasta que la afectación es importante. Fuente de la imagen: Agencia nacional de salud pública de EUA (Centro para el control y prevención de enfermedades, CDC).

El principal mecanismo tóxico del plomo es la suplantación de cationes polivalentes (especialmente calcio y zinc) en las maquinarias moleculares del organismo, dado que establece interacciones muy favorables con los grupos que coordinan los cationes en las proteínas, en ocasiones con más afinidad que la del propio ion suplantado [19]. Dentro de las células el plomo se une a grupos sulfhidrilos e interfiere con múltiples enzimas, incluso en la síntesis del grupo hemo, y en la síntesis de vitamina D. También se une a las membranas mitocondriales, interfiriendo en la síntesis proteica y de ácidos nucleicos [20].

Según la Agencia para Sustancias Tóxicas y Enfermedades (ATSDR), el plomo se encuentra en el lugar 2 del ranking de compuestos que representan una amenaza potencial para la salud humana [21]. Los Centros de Control y Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (CDC), señalan que no existe nivel seguro de plomo en sangre. Aun a niveles bajos de exposición el plomo puede causar alteraciones neurológicas y cognitivas. Efectos subclínicos como dificultad para concentrarse, fatiga, deterioro de la memoria, irritabilidad, entre otros signos tempranos de intoxicación, han sido observados en sujetos con exposición crónica a bajas concentraciones [22].

Altos niveles de plomo llevan al deterioro de las funciones del sistema nervioso central y del sistema endocrino, daño renal y hepático, además de alteraciones genéticas, efectos mutagénicos, teratogénicos y cancerígenos [22].

Los efectos tóxicos son los mismos independientemente de la vía de entrada del plomo al organismo [22]. La eliminación es lenta, entre un 5% y un 10% del plomo absorbido es excretado por el cabello, las uñas y el sudor [23].

Cadmio: Al igual que el plomo, el Cd tiene una vida media muy alta (20-35 años), por lo que su capacidad acumulativa en el cuerpo es importante, siendo uno de sus efectos adversos, el reemplazo de Zn en sitios activos enzimáticos [22, 24].

Mientras que en exposición aguda el cadmio forma complejos con proteínas acumulándose en hígado y riñones, la exposición crónica produce acumulación en los huesos por desplazamiento y sustitución del calcio [22].

La ATSDR sitúa al cadmio en la posición 7 del ranking de las sustancias más peligrosas, y señala que sus efectos dependen de la ruta de exposición [21].

Plata: En general, se considera que este elemento presenta una amenaza tóxica relativamente baja para los humanos porque la exposición no intencional a grandes dosis del metal noble es bastante rara; ocupa el lugar 229 del ranking mencionado anteriormente [21].

Sin embargo, a medida que aumenta la utilización intencional de Ag en preparaciones y dispositivos farmacéuticos, los efectos tóxicos sutiles de la plata pueden ser predecibles y esperados. Las dosis altas de Ag pueden inducir problemas clínicos neurológicos y/o psiquiátricos [25].

La sobreexposición a Ag puede provocar efectos adversos de baja intensidad en varios parámetros metabólicos al afectar a otros elementos. Por ejemplo, disminuye la absorción de selenio en el tracto gastrointestinal, su deficiencia aumenta la génesis de tumores mamarios espontáneos, y puede causar mal funcionamiento de la glándula tiroides [22].

Bismuto: Aunque se considera que este elemento no es tóxico y un adulto tolera hasta 15 g, su uso prolongado podría provocar efectos secundarios e incluso toxicidad para los seres humanos; se han reportado problemas motrices, de memoria, musculares, de encefalopatía, de insomnio y síntomas psiquiátricos [26, 27].

La mayoría de las intoxicaciones con bismuto ocurren por sobredosis accidental o deliberada de medicamentos a base de este elemento, unos pocos casos son causados por la exposición ocupacional en la industria manufacturera [28]. El bismuto no se encuentra en el ranking de la ATSDR [21].

Reglamentación: En lo que respecta a los cosméticos, el Real Decreto 1599/1997 establece que los mismos no deben contener cadmio. En cuanto a plomo, particularmente las tintas pueden contener acetato de plomo hasta 0,6%, excepto en países en donde se ha prohibido su uso. Asimismo, varios de los productos pueden contener plata formando sales con cloruro o nitrato hasta un 4%. En lo que respecta a bismuto, no hay restricciones sobre este metal [16].

Debe tenerse en consideración que si bien la concentración del acetato de plomo en las tintas no sería elevada, y que la absorción a través de la piel intacta no es muy importante, la cronicidad de la exposición y la posible presencia de lastimaduras en el cuero cabelludo, sumados a las otras fuentes ambientales de exposición al plomo, hacen que toda medida que tienda a disminuir dicha exposición constituya un aporte importante a la Salud Pública [14].

La exposición a los metales se refleja en concentraciones elevadas en el cabello [11, 14].

1.4. **El cabello como biomarcador**

El biomonitoreo, en su sentido más amplio, ofrece la oportunidad de identificar a las personas que, sin saberlo, están expuestas a sustancias químicas tanto naturales como industriales [29].

La agencia de protección ambiental (EPA) considera actualmente al cabello como un importante biomarcador. Los biomarcadores son elementos de interés, sustancias químicas o metabolitos, que al establecer sus niveles en una matriz biológica permite evaluar la

exposición de una persona al compuesto de estudio [29, 30]. De esta forma, resultan una herramienta útil en los monitoreos biológicos.

Tradicionalmente, matrices biológicas como la sangre y la orina se han empleado en la realización de los análisis de rutina debido a su disponibilidad. A estas dos matrices se las conoce por ello como matrices biológicas clásicas. En las últimas décadas las denominadas matrices biológicas alternativas han aportado una nueva herramienta para la interpretación de los resultados toxicológicos [29].

El cabello es una matriz alternativa de gran utilidad debido a su amplia ventana de detección, de meses o incluso años, lo que permite realizar el estudio retrospectivo y establecer el perfil cronológico del mismo [10, 29]. Los xenobióticos presentes en la sangre en el momento del nacimiento del pelo se fijan a la matriz de éste, reflejando un perfil cronológico de la exposición [31].

Debido a que la queratina es resistente a la actividad de enzimas proteolíticas comunes, el cabello es una de las matrices más estables entre los materiales biológicos [24]. Sin embargo, el uso de este para la determinación de la presencia de trazas ha sido controversial. La ausencia de rangos de referencia universales implementados a nivel mundial hace que el análisis de metales en el cabello no se haya convertido aún en un método totalmente aceptado para evaluar la exposición de los individuos. Además se requieren métodos analíticos suficientemente sensibles para su análisis toxicológico, ya que las concentraciones encontradas en esta matriz suelen ser del orden de ng/mg de cabello.

A pesar de esto, la recolección sencilla y no invasiva de muestra de cabello, el fácil transporte y la estabilidad durante el almacenamiento respecto a matrices biológicas clásicas, contribuyó al desarrollo y perfeccionamiento de metodologías analíticas específicas en las últimas décadas [11, 32]. Las herramientas y técnicas mejoradas en el campo de la química analítica, actualmente son capaces de detectar o cuantificar elementos traza a concentraciones extraordinariamente bajas, partes por billón (ppb) [33] .

1.5. **Espectrometría de absorción atómica**

Una técnica de elección para la determinación de elementos a nivel de trazas y ultratrazas es la espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS), que combina características ventajosas, tales como alta sensibilidad, selectividad y la relativa facilidad para la introducción de muestras [33].

Los atomizadores electrotérmicos son por lo general más sensibles debido a que la muestra completa se atomiza en un corto periodo, y el tiempo de residencia promedio de los átomos en la trayectoria óptica es de unos pocos segundos.

Un esquema del funcionamiento del equipo se visualiza en la Figura 4, cuya imagen fue tomada del libro Análisis Instrumental de Skoog D. et al. [34]

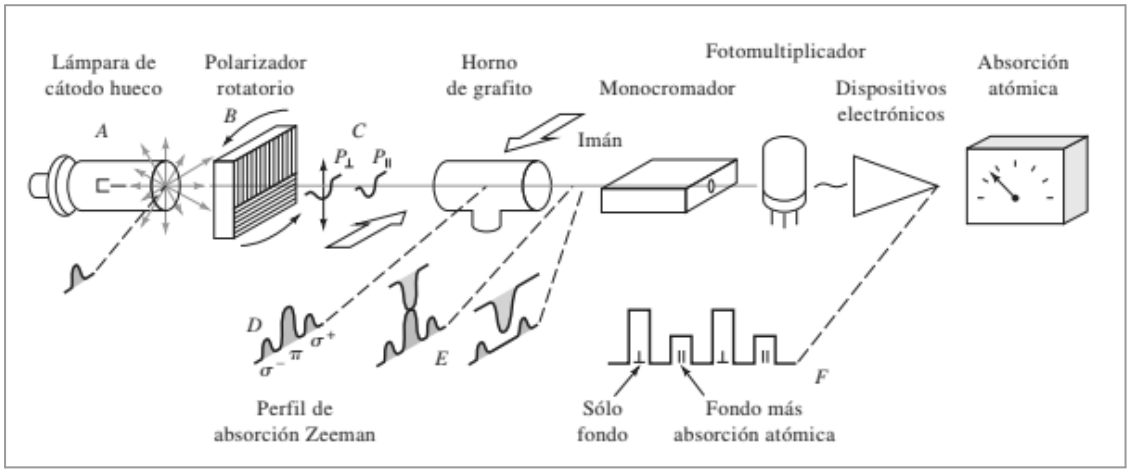


Figura 4. Esquema de funcionamiento de un equipo de espectrometría de absorción atómica electrotérmica que proporciona una corrección de fondo con base en el efecto Zeeman. Los sistemas con esta corrección miden la señal de la absorción de fondo a la longitud de onda exacta donde ocurre la señal de la absorción atómica.

En este equipo la atomización tiene lugar en un tubo cilíndrico de grafito (generalmente revestido pirolíticamente) de extremos abiertos (Figura 5), que dispone de un orificio central para la introducción de la muestra mediante un inyector automático [33, 36]. Unos mililitros de la muestra se evaporan primero a una temperatura baja y luego se convierten en cenizas a una temperatura un poco más alta dentro del tubo de grafito que se calienta eléctricamente. Posteriormente la corriente se incrementa con rapidez, haciendo que la temperatura se eleve de 2000 a 3000 °C. La absorción del vapor atómico se mide en la región inmediatamente por encima de la superficie calentada [34].

Una desventaja de estos métodos espectrométricos es el requisito de que la muestra debe ser introducida en la fuente de atomización generalmente en la forma de una solución. El cabello permite la digestión en medio ácido para degradar la materia orgánica y lograr la extracción cuantitativa de los analitos de la matriz al medio líquido para poder así ser analizados por ETAAS [35].

Previo a la digestión de las muestras, el lavado es una etapa importante de la preparación, ya que una de las limitaciones inherentes al análisis del cabello surge del hecho de que es un matriz en contacto directo con el ambiente externo y puede estar sujeta a una mayor contaminación respecto a otras matrices utilizadas tradicionalmente en el monitoreo biológico.

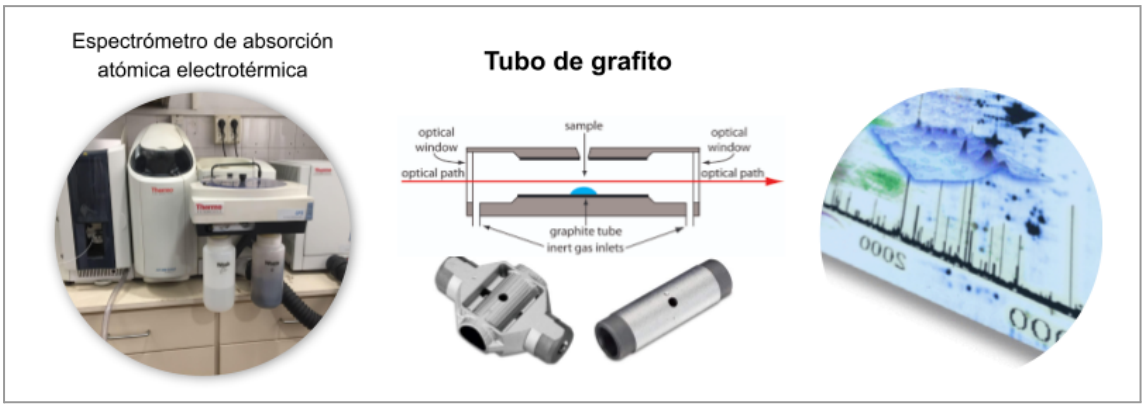


Figura 5. Tubo de grafito utilizado para la técnica de atomización electrotérmica en el espectrómetro, y diagrama esquemático de dicho tubo analizador. Fuentes: lab-training.com y PerkinElmer Inc.

1.6. **Validación de métodos analíticos**

Cada laboratorio debe desarrollar y optimizar las metodologías analíticas de acuerdo a las condiciones de trabajo de su laboratorio y la disponibilidad de equipamiento adecuado. Estas metodologías, para ser confiables, necesitan ser validadas [37]. Con el fin de evaluar el desempeño de un método propuesto se lleva a cabo un determinado protocolo de validación.

A continuación se describen algunos de los parámetros de desempeño evaluados durante la validación de una metodología analítica.

- Intervalo de trabajo: es aquel en el cual el método proporciona resultados con una incertidumbre aceptable. La linealidad del método define la habilidad de este para obtener resultados proporcionales a la concentración del analito.
- Veracidad: es una expresión de la proximidad de la media de un número infinito de resultados (producidos con el método) a un valor de referencia. Puesto que no es posible realizar un número infinito de mediciones, no es posible medir la veracidad. Sin embargo, se puede realizar una evaluación práctica de ésta. Por lo general, esta evaluación se expresa cuantitativamente en términos de sesgo, y existen tres enfoques generales para realizarlo: a) análisis de materiales de referencia, b) experimentos de recuperación utilizando muestras adicionadas, y c) comparación con resultados obtenidos mediante un método de referencia.
- El límite de detección (LOD): se define como el menor contenido de analito que puede detectarse con una certeza estadística razonable. Se determina mediante el análisis de un blanco adecuado.
- El límite de cuantificación (LOQ): es el mínimo nivel de analito que puede ser cuantificado con desempeño aceptable, en cuanto a precisión. La precisión es medida mediante la repetibilidad y precisión intermedia.
- Repetibilidad: estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis

sobre la muestra en las mismas condiciones operativas (un mismo analista, mismos aparatos y reactivos, etc.) en un mismo laboratorio y en un tiempo corto. [38, 39]

1.7. **Objetivos**

Por lo expuesto anteriormente, debido al alto consumo de tintas capilares y los riesgos para la salud de los elementos mencionados, el presente estudio tuvo como objetivo general evaluar los niveles de Ag, Bi, Cd y Pb, en muestras de cabello, provenientes de un grupo de voluntarios que utilizaban tintas capilares frecuentemente, y un grupo de voluntarios con cabellos sin tratar (grupo control). A partir de la comparación de los resultados obtenidos para ambos grupos, se buscó establecer si existen evidencias estadísticamente significativas, que puedan indicar una diferencia entre las concentraciones de los elementos en los grupos de estudio.

Los objetivos específicos de esta investigación fueron:

- Optimizar y validar un procedimiento para la extracción cuantitativa de bismuto, cadmio, plata y plomo en muestras de cabello mediante digestión ácida asistida por microondas, para su posterior determinación analítica por espectrometría de absorción atómica electrotérmica.
- Determinar bismuto, cadmio, plata y plomo en dos grupos de muestras de cabello humano (muestras tratadas con tintas y muestras control) mediante la técnica de absorción con atomización electrotérmica.
- Aplicar herramientas estadísticas para establecer si existen diferencias significativas en los niveles de los mencionados elementos entre ambos grupos de estudio.

2. **MATERIALES Y MÉTODOS**

El presente estudio se llevó a cabo en el marco del Grupo de Bioanalítica y Especiación BIOESP, del Área Química Analítica, DEC (Facultad de Química - UdelaR), con la previa aprobación de la Comisión de Ética en la Investigación en Seres Humanos de dicha Facultad [40].

2.1. **Reactivos y equipos**

- Solución fosfato monoamónico $NH_4H_2PO_4$ 5 g L^{-1} preparada a partir de NH_4H_2PO sólido (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, EUA).

- Solución de $Pd(NO_3)_2$ 10 g L^{-1} (Merck, Darmstadt, Alemania).

- Solución de $Ni(NO_3)_2$ preparada a partir de $Ni(NO_3)_2.6H_20$ (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, EUA).

- Agua ultrapura de resistividad 18,2 MΩcm (ASTM Tipo I) obtenida mediante un sistema de purificación Millipore Direct-Q® 3 UV (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

- Solución de ácido nítrico HNO_3, 30% v/v, preparado a partir de HNO_3 67% v/v (Merck, Darmstadt, Alemania).

- Tritón X - 100 al 1% m/v (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, EUA).

- Acetona $CH_3(CO)CH_3$, para análisis ACS 99,5% (Dorwil Química Analítica S.A., Argentina).

- Soluciones estándar de Ag, Bi, Cd y Pb (Merck, Darmstadt, Alemania).

- Baño ultrasonido Cole-Parmer 8893 (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, EUA).

- Digestor de microondas CEM Mars 6 provisto con vasos de reacción de 100 mL Easy Prep Plus® (CEM, Matthews, NC, EUA). Figura 6.

- Espectrómetro de absorción atómica con horno de grafito Thermo Scientific™ iCE 3500 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

- Material de referencia estándar (SRM), National Institute for Environmental Studies, NIES N°5 – *Human Hair*, Japón.

Figura 6. Fotos del digestor de microondas analítico utilizado para la preparación de muestras en la etapa de la digestión ácida del cabello. Fuente: CEM Corporation.

2.2. **Recolección de muestras**

La recolección de muestras de cabello humano para este estudio se realizó en la ciudad de Montevideo, Uruguay, con el consentimiento informado por escrito de los participantes del estudio. Se recolectaron un total de 61 muestras, de las cuales 34 correspondían a cabellos tratados con tinta permanente, 26 a cabello sin tratar (grupo control) seleccionados al azar, y una muestra procedía de una voluntaria con tinte Henna.

Los participantes, adultos de edades comprendidas entre 17 y 84 años, además de firmar el consentimiento completaron un cuestionario (Anexo 1), donde se consultaba edad, ocupación, hábitos alimenticios, ingesta de suplementos, tabaquismo, color natural del cabello, marca y número de tinta capilar, así como la frecuencia con la que las utilizaban, de forma de poder evaluar si hay correlaciones entre los niveles de metales en cabello y los hábitos de los participantes.

La información y los datos de los participantes fueron utilizados de manera estadística, manteniendo la identidad en forma confidencial (Decreto Ministerial 158/019 - Comisión Nacional de Ética en Investigación – 03/07/2019).

Las muestras se obtuvieron de la región del lóbulo occipital de la cabeza, empleando tijeras de acero inoxidable limpias y secas, cortando un mechón de pelo de aproximadamente medio centímetro de diámetro transversal.

Inmediatamente después de la toma de muestra, el cabello se almacenó a temperatura ambiente, en bolsas de polipropileno selladas y rotuladas, de forma de mantener la trazabilidad [37] .

De las 61 muestras, tres pertenecían a un mismo participante, siendo la primera toma de muestra de cabello sin tratar, la segunda toma de cabello teñido con una marca de tinta, y la tercera toma teñida con otra marca de tinta.

La Figura 7 muestra información general del trabajo realizado.

Figura 7. Datos generales del análisis de muestras de cabello para la detección y cuantificación de Ag, Bi, Cd y Pb, llevado a cabo en el laboratorio del Área Química Analítica, FQ.

2.3. **Descontaminación de materiales**

Antes de proceder a la preparación de las muestras (24 hs antes) los vasos de reacción EasyPrep Plus® del Digestor Mars se descontaminaron con solución de HNO_3 al 20 % v/v, y fueron enjuagados con agua ASTM Tipo I. Se secaron a temperatura ambiente en un sitio libre de polvo, y se almacenaron en un sector limpio y seco.

2.4. **Preparación de muestras**

Cada una de las 61 muestras se sometió a una serie de pasos con el fin de prepararlas para las determinaciones espectrométricas de los analitos.

Eliminación de la contaminación externa:

Los cabellos se limpiaron utilizando un método que elimina de forma eficaz la contaminación exógena, sin afectar la capa de tinta del cabello. La eliminación se llevó a cabo mediante sucesivos lavados. A cada muestra se le realizó primeramente un lavado con acetona, para eliminar la grasitud primaria del pelo. Seguidamente se enjuagaron con agua ASTM tipo I, obtenida mediante el sistema de purificación Millipore Direct-Q® 3 UV, y finalmente para completar el lavado, se las sometió a ultrasonido durante 10 minutos en presencia de tensoactivo Tritón X-100 al 1% m/v, con el fin de eliminar grasitud más adherida. A continuación se enjuagaron las muestras nuevamente con agua ASTM Tipo I y se secaron en estufa a 105 °C durante 120 minutos [41]. Luego se pasaron a un desecador, y posteriormente se almacenaron en tubos rotulados hasta la siguiente etapa. Las muestras fueron manipuladas con especial cuidado para minimizar la posible contaminación externa.

Algunas imágenes de la preparación de muestras se visualizan en la figura 8.

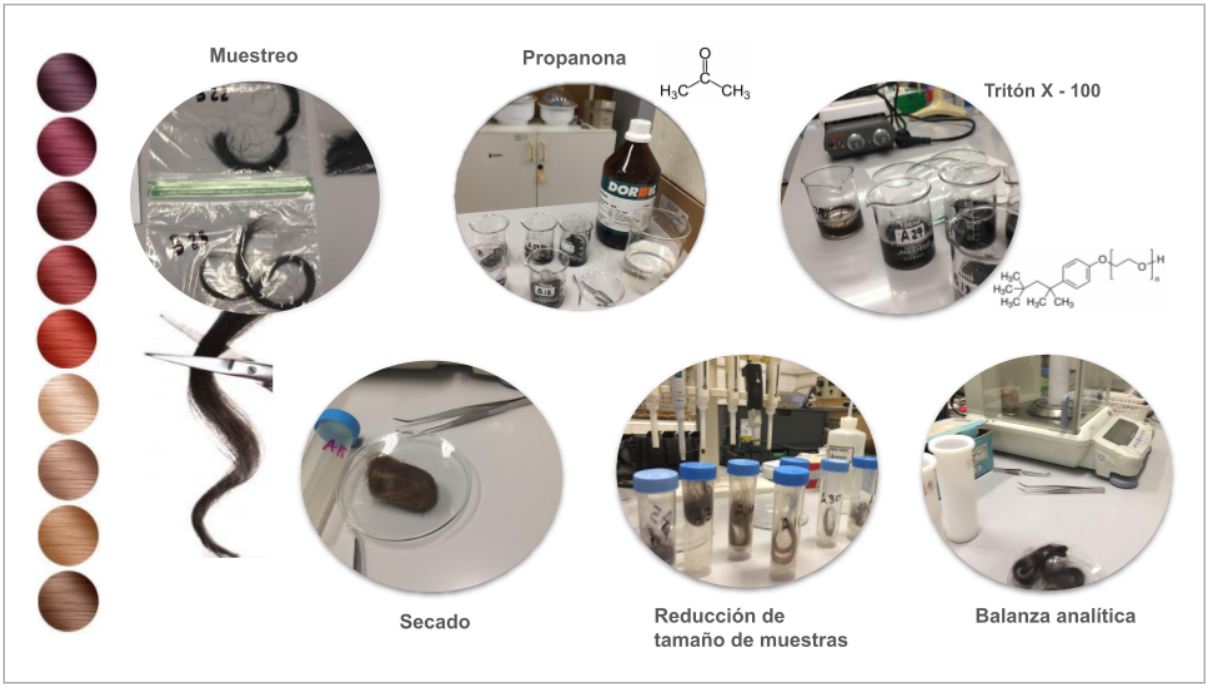


Figura 8. Primeras etapas en la preparación de muestras de cabello para el posterior análisis cuantitativo. Fotografías tomadas durante el trabajo en el laboratorio del Área Química Analítica de la Facultad de Química.

Disminución del tamaño de muestra:

En una segunda etapa de la preparación, se procedió a disminuir el tamaño de las muestras, utilizando tijeras de acero inoxidable limpias y secas, para seguidamente pesar 0,25 g de muestra en los vasos de reacción EasyPrep Plus®. Las muestras se procesaron por duplicado, excepto las que la cantidad de cabello no fue suficiente para una réplica.

Un tratamiento para la destrucción de la materia orgánica y extracción de los analitos a la fase líquida, se realizó mediante digestión ácida asistida por microondas utilizando HNO_3 30% v/v como agente extractante [36, 37, 41].

El proceso se llevó a cabo en los recipientes de reacción de alta presión de teflón incluidos en el digestor Mars One Touch™ que se aprecian en la pasada Figura 6. Con una rampa de calentamiento hasta una temperatura de 180°C, y potencia 400 - 1800 W, se obtuvo una solución límpida y sin suspensiones como se observa en la Figura 9.

HNO_3 30% v/v | Digestor de microondas | Soluciones obtenidas

Figura 9: Digestión ácida asistida por microondas. Fotografías tomadas durante la preparación de muestras de cabello (última etapa) para la posterior evaluación de los niveles de Ag, Bi, Cd y Pb mediante ETAAS.

Se colocaron blancos de reactivo en forma simultánea con las muestras. También el material de referencia certificado de cabello humano recibió el tratamiento descrito anteriormente. Las disoluciones resultantes de la digestión se trasvasaron a tubos rotulados, para posteriormente realizar las determinaciones.

2.5. **Determinaciones analíticas**

Las medidas espectrométricas mediante la técnica de absorción con atomización electrotérmica se llevaron a cabo en el equipo Thermo iCE 3500 (Figura 10), con automuestreador, corrección de fondo Zeeman, y lámparas de cátodo hueco de elemento único.

2.5.1. **Validación de metodologías**

Con el fin de asegurar la eficacia del instrumental y de los métodos empleados, y así la confiabilidad de los resultados, se verificaron los parámetros analíticos previamente descritos. Para ello se realizó una validación considerando las recomendaciones de la guía EURACHEM de la cooperación europea para la Química Analítica.

Las características de desempeño evaluadas fueron: linealidad, precisión y veracidad; además se estimaron los límites de detección (LOD) y los límites de cuantificación (LOQ) para Ag, Bi, Cd y Pb.

Disoluciones estándar de los analitos se prepararon a partir de las soluciones comerciales concentradas, utilizando agua ASTM Tipo I. La linealidad de las curvas de calibración, fue determinada mediante el valor del coeficiente de determinación (R^2) e inspección visual. Cada 20 determinaciones aproximadamente, se midieron soluciones estándar con el fin de evaluar posibles cambios en la sensibilidad a lo largo del tiempo. El LOD y el LOQ se calcularon utilizando el criterio 3s y 10s respectivamente, siendo “s” la desviación estándar de la muestra sin analito (blanco). En cada caso se realizaron 10 mediciones.

Material de referencia certificado de cabello humano NIES 5 se utilizó para evaluar la veracidad y la precisión de la metodología analítica. La veracidad se evaluó mediante la determinación del porcentaje de recuperación, mientras que la precisión se evaluó como desviación estándar relativa porcentual (RSD).

2.5.2. **Detección y cuantificación de los analitos**

Se optimizaron las condiciones analíticas incorporando modificador químico de matriz en las determinaciones de Bi, Cd y Pb, con el fin de obtener la mejor respuesta instrumental [36]. Para Pb se añadió como modificador una solución de $NH_4H_2PO_4$, de 5 g L^{-1}, para Bi se empleó una solución de $Ni(NO_3)_2$ de 10 g L^{-1}, y para la determinación de Cd una solución de $Pd(NO_3)_2$ de 500 mg L^{-1}.

Como se mencionó anteriormente, en los atomizadores electrotérmicos, la atomización tiene lugar en un tubo de grafito. Las mediciones se realizaron inyectando 20 µL de solución muestra en dicho tubo, 10 µL de modificador en los casos requeridos, y ejecutando el programa de temperaturas adecuado para cada metal dependiendo de la volatilidad del elemento. Las mediciones se realizaron en las líneas 228,8 nm para Cd, 283,3 nm para Pb, 328,1 nm para Ag y 223,1 nm para Bi, utilizado como señal la absorbancia integrada, es decir, el área de pico.

Figura 10. Fotografía del equipo utilizado para la detección y cuantificación de Ag, Bi, Cd y Pb en cabello, mediante espectrometría de absorción atómica electrotérmica.

2.6. **Análisis estadísticos**

Los datos experimentales de las muestras se ingresaron en la versión 28.0.0.1 del *software* IBM SPSS Statistics, para un primer tratamiento estadístico**,** y posteriormente fueron

importados al *software* JMP 17.0 de SAS Institute, Inc. para complementar el análisis. Se llevó a cabo la prueba *t* de *Student* para las medias de los grupos tratado y control. Un valor de $p < 0.05$ para todos los resultados se consideró estadísticamente significativo.

3. **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

3.1. **Parámetros de desempeño**

Los resultados de los parámetros de validación evaluados para la metodología analítica desarrollada cumplieron con los criterios de linealidad y repetibilidad establecidos. Los valores calculados de LOD y LOQ fueron satisfactorios.

El resumen de los parámetros de desempeño se muestra en la Tabla 2. El método de medición utilizado fue lineal hasta los valores de concentración indicados en dicha tabla, siendo superiores a 0,99 los coeficientes de determinación obtenidos para las regresiones lineales de todos los analitos.

Los límites de detección calculados fueron 0,0096 μg g^{-1} (Ag), 0,055 μg g^{-1} (Bi), 0,0034 μg g^{-1} (Cd), y 0,0024 μg g^{-1} (Pb), mientras que los límites de cuantificación resultaron en 0,034 μg g^{-1} (Ag), 0,18 μg g^{-1} (Bi), 0,011 μg g^{-1} (Cd) y 0,0080 μg g^{-1} (Pb).

Las recuperaciones obtenidas en las determinaciones realizadas con el material de referencia certificado de cabello humano NIES 5, en promedio superaron el 60%. La precisión (estimada como repetibilidad) evaluada en términos de desviación estándar relativa RSD (n=6) resultó inferior al 10% para todos los analitos.

Tabla 2. Resultados de los parámetros analíticos de desempeño en la validación de las metodologías aplicadas para la determinaciones en muestras de cabello (LOD: límites de detección, LOQ: límites de cuantificación).

		Ag	Bi	Cd	Pb
Linealidad [a]	μg L^{-1}	0,84 - 425	4,59 - 66	0,28 - 4.0	0,20 - 41
Precisión	(RSD % n = 6)	<10%	<10%	<10%	<10%
LOD [b]	μg L^{-1}	0,24	1,38	0,085	0,059
	μg g^{-1} *	0,0096	0,055	0,0034	0,0024
LOQ [c]	μg L^{-1}	0,840	4,59	0,280	0,20
	μg g^{-1} *	0,0336	0,184	0,0112	0,0080

[a] Rango de trabajo lineal [b] 3σ, n=10 [c] 10σ, n=10 * Expresados en base seca.

3.2. **Niveles de elementos evaluados**

El 64 % de las determinaciones presentaron valores por encima del límite de detección LOD de cada analito, y en el 42 % de las determinaciones estos fueron además cuantificables al presentar niveles por encima de sus respectivos LOQ.

Un 97,7% de las muestras presentaron niveles cuantificables de Pb, y en el grupo de cabellos tratados (n=34) la totalidad de las muestras contenían niveles de Pb por encima de su LOQ.

Para Ag, Bi y Cd, se observó una menor cantidad de muestras con niveles superiores a sus respectivos LOQ. Por ejemplo, en el caso de Cd, del 75% de muestras que presentaron valores detectables de este elemento, solamente un 48% resultaron por encima de su límite de cuantificación. La Figura 11 muestra las concentraciones obtenidas para cada analito.

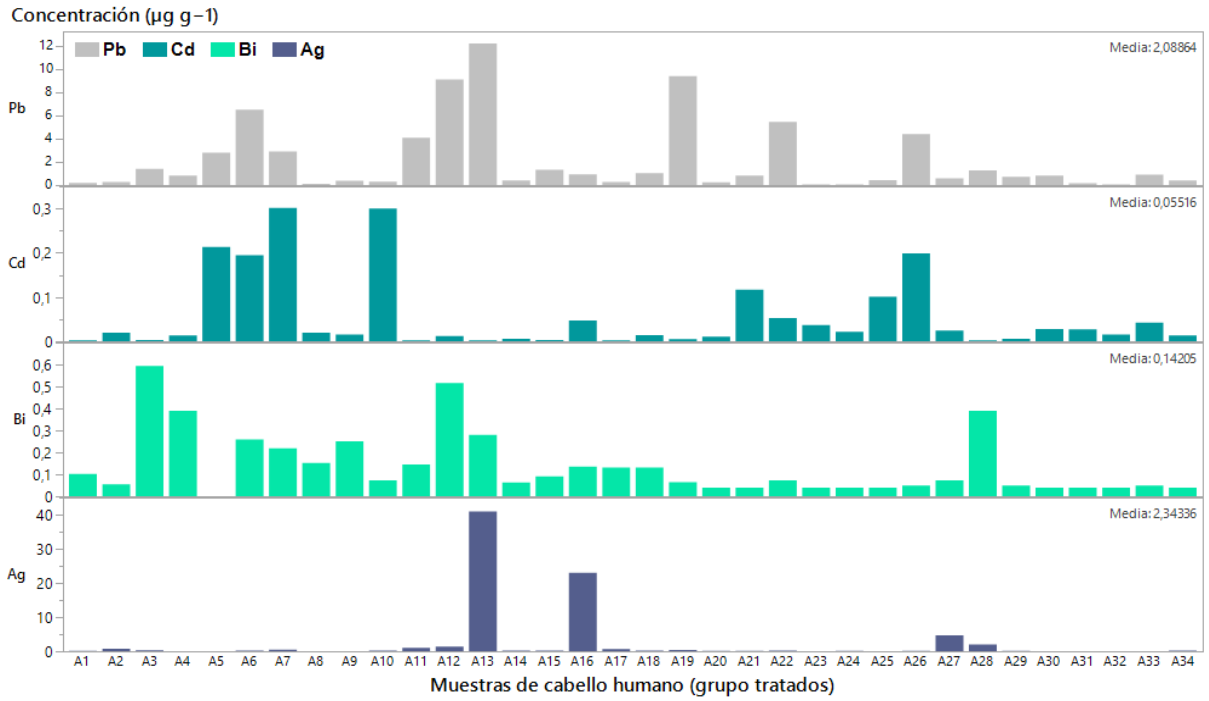


Figura 11. Niveles de Ag, Bi, Cd, y Pb determinados en cabellos tratados con tintas (n=34). Las concentraciones se expresan en µg de analito por gramo de cabello en base seca (tabla de resultados en Anexo 2).

Las tasas de detección más bajas se observaron para Ag, tanto en muestras de cabello tratado como en el grupo control. Los niveles de Pb fueron comparables a los de Ag, mientras que los niveles de Bi a los de Cd. Sin embargo, en el caso de las muestras de cabello tratado (grupo con niveles de Ag atípicos) los diagramas de caja sin valores "outliers" indican al Pb como el más elevado (Figura 12). Esto concuerda con estudios previos que han demostrado que el Pb está presente en el cuerpo humano en concentraciones más altas respecto a los otros metales.

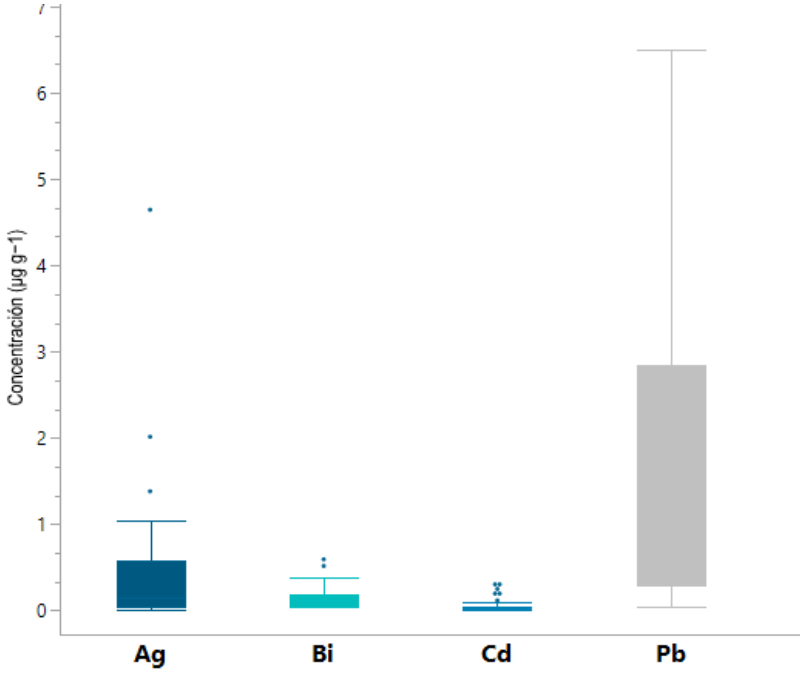


Figura 12. Diagramas de caja para niveles de los elementos evaluados en muestras de cabellos tratados. Nota: se excluyeron los valores atípicos.

3.3. **Concentraciones medias obtenidas**

Los niveles de analitos se expresaron como media ± desviación estándar (SD). La Tabla 3, en la que figuran las concentraciones medias de cada analito, muestra que el menor valor se observa en Cd, con una media de (0,055 ± 0,085) µg g^{-1}, mientras que el valor más elevado lo presentó Ag, en el grupo de cabellos tratados.

Tabla 3. Resumen de resultados para los niveles de los analitos encontrados en muestras de cabellos tratados y en el grupo control.

	Pb (µg g^{-1})		**Cd** (µg g^{-1})		**Ag** (µg g^{-1})		**Bi** (µg g^{-1})	
	Caso	Control	Caso	Control	Caso	Control	Caso	Control
Media	**2,089**	0,988	**0,055**	0,054	**2,343**	0,492	**0,142**	0,096
SD	3,062	1,065	0,085	0,094	8,003	1,137	0,146	0,110
SD/√ n	0,525	0,209	0,014	0,018	1,393	0,223	0,025	0,022
Rango	0,037 - 12,2	0,017 - 4,30	0,011 - 0,30	0,024 - 0,399	0,033 - 40,90	0,033 - 4,47	0,142 - 0,590	0,096 - 0,424
	n=34	n=26	n=34	n=26	n=33	n=26	n=33	n=26

SD: desviación estándar. SD/√ n: error estándar.

Los valores SD reflejan la distribución de la concentración del elemento debido a la variabilidad de cada individuo. Fueron visibles diferencias extremas en casos particulares para Pb, Cd y Ag en muestras tratadas, como se aprecia en el gráfico de la Figura 11 y en las tablas del Anexo 2. Ag mostró la desviación estándar más alta en ambos grupos de muestras (tratados y control), lo que indica la variación individual en la concentración del elemento.

Estos valores elevados en casos particulares podrían deberse, por ejemplo, a una exposición continua a bajas concentraciones de Ag, dado el creciente aumento en los últimos años de las aplicaciones de este elemento como agente antimicrobiano.

3.4. **Cabellos tratados versus control**

Como indicó la Tabla 3 y se observa en la Figura 13, los cabellos tratados presentaron valores de media superiores al grupo control para los cuatro analitos. Sin embargo, en el análisis estadístico de los resultados, a un nivel de significancia $p < 0,05$ la prueba *t* de *Student* para las medias de los grupos tratado y control indicó que las diferencias no fueron significativas (Anexo 3).

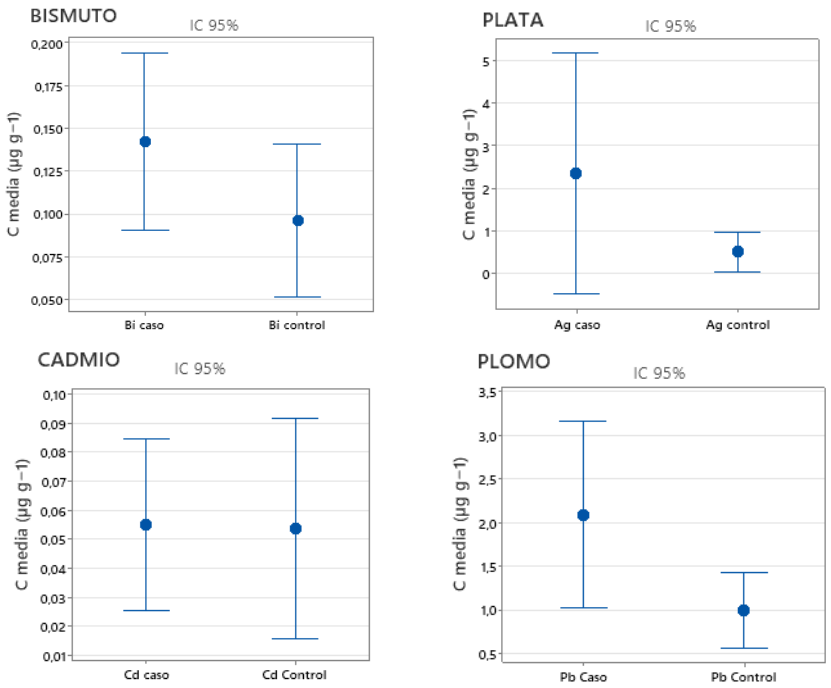


Figura 13. Medias de concentración de analitos evaluados en el grupo cabellos tratados en comparación con los valores medios del grupo control.

En el caso de las muestras aportadas por la misma persona mediante tomas sucesivas en tres tiempos diferentes, la Tabla 4 indica un aumento en el nivel de Pb para el cabello tratado con la tinta 1 (0,28 µg g^{-1}) y con la tinta 5 (0,26 µg g^{-1}) respecto a la muestra de cabello sin tratar B21 (concentración 0,15 µg g^{-1}). Para Ag se observó también un aumento, mientras que los niveles de Cd y Bi no mostraron una tendencia clara.

Tabla 4. Niveles de los elementos evaluados en cabello procedente de una misma participante en tres casos diferentes (primeramente sin tinta, segundo con tinta 1, tercero con tinta 5). Concentración en µg g^{-1} expresada en base seca.

	Concentración (µg g^{-1})			
	Pb	**Cd**	**Ag**	**Bi**
Muestra **B21** [a]	0,1539	0,0084	0,0494	0,1440
Muestra **A17** [b]	0,2842	0,0024	0,7047	0,1316
Muestra **A20** [c]	0,2569	0,0105	0,0850	0,0390

[a] Control; [b] Tinta 1; [c] Tinta 5

3.5. **Análisis de correlaciones**

Se realizaron análisis de Pearson con el fin de estudiar la correlación e interacción entre los cuatro elementos evaluados (Figura 14). Estos no mostraron correlaciones significativas, pero en el par Pb/Ag del grupo de tratados, el coeficiente obtenido fue 0,49 (nivel de significancia: $p < 0,05$) indicando correlación positiva moderada. Esto podría reflejar interacciones químicas similares de estos dos elementos con la queratina del cabello. En este sentido algunos autores han sugerido que ciertos iones metálicos podrían suprimir o promover la unión de un elemento particular a la fibra capilar humana; se comportan de manera diferente en presencia de otros iones que afecten su reactividad [9].

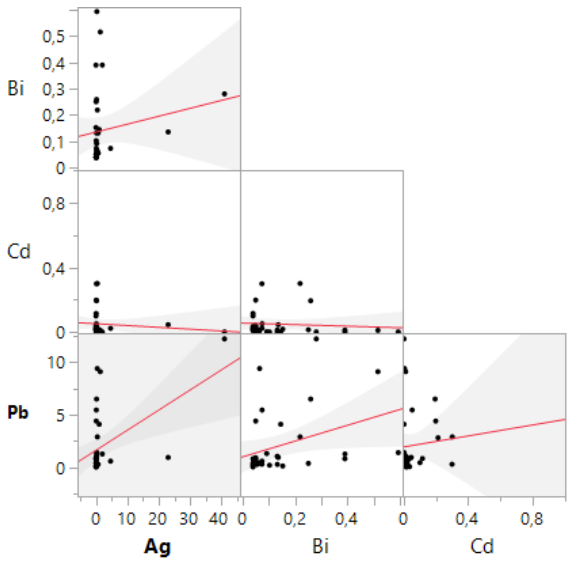


Figura 14. Correlaciones: matriz de gráficos de dispersión para Ag (n=33), Bi (n=33), Cd (n=34) y Pb (n=34) en muestras de cabellos tratados. Correlación Pb/Ag, coeficiente de Pearson (r) = 0,49 (significancia: $p < 0.05$).

La prevalencia de plomo se asoció al tabaquismo. Las muestras de cabellos tratados que contenían niveles de Pb superiores a 2,0 µg g^{-1} pertenecían a individuos relacionados con el tabaco (fumadores, ex fumadores o fumadores pasivos) excepto uno. La excepción fue la

muestra con el nivel más alto de Pb (12,2 µg g^{-1}) como indica la Figura 15, que no indicó tabaquismo en el formulario. Se trata de una participante que podría haber estado expuesta a otras fuentes de plomo importantes ya que, por ejemplo, su domicilio se ubica en una zona en donde se estima que los niveles de Pb a nivel ambiental son relativamente altos. Además es posible que tenga algún vínculo con el tabaco y no lo haya declarado.

En el mismo sentido la mayoría de las fumadoras presentaron elevada concentración de plomo como se observa también en la Figura 15. Una excepción a destacar es el caso de una participante de cabellos tratados cuya encuesta mostraba hábitos saludables -exceptuando el tabaquismo- respecto a las demás consumidoras de tabaco, y costumbres como la ingesta de suplementos de Mg, Zn y Ca. Es sabido que estos minerales están asociados a una menor acumulación de plomo en el cuerpo, e incluso pueden revertir una intoxicación. Además factores genéticos podrían estar siendo la causa de una menor acumulación de plomo en el cabello, como por ejemplo una diferente composición proteica de la fibra capilar [1].

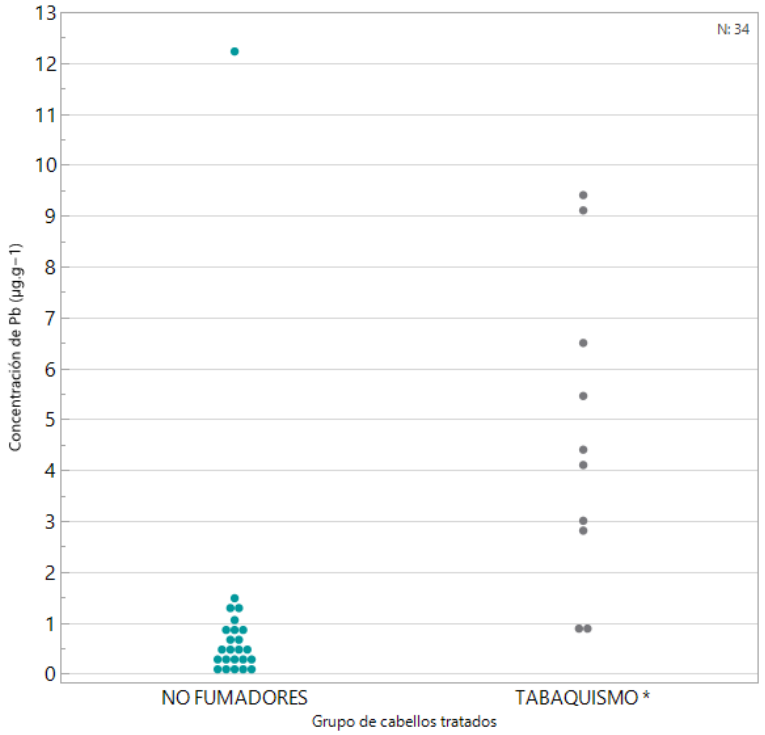


Figura 15. Concentración de plomo en grupo de cabellos tratados y su relación con el tabaquismo. En el grupo control solamente un participante declaró tener vínculo con el tabaco, razón por la cual no se graficó el control. * Fumadores de tabaco, ex fumadores y fumadores pasivos.

La mayoría de las muestras relacionadas con el tabaquismo provenían de las participantes de cabellos tratados, razón por la cual el gráfico solamente corresponde a dicho grupo. Este hecho podría explicar el resultado elevado de la concentración media de cabellos tratados respecto al grupo control.

En cuanto a Cd, valores altos respecto a la media de tratados y control, se observaron en participantes también vinculados al tabaquismo, pero en los individuos extrictamente fumadores (no ex fumadores, ni pasivos).

Se encontró una asociación significativa entre la cantidad de Pb y el grado educativo, con una correlación negativa. Los niveles más elevados del elemento coincidieron con participantes sin educación secundaria finalizada y las concentraciones superaron los 4,0 $\mu g\ g^{-1}$ como muestra el gráfico de la Figura 16 (a), siendo todas las muestras correspondientes al grupo de tratados en ese caso. Por otro lado, los niveles más bajos de Pb se encontraron en participantes con estudios universitarios de posgrado, presentando una concentración media inferior a 1,0 $\mu g\ g^{-1}$, lo que se aprecia en el gráfico de barras, parte (b) de la Figura 16.

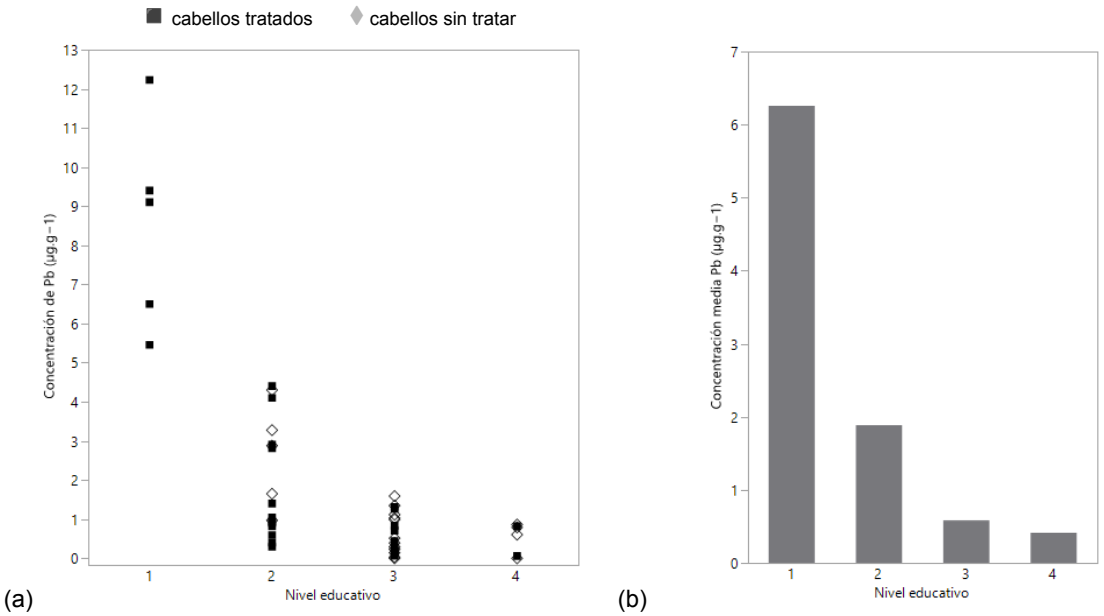


Figura 16. **(a)** Concentración de Pb y nivel educativo (1: educación secundaria incompleta 2: educación secundaria finalizada 3: estudios terciarios completos 4: estudios de posgrado completos **(b)** Concentración media de Pb según el grado educativo.

El grupo de participantes que aportó cabello teñido, además de incluir fumadoras, a diferencia del grupo control, también presentaba grado educativo más bajo que el control. Estos últimos dos factores entonces, tabaquismo y nivel educativo, podrían estar asociados al hecho de que el grupo cabellos tratados presentó valores de concentración media superiores a los cabellos sin tratar, para todos los elementos evaluados, por más que las diferencias no resultaron estadísticamente significativas.

Tanto la coloración de la tinta capilar como la frecuencia de tinción no provocaron diferencias significativas en los niveles de los cuatro elementos.

3.6. **Comparación entre marcas comerciales de tintas**

Como se mencionó antes, durante el muestreo una de las preguntas del cuestionario que completaron los voluntarios era la marca de tinta capilar empleada. Dos de las marcas comerciales utilizadas por las participantes fueron las que predominaron ampliamente respecto a las demás en número de muestras. Las demás marcas (nueve) estaban representadas en solamente una muestra cada una. Los cabellos correspondientes a participantes que se aplicaban la marca número 2 se vincularon a mayor nivel de Ag como muestra la Figura 17; su concentración promedio fue de 7,6 µg g^{-1} frente a 2,5 µg g^{-1} en cabellos tratados con la tinta 1. Del mismo modo para Pb con un promedio de 5,4 µg g^{-1} en muestras de participantes que se trataban con la tinta 2, y 1,4 µg g^{-1} para aquellos que lo hacían con la tinta 1.

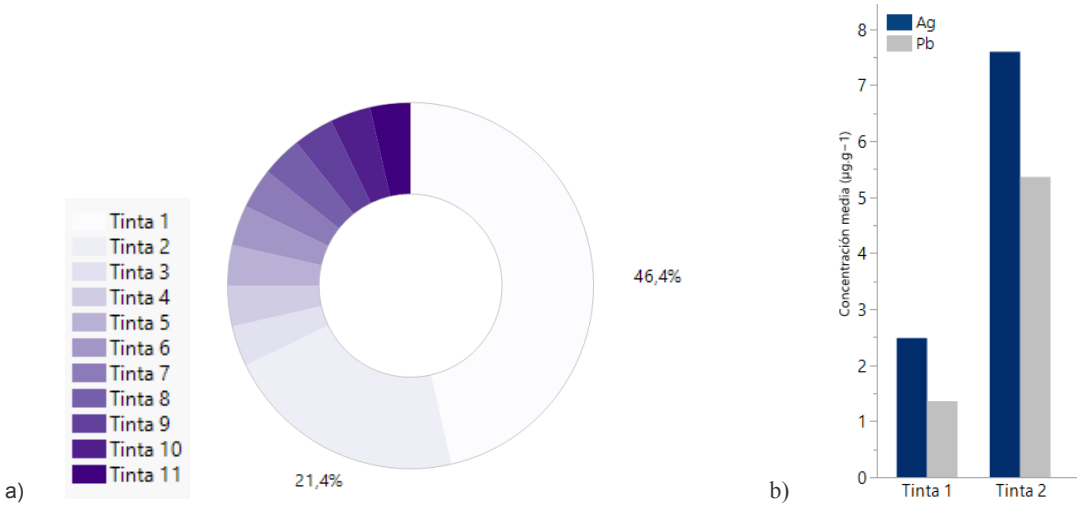


Figura 17. (a) Distribución en porcentaje de muestras correspondiente a cada una de las marcas comerciales de tintas capilares utilizadas por las participantes. (**b)** Niveles promedios de concentración de Ag y Pb correspondientes a la tinta 1 y a la tinta 2.

El cabello de la participante con tinción Henna no presentó valores por encima de la concentración media del grupo control, en los cuatro elementos que fueron analizados.

Resumiendo, para Pb los valores más elevados se asociaron a tres factores: ser fumador, tener educación secundaria incompleta, utilizar la tinta 2.

3.7. **Limitaciones del estudio**

El análisis de cabello tiene en cuenta tanto la exposición interna como la externa, y la separación de los compuestos depositados externamente no es fácil, por lo que siempre queda algo de contaminación exógena no resuelta, por más que se utilice un riguroso método de descontaminación para minimizarla [42, 43].

La exposición puede depender de cuánto tiempo estuvo el cabello en la cabeza (distancia desde el cuero cabelludo) [44]. Los participantes tenían variadas longitudes de cabello. Este hecho puede haber influido en los niveles de los elementos, ya que el cabello más largo está expuesto durante más tiempo, lo que conduciría a concentraciones más altas. Durante el presente trabajo, en el grupo de cabellos tratados no hubo correlaciones estrictas entre la longitud del cabello y los niveles de elementos estudiados. Por ejemplo, en la muestra A26 (longitud del cabello 10-15 cm) la concentración de Pb fue superior a la de la muestra A17 (longitud del cabello 40-50 cm), cuyos valores pueden visualizarse en el gráfico de la Figura 18. Sin embargo en el grupo control (cabellos sin tratar) los niveles más altos de Pb se observaron en las muestras de individuos de cabello más largo (B13, B15 y B24), lo que concuerda con investigaciones informadas anteriormente [45] .

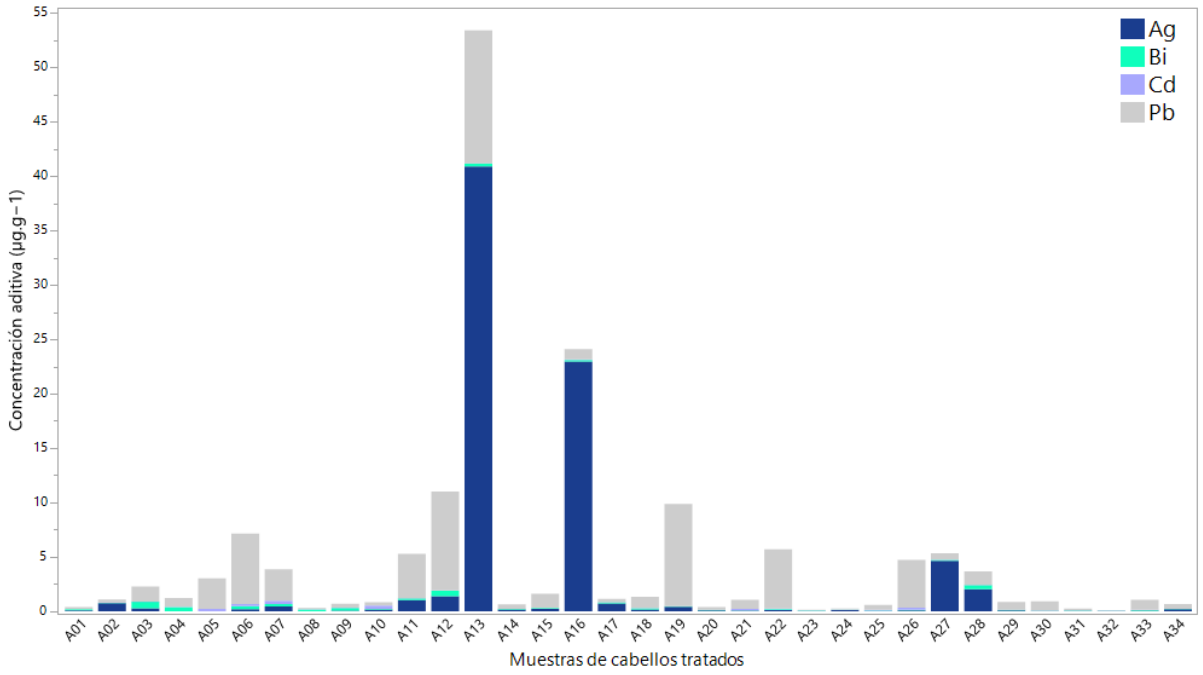


Figura 18. Resultados acumulados de niveles de Ag, Bi, Cd y Pb en cada muestra de participantes de cabellos tratados. Concentración expresada en base seca.

La ausencia de rangos de referencia universales aceptados e implementados a nivel mundial sería otra limitación del estudio [11].

3.8. **Comparación contra valores internacionales**

Aunque no hay rangos de referencia universalmente aceptados en muestras de cabello para los elementos evaluados en este trabajo, en el caso de Pb algunos autores toman como límite máximo en cabello una concentración de 30 µg g^{-1} [46]. En el presente estudio todas las muestras presentaron valores por debajo de dicho límite para Pb.

Durante las últimas décadas diferentes estudios en varias regiones del mundo han llevado a cabo análisis en cabello como biomarcador de exposición, y biomonitoreo de concentraciones de metales, reportando valores de cadmio y plomo. La Tabla 5 presenta una recopilación realizada con el fin de comparar los resultados de este trabajo.

Tabla 5. Comparación de valores para Cd y Pb del presente estudio con niveles en cabello reportados en investigaciones de otras regiones (media ± SD). La tabla fue construída a partir de datos tomados de *papers* publicados en las últimas dos décadas. [a] Este estudio (cabellos tratados). [b] Población expuesta ocupacionalmente.

Locación	Cd (µg g−1)	Pb (µg g−1)
Alemania	0,42 ± 0,49	8,2 ± 6,4
Brasil [b]	0,06 ± 0,05	12,5 ± 0,7
China	0,071 ± 0,032	1,56 ± 0,78
Egipto	0,35 ± 0,19	6,82 ± 2,85
España	0,022 ± 0,054	1,46 ± 0,21
Estambul	0,040	1,9
Francia	0,011	0,41
Ghana	0,06 ± 0,04	2,24 ± 0,71
India	0,5	10,8
Irán	0,62	2,86
Italia [b]	0,23 ± 0,55	7,11 ± 5,92
Japón	-	4,80 ± 4,64
Jordania	0,5	7,0
Marruecos	0,6 ± 0,2	4,6 ± 2,2
Nigeria	0,02	0,71
Pakistan [b]	1,25 ± 0,31	7,47± 0,38
Polonia	0,11 ± 0,14	1,05 ± 1,39
Portugal	0,236 ± 0,075	-
Suecia	0,058 ± 0,056	0,96 ± 0,85
Montevideo [a]	0,055 ± 0,085	2,09 ± 3,06

La exposición humana a estos elementos está asociada a factores como el estilo de vida, la ubicación geográfica, y el entorno laboral, razón por la cual los valores de la Tabla 5 se distribuyen en un amplio rango de concentraciones [11]. Además la variedad de métodos de lavado aplicados en diferentes laboratorios hace que los resultados no siempre puedan ser comparados válidamente [11, 44]. Para Ag y Bi se han reportado escasas investigaciones en cabello. Un estudio realizado en España informó una media de (0,61 ± 0,39) µg g^{-1} para Ag (n=25), comparable a la media del grupo control de el presente estudio, y un rango de (0,10 - 1,62) µg g^{-1} [47].

4. **CONCLUSIONES**

Las metodologías desarrolladas en este estudio fueron validadas y demostraron que cumplen con los criterios de aceptación. Los valores de LOD y LOQ estimados experimentalmente resultaron satisfactorios. El método es suficientemente sensible para el análisis toxicológico de Ag, Bi, Cd y Pb en cabello.

Dado que los niveles de estos elementos en el grupo de muestras de cabello tratado no mostraron una diferencia estadísticamente significativa respecto a los niveles del grupo control (con una significación del 95%) no se puede asegurar que exista una asociación entre los elementos evaluados y la aplicación de tintas capilares, a pesar de que en cabellos tratados los niveles medios para los cuatro analitos resultaron superiores al control.

Las concentraciones significativamente más elevadas correspondieron a Pb y Ag, mientras que Cd resultó ser el más bajo tanto para el grupo de cabellos tratados como para el control. Sus niveles promedio fueron comparables a los valores reportados internacionalmente en estudios anteriores de cabello humano en población no expuesta ocupacionalmente.

Diferencias extremas de concentración en casos particulares estarían asociadas a los hábitos de los participantes. Por ejemplo, el tabaquismo se vinculó a una mayor cantidad de Pb.

El cabello humano como matriz alternativa y complementaria es de gran utilidad ya que refleja una deposición unidireccional prolongada de elementos, a diferencia de una matriz clásica como la sangre, que refleja un período de equilibrio de tiempo corto entre los diversos tejidos, o la bioquímica de los compartimentos del cuerpo.

El biomonitoreo proporciona evidencia analítica inequívoca de la exposición y puede generar información cuantitativa, pero las fuentes para muchos de los metales son variadas. Sería conveniente realizar más investigaciones en cabellos tratados con tintas, ya que si se verifica que los elementos evaluados no están asociados a las tintas capilares, los *screening* para estos metales no tendrían el inconveniente de que una recolección aleatoria incluya muestras de cabello tratado con tinta, ya que no interferiría con los resultados.

Por último cabe considerar que dada la popularidad mundial de la tinción del cabello, es necesario comprender los riesgos asociados con la exposición a varios elementos, no solamente metálicos, que pueden encontrarse en las formulaciones de tintas capilares. La toxicidad asociada a la exposición crónica, en ciertos casos aún a niveles bajos de ciertas sustancias, hace necesario el biomonitoreo de los mismos, proporcionando así, evidencia de la exposición y generando nueva información.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Horev, L. 2004. Exogenous Factors in Hair Disorders. Exog Dermatol; 3:237-245, doi: 10.1159/000091903

2. Joshi, M. V., Nilkanth, J. V., & Rasane, S. R. 2021. Knowledge, practice and adverse reactions amongst hair dye users - A cross sectional study. International Journal of Ayurvedic Medicine, 12(3), 645–648. doi: 10.47552/ijam.v12i3.1962

3. Guerra, A., Gonzalez, E. 2014. Hair Cosmetics: Dyes, Actas Dermo-Sifiliográficas. Volume 105, Issue 9, Pages 833-839, ISSN 1578-2190. doi: 10.1016/j.adengl.2014.02.003.

4. Benaiges, A. 2007. Tintes capilares. Evolución histórica y situación actual. Vol. 26. Núm. 10 (p. 68).

5. Gera, R., Mokbel, R., Igor, I., Mokbel, K. 2018. Does the Use of Hair Dyes Increase the Risk of Developing Breast Cancer? A Meta-analysis and Review of the Literature ANTICANCER RESEARCH 38: 707-716 doi:10.21873/ anticancer.12276

6. He, L., Michailidou, F., and Gahlon, H., and Zeng, W. 2022. Hair Dye Ingredients and Potential Health Risks from Exposure to Hair Dyeing. Chemical Research in Toxicology Volume 35, number 6, pages 901-915. doi: 10.1021/acs.chemrestox.1c00427

7. Esparza, J. A. 2019. El pelo como matriz toxicológica. Esparza López J. Gac. int. cienc. forense ISSN 2174-9019 Nº 30, enero-marzo.

8. Robert D. Bach, Olga Dmitrenko, and Colin Thorpe. 2008. Mechanism of Thiolate Disulfide Interchange Reactions in Biochemistry. The Journal of Organic Chemistry 2008 73 (1), 12-21. DOI: 10.1021/jo702051f

9. Low, Choon Teck. Human hair keratin and its interaction with metal ions. 2020. Nanyang Technological University. https://hdl.handle.net/10356/142466

10. Kintz, P. 2017. Hair Analysis in Forensic Toxicology: An Updated Review with a Special Focus on Pitfalls. Institut de Médecine légale; 2 X-Pertise Consulting.

11. M Mikulewicz, K Chojnacka, T Gedrange, H Górecki. 2013. Reference values of elements in human hair: a systematic review. Environmental toxicology and pharmacology 36 (3), 1077-1086

12. Ueki R., Fukusaki E., Shimma S. 2022. History of hair analysis by mass spectrometry imaging. Journal of Bioscience and Bioengineering, Volume 133, Issue 2. Pages 89-97, ISSN 1389-1723. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2021.10.009

13. Chisvert A., Miralles P., Salvador A. 2018. Hair Dyes in Cosmetics: Regulatory Aspects and Analytical Methods. In: A. Salvador, A. Chisvert, eds. Analysis of Cosmetic Products. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier.

14. Tamara Attard & Everaldo G. Attard, 2022. Heavy Metals in Cosmetics. Hosam M. Saleh & Amal I. Hassan (ed.), Environmental Impact and Remediation of Heavy Metals, IntechOpen.RePEc: ito: pchaps:256682. DOI: 10.5772/intechopen.102406

15. Alcalde M.T., Del Pozo A. 2002, Formación permanente en dermofarmacia. Coloración del cabello (III). Tintes metálicos. OFFARM 21(10): 189–190.

16. BOE núm. 261, de 31 de octubre de 1997, páginas 31486 a 31513 (28 págs.) I. Disposiciones generales. Ministerio de Sanidad y Consumo. BOE-A-1997-23067 https://www.boe.es/eli/es/rd/1997/10/17/1599

17. Mani M, Kabekkodu S, Joshi M, Dsouza H. 2019. Ecogenética de la toxicidad del plomo y su influencia en la evaluación de riesgos. Toxicología Humana y Experimental. 38(9):1031-1059. doi: 10.1177/0960327119851253

18. Wani AL, Ara A, Usmani JA. Lead toxicity: a review. Interdiscip Toxicol. 2015 Jun; 8(2):55-64. doi: 10.1515/intox-2015-0009. PMID: 27486361; PMCID: PMC4961898.

19. Sridevi Sangeetha KS, Umamaheswari S. 2020. Human Exposure to Lead, Mechanism of Toxicity and Treatment Strategy - A Review. Journal of Clinical and Diagnostic Research 14(12). DOI:10.7860/JCDR/2020/45615.14345

20. Goering PL. Lead-protein interactions as a basis for lead toxicity. Neurotoxicology. 1993 Summer-Fall;14(2-3):45-60. PMID: 8247411.

21. ATSDR (2021). Disponible en: https://www.atsdr.cdc.gov/ (recuperado: 10/2021).

22. Stephen M. Roberts, Robert C. James, Phillip L. Williams. 2015. Principles of Toxicology Environmental and Industrial Applications, pp. 284-286.

23. Amador, R., Farith Damián González-Martínez, Leonardo José Martínez Hernández, Luis Alberto Wilches Vergara, José Nelson Celedón-Suárez. 2015. Niveles de metales pesados en muestras biológicas y su importancia en salud Universidad de Cartagena, Cartagena, Colombia.

24. Molina-Villalba I. 2015. Análisis de arsénico y metales pesados (cadmio, manganeso, mercurio y plomo) en orina y cabello de población residente en Huelva. Tesis Doctoral. University of Granada UGR · Departamento de Medicina Legal, Toxicología y Psiquiatría. (pp. 27, 37, 44).

25. Momčilović B., Prejac J., Višnjević V., Mimica N., Morović S., Čelebić A., Drmić S. & Viktorovich Skalny A. 2012. Environmental human silver exposure, Toxicological & Environmental Chemistry, 94:6, 1238-1246. DOI: 10.1080/02772248.2012.692556

26. Bijun Liu, Fengchang Wu, Xingliang Li, Zhiyou Fu, Qiujing Deng, Changli Mo, Jing Zhu, Yuanrong Zhu, Haiqing Liao. 2011. Arsenic, antimony and bismuth in human hair from potentially exposed individuals in the vicinity of antimony mines in Southwest China, Microchemical Journal, Volume 97, Issue 1, Pages 20-24, ISSN 0026-265X, https://doi.org/10.1016/j.microc.2010.07.008.

27. Runming Wang, Hongyan Li, and Hongzhe Sun. 2019. Bismuth: Environmental Pollution and Health Effects. Encyclopedia of Environmental Health. 2019 : 415–423. DOI: 10.1016/B978-0-12-409548-9.11870-6 PMCID: PMC7152204

28. Serfontein W.J., Mekel R. 1979. Bismuth toxicity in man II. Review of bismuth blood and urine levels in patients after administration of therapeutic bismuth formulations in relation to the problem of bismuth toxicity in man. Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology 26(2): 391–411

29. Paustenbach D., Galbraith D. 2006. Biomonitoring and Biomarkers: Exposure Assessment Will Never Be the Same. Environmental Health Perspectives 114: 1143–1149

30. Iaquinta, F.; Mañay, N. 2014. El cabello como matriz para análisis de metales tóxicos. ALDEQ N° XXIX, p. 136 - 140.

31. Repetto Khun, Guillermo; Repetto Jiménez, Manuel. 2009. Toxicología Fundamental. Editorial Díaz de Santos, S.A. ISBN 10: 8479788984ISBN 13: 9788479788988. (p. 211)

32. Wołowiec P., Michalak I., Chojnacka K., Mikulewicz, M. 2012. Hair Analysis in Health Assessment PII: S0009-8981(13)00040-5 CCA 12979. Clinica Chimica Act. 10.1016/j.cca.2013.02.001.

33. Mañay, N. Clavijo, G. Diaz, L. Fuente. 2017. Metodologías analíticas para la determinación y especiación de arsénico en aguas y suelos. Capítulo 5, p. 79.

34. Skoog, D.A., Holler, F.J., Crouch, S.R. 2008. Principios de Análisis Instrumental, Sexta Edición, Cengage Learning Editores. (p. 230)

35. Machado I., Dol I., Rodríguez-Arce E., Cesio M.V., Pistón M. 2016. Comparison of different sample treatments for the determination of As, Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in globe artichoke (Cynara cardunculus L.subsp. Cardunculus). Microchemical Journal 128: 128–133.

36. Machado, I. 2016. Estudio conjunto de trazas de metales y compuestos orgánicos en cultivos menores, como insumos para evaluar su calidad nutracéutica e inocuidad alimentaria. 2016. Tesis de Doctorado. Montevideo: UdelaR. FQ. (p. 67)

37. Iaquinta F., Álvarez C., Cousillas A., Mañay N. 2019b. Desarrollo y optimización de una metodología para la determinación de metales y semimetales en cabello. INNOTEC 18: 142 – 153 (p. 144)

38. Eurachem. 2016. Guide to Quality in Analytical Chemistry - 3rd edition. Disponible en: https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/qa.

39. Forero, J.R.; Varón, J.D.; Varela, D.A.; Riaño, D.A.; Acosta, R.D.; Benavides, J.A. 2022 Validation of an Analytical Method for the Determination of Manganese and Lead in Human Hair and Nails Using Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. Separations, 9, 158. https://doi.org/10.3390/separations9070158

40. Resolución 122 del Consejo de la Facultad de Química de la Universidad de la República en sesión ordinaria de fecha 8 de noviembre de 2018. Exp. Nº 101900-001374-18. http://www.expe.edu.uy/expe/resoluci.nsf/5f766c93afdb224003257013005f5a99/948ae461b617b6a103258336004af6b5?OpenDocument&Highlight=0,101900-001374-18

41. Chojnacka K., Zielinska A., Michalak I. 2010. The effect of dietary habits on mineral composition of human scalp hair. Environmental Toxicology and Pharmacology 30: 188–194.

42. Chojnacka K., Górecka H., Górecki, H. 2006. The effect of age, sex, smoking habit and hair color on the composition of hair. Environ Toxicol Pharmacol. Jul;22(1):52-7. doi: 10.1016/j.etap.2005.11.006. Epub 2006 Feb 7. PMID: 21783686.

43. Cooper GA, Kronstrand R, Kintz P; Society of Hair Testing. Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair. Forensic Sci Int. 2012 May 10;218(1-3):20-4. doi: 10.1016/j.forsciint.2011.10.024. Epub 2011 Nov 15. PMID: 22088946.

44. Fang F, Wang Y, Zhu Z, Yao Y, Lin Y, Wang J. 2019. Distribution characteristics and influencing factors of heavy metals in scalp hair of Huainan urban residents. Environ Monit Assess 191:1–10

45. ATSDR. 2001. Panel de discusión sobre el análisis del cabello: Sección: Apéndice C, Sharon Seidel. Disponible en: https://www.atsdr.cdc.gov/hac/hair_analysis/hair_analysis.pdf

46. Haas, E.M. 2000. Staying Healthy with Nutrition: The Complete Guide to Diet and Nutritional Medicine. Celestial Arts. SN 9780890874813.

47. Bermejo-Barrera, P., Moreda-Piñeiro, A., Moreda-Piñeiro, J., & Bermejo-Barrera, A. 1998. Determination of traces of silver in human scalp hair slurries by electrothermal atomic absorption spectrometry. Microchimica Acta, 129 (1), 71-76.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor en Química Ignacio Machado. Tuve el privilegio de que fuera mi tutor y orientador de pasantía. Su profesionalidad, sus acertados consejos, y la generosidad al compartir conocimientos fueron trascendentales, además de su buena actitud en todo momento.

A la Doctora en Química Fiorella Iaquinta, co-orientadora de pasantía, que con su dedicación, compromiso y responsabilidad, fue una continua motivación. Su experiencia y valiosas recomendaciones hicieron posible la realización de este trabajo.

A la Dra. QF Adriana Cousillas, por contactarme con el laboratorio de Facultad.

A la docente de Química Analítica Lucía Falchi, por prestar su cuestionario para voluntarios, además de colaborar con muestras de cabello.

A los demás integrantes del laboratorio, que en la etapa experimental se ofrecieron amablemente por si necesitaba algo.

Finalmente un agradecimiento a cada uno de los voluntarios que aportaron muestra de cabello, y especialmente a una peluquera, Romina, quien sin conocerme colaboró desde el día que pasé por su peluquería (Wonder Stylist) a solicitar ayuda para lograr reclutar el número de participantes que faltaban, con el objetivo de alcanzar la cantidad de muestras requerida.

Alejandra S. Galizia

ANEXO 1

Cuestionario para participantes (diseñado por la docente Lucía Falchi):

Encuesta - Cuestionario: **Código Participante:**_____

Fecha: _____

Datos personales

Apellido: _____

Nombre: _____

Sexo: _____ Fecha nacimiento: _____ Ciudad: _____

E-Mail: _____ Teléfono: _____

Ocupación: _____

Alimentación

Consume diariamente:

Frutas Si / No

Verduras Si / No

Carnes rojas Si / No

Carnes blancas Si / No

¿Fuma? Si / No

Suplementos multivitamínicos y minerales

Consume:

Vitaminas (suplementos, fármacos, etc.)

Si / No

¿Cuál/es?_____

_____

¿Con qué frecuencia?

_____

_____

Minerales (suplementos, fármacos, etc.)

Si / No

¿Cuál/es?_____

_____

¿Con qué frecuencia?

_____

_____

Tratamientos capilares

¿Se realiza alguno? Si / No

¿Cuál/es?:_____

_____

_____

_____

¿Con qué frecuencia? Semanal / Mensual / Semestral / Anual

¿Desde hace cuánto tiempo? Menos de 1 año / Más de 5 años / Más de 10 años

¿Cuál es su color de cabello natural? _____

Observaciones: _____

Consentimiento informado para voluntarios:

Código Participante N° _____

CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO

Montevideo, fecha .....

Yo, Sr/Sra ..... CI.....

Doy mi pleno consentimiento, de manera libre, para participar en el trabajo de investigación **"Estudio de los niveles de minerales y elementos potencialmente tóxicos en cabello, su correlación con los niveles de vitaminas, costumbres alimenticias y tratamientos capilares"**, a cargo de voluntario, habiendo sido informado/a de los alcances del mismo.

He sido invitado/a a participar y se me realizará una encuesta por parte de integrantes del equipo investigador.

He comprendido que la investigación es una contribución para conocer y generar conocimiento sobre los niveles de vitaminas, minerales y elementos potencialmente tóxicos en cabellos y la correlación entre ellos y entiendo que los datos serán tratados en forma estadística, por lo que se mantendrá mi identidad en forma confidencial.

Estoy de acuerdo en que se tomen registros de mis datos para ser utilizados en dicha investigación y en suministrar una muestra de cabello al momento del corte del mismo, para que se realicen los estudios de laboratorio.

Doy mi permiso para que los registros sean utilizados por el equipo de investigación para generar publicaciones y recomendaciones específicas de salud, entendiendo que la información que pudiera identificarme será utilizada en forma confidencial.

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio y he recibido suficiente información sobre el mismo.

Comprendo que mi participación es voluntaria y gratuita, y presto libremente mi conformidad para participar en el estudio. Sé que puedo retirar mi consentimiento en cualquier fase del procedimiento.

Firma del participante .....

Confirmo que he explicado al participante el carácter y el propósito del trabajo de investigación.

Entrega muestra: SI / NO

ANEXO 2

Tablas de datos: concentraciones calculadas (µg g^{-1}) de cada analito en base seca.

Muestra	Plomo	Cadmio	Plata	Bismuto		Control	Plomo	Cadmio	Plata	Bismuto
A01	0,2014	*0,0024	0,0860	0,1021		**B01**	0,3932	*0,0024	0,0675	0,3862
A02	0,2861	0,0198	0,7316	0,0548		**B02**	0,2946	0,0052	0,0494	0,4235
A03	1,4027	0,0028	0,2832	0,5936		**B03**	0,0322	*0,0024	0,0148	0,1963
A04	0,8183	0,0136	0,0068	0,3898		**B04**	0,0017	*0,0024	0,0169	0,0951
A05	2,8141	0,213	-	-		**B05**	2,8823	0,006	0,0514	*0,0390
A06	6,5012	0,1949	0,1948	0,2591		**B06**	0,1449	0,0063	0,0068	*0,0390
A07	2,9049	0,3012	0,4460	0,2188		**B07**	0,7149	0,0291	0,1351	*0,0390
A08	0,1260	0,0193	0,0068	0,1525		**B08**	0,1542	0,0141	0,0177	*0,0390
A09	0,3779	0,0156	0,0490	0,2503		**B09**	1,0301	0,0101	0,0629	*0,0390
A10	0,2965	0,2998	0,1479	0,0729		**B10**	0,2376	0,0159	1,9143	*0,0390
A11	4,1025	*0,0024	1,0343	0,1447		**B11**	0,6082	0,0110	0,0326	0,0559
A12	9,1053	0,0123	1,3815	0,5160		**B12**	1,5935	0,0141	0,0059	*0,0390
A13	12,2284	0,0024	40,899	0,2805		**B13**	4,3036	0,0422	0,0073	*0,0390
A14	0,4001	0,0056	0,1584	0,0630		**B14**	0,8647	0,0281	0,4975	*0,0390
A15	1,3168	0,0034	0,2090	0,0913		**B15**	3,2785	0,0488	0,1101	0,0573
A16	0,9421	0,0471	22,975	0,1354		**B16**	0,0017	0,0249	0,0356	*0,0390
A17	0,2842	0,0024	0,7047	0,1316		**B17**	1,3618	0,0160	0,0473	0,0463
A18	1,0481	0,0141	0,1488	0,1315		**B18**	1,1188	0,3994	0,7351	*0,0390
A19	9,4046	0,0055	0,4016	0,0641		**B19**	0,7922	0,0343	0,0369	0,0532
A20	0,2569	0,0105	0,0850	*0,0390		**B20**	0,1539	0,0084	0,0494	0,1440
A21	0,8365	0,1166	0,0523	*0,0390		**B21**	0,9733	0,0597	0,0743	*0,0390
A22	5,4587	0,0530	0,1153	0,0735		**B22**	1,3488	0,0189	0,0727	0,2898
A23	0,0621	0,0368	0,0068	0,0390		**B23**	0,9952	0,0731	0,0602	0,1704
A24	0,0642	0,0219	0,1082	*0,0390		**B24**	1,6519	0,1998	4,4722	*0,0390
A25	0,4439	0,1011	0,0068	*0,0390		**B25**	0,5162	0,2777	3,7240	*0,0390
A26	4,4040	0,1986	0,0789	0,0493		**B26**	0,2356	0,0436	0,5043	*0,0390
A27	0,5935	0,0246	4,6457	0,0729						
A28	1,2677	*0,0024	2,0141	*0,3900						
A29	0,7113	0,0060	0,0905	0,0497						
A30	0,8211	0,0277	0,0151	*0,0390						
A31	0,1619	0,0273	0,0056	*0,0390						
A32	0,0372	0,0153	0,0199	*0,0390						
A33	0,9128	0,0427	0,0451	0,0492						
A34	0,4206	0,0132	0,1774	*0,0390						

* Muestras con resultados por debajo del LOD o ND. A estos casos se les asignó el resultado del cálculo LOD/√2, operación utilizada en estudios estadísticos toxicológicos, de acuerdo con el CDC.

ANEXO 3

Test estadísticos realizados con el *software* IBM
A: Cabellos tratados
B: Grupo control

CADMIO

Estadísticas de grupo

	VAR00005	N	Media	Desv. estándar	Media de error estándar
Casos	A	34	,0552	,08471	,01453
	B	26	,0536	,09421	,01848

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias							
						Significación				95% de intervalo de confianza de la diferencia	
		F	Sig.	t	gl	P de un factor	P de dos factores	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior
Casos	Se asumen varianzas iguales	,057	,811	,067	58	,474	,947	,00154	,02317	-,04483	,04792
	No se asumen varianzas iguales			,066	50,766	,474	,948	,00154	,02350	-,04565	,04874

BISMUTO

Estadísticas de grupo

	VAR00014	N	Media	Desv. estándar	Media de error estándar
Bi	A	33	,1420	,14547	,02532
	B	26	,0963	,11010	,02159

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias							
						Significación				95% de intervalo de confianza de la diferencia	
		F	Sig.	t	gl	P de un factor	P de dos factores	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior
Bi	Se asumen varianzas iguales	1,511	,224	1,331	57	,094	,188	,04578	,03439	-,02308	,11464
	No se asumen varianzas iguales			1,376	56,928	,087	,174	,04578	,03328	-,02086	,11242

PLATA

Estadísticas de grupo

	VAR00005	N	Media	Desv. estándar	Media de error estándar
PLATA	A	33	2,3434	8,00326	1,39319
	B	26	,4924	1,13736	,22305

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias							
						Significación				95% de intervalo de confianza de la diferencia	
		F	Sig.	t	gl	P de un factor	P de dos factores	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior
PLATA	Se asumen varianzas iguales	4,761	,033	1,168	57	,124	,248	1,85097	1,58484	-1,32263	5,02456
	No se asumen varianzas iguales			1,312	33,633	,099	,198	1,85097	1,41093	-1,01754	4,71948

PLOMO

Estadísticas de grupo

	VAR00014	N	Media	Desv. estándar	Media de error estándar
Pb	A	34	2,0886	3,06162	,52506
	B	26	,9878	1,06480	,20882

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias							
						Significación				95% de intervalo de confianza de la diferencia	
		F	Sig.	t	gl	P de un factor	P de dos factores	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior
Pb	Se asumen varianzas iguales	12,590	<,001	1,751	58	,043	,085	1,10082	,62861	-,15748	2,35912
	No se asumen varianzas iguales			1,948	42,850	,029	,058	1,10082	,56507	-,03886	2,24050

FACULTAD DE CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA URUGUAY

FACULTAD DE QUÍMICA

Alejandra S. Galizia